



S.E.P.

S.E.S.

Tec.N.M.

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TOLUCA

**“SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE
ZINCO Y COBRE Y SU ACTIVIDAD MICROBICIDA”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA AMBIENTAL**

PRESENTA:

KARINA PÉREZ LOZANO

No. CONTROL: 1055M0463

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MARÍA SONIA MIREYA MARTÍNEZ GALLEGOS

Co-DIRECTOR DE TESIS:

DR. JESÚS ARENAS ALATORRE

METEPEC, ESTADO DE MÉXICO, DICIEMBRE DE 2017.

SEP

SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
Instituto Tecnológico de Toluca

"Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos"

Metepec, Méx., 08/diciembre/2017

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN

DEPI-395-1917/2017

ASUNTO: AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN DE TESIS

C. KARINA PÉREZ LOZANO
CANDIDATA AL GRADO DE MAESTRA
EN CIENCIAS EN INGENIERÍA AMBIENTAL
PRESENTE.

De acuerdo con el Reglamento de Titulación del Sistema Nacional de Educación Superior Tecnológica de la Subsecretaría de Educación Superior de la Secretaría de Educación Pública y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora realizó con respecto a su Trabajo de Tesis titulado "SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ZINC Y COBRE Y SU ACTIVIDAD MICROBICIDA" la División de Estudios de Posgrado e Investigación concede autorización para que proceda a la impresión del mismo.

Sin más por el momento, quedo de usted.

ATENTAMENTE

Educación, Integridad y Ciencia

DR. JOSÉ LUIS GARCÍA RIVAS
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
TECNOLÓGICO NACIONAL
DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TOLUCA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

JLGR/magj



Av. Tecnológico S/N. Fraccionamiento La Virgen, C.P. 52149,
Metepec, Estado de México. Tels. Dirección (01722) 208 7205, Subd. Académica 208 7207,
Subd. de Planeación 208 7206, Subd. Administrativa 208 7208, Conmut. 208 72 00
e-mail: info@ittoluca.edu.mx, www.ittoluca.edu.mx



“Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos”

Metepec, Méx., 06/diciembre/2017

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN

DEPI-395-1844/2017

DR. JOSÉ LUIS GARCÍA RIVAS
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
PRESENTE.

Por este medio comunicamos a usted que la Comisión Revisora designada para analizar la tesis denominada **“SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ZINC Y COBRE Y SU ACTIVIDAD MICROBICIDA”**, que como parte de los requisitos para obtener el grado académico de Maestra en Ciencias en Ingeniería Ambiental presenta la C. KARINA PÉREZ LOZANO, con número de control 1055M0463 para sustentar el acto de Recepción Profesional, ha dictaminado que dicho trabajo reúne las características de contenido y calidad necesario para proceder a la impresión del mismo.

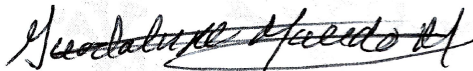
ATENTAMENTE



DRA. MARÍA SONIA MIREYA MARTÍNEZ GALLEGOS
DIRECTORA DE TESIS



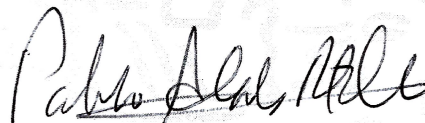
DR. JESÚS ARENAS ALATORRE
CO-DIRECTOR DE TESIS



DRA. MA. GUADALUPÉ MACEDO MIRANDA
REVISORA



DR. FRANCISCO JAVIER ILLESCAS MARTÍNEZ
REVISOR



DR. PABLO SAMUEL SCHABES RETCHKIMAN
REVISOR



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
TECNOLÓGICO NACIONAL
DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TOLUCA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**“ ¿QUÉ SERÍA DE LA VIDA
SI NO TUVIÉRAMOS EL
VALOR DE INTENTAR
ALGO NUEVO? ”**

Vincent van Gogh.

DEDICATORIAS

A **Dios**, por darme la oportunidad de vivir esta aventura y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante estos años de estudio.

A mis queridos padres **Leobardo Pérez** y **María del Refugio Lozano**, que de forma incondicional entendieron mi ausencia y mis malos momentos. Que a pesar de la distancia siempre estuvieron a mi lado para animarme. A ustedes quienes me han apoyado e impulsado en mis estudios, a quien les debo toda mi vida; les agradezco el cariño y su comprensión, a ustedes quienes han sabido formarme con buenos sentimientos, hábitos y valores, lo cual me ha ayudado a salir adelante buscando siempre el mejor camino.

A mis hermanos **Eduardo, Aron y Leo**, por estar conmigo y apoyarme siempre, por sus palabras de aliento, pero sobre todo, gracias por estar siempre presentes en otro momento tan importante en mi vida y por creer en mí.

A mis tías **Luly y Soco** por su apoyo incondicional durante esta etapa de mi vida, por sus consejos y su motivación que me impulsaron día a día a ser mejor.

Al resto de mi familia, mis abuelitos, mis tíos (as) y primos (as), por los buenos deseos siempre.

AGRADECIMIENTOS

*A mi directora de Tesis, **Dra. María Sonia Mireya Martínez Gallegos**, mi más amplio agradecimiento y admiración, gracias por haberme recibido en su grupo de investigación, con la que me encuentro en deuda por el ánimo infundido y la confianza en mí depositada, por su paciencia ante mi inconsistencia, por su valiosa dirección y apoyo para seguir este camino de tesis y llegar a la conclusión del mismo. Gracias por todas esas horas invertidas en este proyecto, por sus consejos, su gran sabiduría y por esa amistad brindada durante mi estadía.*

*A mi Co-Director de Tesis, **Dr. Jesús Arenas Alatorre**, por su colaboración, la orientación, el seguimiento y la supervisión continúa de la misma, pero sobre todo por la motivación y el apoyo recibido a lo largo de estos dos años. Gracias por darme la oportunidad de aprender junto con el equipo de técnicos del IFUNAM y permitirme el acceso al microscopio electrónico de barrido y de transmisión lo cual fue de gran ayuda para este trabajo. Agradezco también los buenos consejos, la sabiduría y la paciencia, así también por la confianza y la amistad.*

*A la **Dra. María Guadalupe Macedo Miranda**, **Dr. Francisco Javier Illescas Martínez** y **al Dr. Pablo Samuel Schabes Retchkiman**, por su valiosa colaboración y su tiempo invertido en esta investigación. Gracias por el apoyo, su paciencia y los consejos que me brindaron durante este tiempo.*

*A la Q.F.B **Verónica Albiter López**, por compartir su conocimiento y aprendizaje en el desarrollo de las pruebas bactericidas en el Laboratorio de Microbiología Servicios del LIIA en el Instituto Tecnológico de Toluca; gracias por la amistad, el apoyo, la orientación, el tiempo invertido en esta parte de la investigación y sobre todo por la paciencia.*

*Agradezco de todo corazón la maravillosa ayuda que tuve por parte del equipo de técnicos del Laboratorio Central de Microscopía (LCM) del Instituto de Física de la UNAM, **Fis. Roberto Hernández Reyes**, **Arq. Diego Quiterio Vargas**, **Dr. Samuel Tehuacanero Cuapa**, **Dr. Samuel Tehuacanero Núñez** y **Dr. Carlos Magaña**, gracias por el apoyo, por el tiempo invertido, por los buenos ratos de convivencia, por el compañerismo y amistad que me brindaron, por la paciencia y los buenos consejos.*

A **mis amigos**, esas personas nuevas que llegaron para formar parte de mi vida y en el cual nos fuimos convirtiendo en una familia, gracias por estar siempre a mi lado y por haberme permitido compartir estos años con ustedes, gracias por los buenos y malos momentos. A mis amigos de toda la vida que desde la distancia siempre me han estado brindando un gran apoyo moral y humano, también por motivarme en los momentos difíciles, así igual por pasar momentos de alegría.

A mis compañeros tanto de generación como de laboratorio, **Aiza, Mar, Elvi, Anita, Jess, Diego, Jorge, Mai y Charly**, quienes hicieron muy amena mi estadía en estos dos años; agradezco de corazón la amistad y el compañerismo recibido, así también gracias por la ayuda que me brindaron, los consejos dados y los buenos momentos que pasamos.

Un especial agradecimiento a **Anita, Elvi y Diego** por su invaluable amistad, nunca se me va a olvidar todos los instantes felices que pasamos juntos. Muchas risas a causa de bromas y ocasiones graciosas. Me siento orgullosa por la amistad que logramos mantener a lo largo de este tiempo. No importa cuántos años pasen, ni si tomamos un rumbo distinto, creo que el haberlos conocido ha sido y será uno de los más grandes momentos que tendré en la vida. Siempre compis.

A la **Sra. Cecy y a sus hijas Andrea y Alondra**, por abrirme las puertas de su hogar y hacerme sentir como parte de la familia. Gracias por la confianza y el cariño que recibí de su parte, por el apoyo, las charlas, la motivación, los buenos consejos, las risas y la buena compañía. Gracias por todo.

A mis compañeras de servicio social, **Gris y Ale**, mil gracias por el apoyo recibido de su parte. Gracias por su compañerismo y amistad, por la confianza recibida y perdón por los sustos que llegaron a pasar, jajajaja.

A **CONACYT** por la beca recibida en el período 2016-2017.

A **COMECYT** por el apoyo recibido para la participación en congreso.

Y todos los que me han acompañado desde el inicio de este viaje, gracias!

RESUMEN

En este trabajo se llevó a cabo la biosíntesis de nanopartículas de zinc (ZnNPs), cobre (CuNPs) y una mezcla de ambas (Cu/ZnNPs), empleando el método de la bioreducción utilizando lirio acuático como agente reductor. Durante la síntesis se ajustaron las condiciones óptimas en cuanto al tamizado, centrifugado, concentración de la solución metálica y pH de síntesis. La aplicación de las NPs se realizó determinando su efectividad microbiciada frente a una cepa de *E.coli*.

La formación de las NPs se comprobó mediante la detección de su plasmón de superficie a 300 nm para las ZnNPs, a 800 nm para las CuNPs y ambos picos fueron detectados con las Cu/ZnNPs. Mediante el análisis realizado por microscopía electrónica de barrido (SEM) se observaron las morfologías formadas por las NPs, sin una morfología definida para las ZnNPs y CuNPs, y con figuras geométricas definidas cuando están presentes ambos metales en las Cu/ZnNPs. Los estudios de microscopía electrónica de transmisión (TEM), muestran que la biosíntesis favoreció a la formación y estabilización de las ZnNPs y CuNPs, las cuales se obtuvieron con tamaños de 2 a 5 nm y 6 a 10 nm, dentro de estos mismos rangos estuvieron las Cu/ZnNPs; la indexación de las ZnNPs y CuNPs mostró que la estructura cristalina que se forma con mayor facilidad es la cúbica, no obstante también se forman cristales con estructura hexagonal aunque con menor frecuencia, y en el caso de las Cu/ZnNPs se identificaron estructuras monoclinicas que corresponden solo a las NPs bimetálicas. La composición para la mayor parte de las NPs corresponde a óxidos metálicos.

En cuanto a la efectividad microbiciada, esta fue independiente de la estructura y composición de las NPs, el tamaño si mostró influencia sobre todo cuando se detectaron NPs de 2 y hasta 10 nm. Las Cu/ZnNPs mostraron la mejor efectividad microbiciada aun cuando la formación de NPs bimetálicas se dio de manera aislada. El efecto microbiciada de las NPs estuvo influenciado por la concentración inicial de *E. coli*. El 100% de los microorganismos fueron inhibidos a partir de 10,000 mg/L para las ZnNPs y de 100 mg/L para las CuNPs, las NPs bimetálicas (Cu/ZnNPs) fueron efectivas a partir de solo 10 mg/L, lo que confirma que es posible inhibir el crecimiento de *E.coli*.

ABSTRACT

In this work the biosynthesis of zinc nanoparticles (ZnNPs), copper (CuNPs) and a mixture of both (Cu/ZnNPs) was carried out, using the method of bioreduction using water hyacinth as a reducing agent. During the synthesis, the optimum conditions were adjusted in terms of screening, centrifugation, concentration of the metal solution and pH of synthesis. The application of NPs was carried out by determining their microbicidal effectiveness against an *E. coli* strain.

The formation of the NPs was checked by detecting their surface plasmon at 300 nm for the ZnNPs, at 800 nm for the CuNPs and both peaks were detected with the Cu/ZnNPs. By means of the analysis carried out by scanning electron microscopy (SEM), the morphologies formed by the NPs were observed, without a defined morphology for the ZnNPs and CuNPs, and with defined geometrical figures when both metals are present in the Cu/ZnNPs. The transmission electron microscopy (TEM) studies show that biosynthesis favored the formation and stabilization of ZnNPs and CuNPs, which were obtained with sizes from 2 to 5 nm and 6 to 10 nm, within these same ranges were Cu/ZnNPs; indexing the ZnNPs and CuNPs showed that the crystalline structure is formed more easily is the cubic, however crystals also formed in hexagonal less frequently form, and in the case of Cu / ZnNPs monoclinic structure were identified that correspond only to bimetallic NPs. The composition for most of the NP corresponds to metal oxides.

As for the microbicidal effectiveness, this was independent of the form and composition of the NPs, the size did show influence especially when NPs of 2 and up to 10 nm were detected. The Cu/ZnNPs showed the best microbicidal effectiveness even when the formation of bimetallic NPs occurred in isolation. The microbicidal effect of the NPs was influenced by the initial concentration of *E. coli*. 100% of the microorganisms were inhibited from 10,000 mg/L for the ZnNPs and 100 mg/L for the CuNPs, the bimetallic NPs (Cu/ZnNPs) were effective from only 10 mg/L, which confirms that it is possible to inhibit the growth of *E. coli*.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1 FUNDAMENTOS	3
1.1 CONTAMINACIÓN DEL AGUA	3
1.1.1 <i>Contaminantes microbianos del agua</i>	3
1.1.2 <i>Bacterias</i>	5
1.2 NANOTECNOLOGÍA	7
1.3 NANOPARTÍCULAS METÁLICAS	8
1.3.1 <i>Nanopartículas de zinc (ZnNPs)</i>	11
1.3.2 <i>Nanopartículas de cobre (CuNPs)</i>	11
1.4 MÉTODOS DE SÍNTESIS	12
1.4.1 <i>Reducción química</i>	12
1.4.1.1 <i>Bioreducción química</i>	14
1.4.2 <i>Bioreducción</i>	14
1.5 LIRIO ACUÁTICO	16
1.6 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LAS NANOPARTÍCULAS	17
1.7 MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS	19
1.8 INDEXACIÓN DE NANOPARTÍCULAS	21
1.9 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS	22
1.9.1 <i>Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (IR)</i>	22
1.9.2 <i>Espectroscopía UV-Vis</i>	23
1.10 MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN MICROESTRUCTURALES	23
1.10.1 <i>Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)</i>	23
1.10.2 <i>Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)</i>	24
1.11 OBJETIVOS	27
1.11.1 <i>Objetivo general</i>	27
1.11.2 <i>Objetivos específicos</i>	27
1.11.3 <i>Hipótesis</i>	27

2. METODOLOGÍA..... 28

2.1 REACTIVOS.....	28
2.2 MUESTREO DEL LIRIO ACUÁTICO Y PROCESAMIENTO	29
2.3 CARACTERIZACIÓN DE LA BIOMASA	30
2.3.1 <i>Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)</i>	30
2.4 BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ZINC (ZnNPs) Y COBRE (CuNPs)	30
2.5 BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS BIMETÁLICAS (Cu/Zn NPs)	31
2.6 CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.....	31
2.6.1 <i>Espectroscopía UV-Vis</i>	31
2.6.2 <i>Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)</i>	32
2.6.3 <i>Espectroscopía por Dispersión de Energía de Rayos X (EDS)</i>	32
2.6.4 <i>Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)</i>	32
2.6.4.1 Indexación de nanopartículas	32
2.7 PRUEBA DE ACTIVIDAD MICROBICIDA.....	33
2.7.1 <i>Cuenta de UFC/mL en cepas bacterianas</i>	33
2.7.1.1 Siembra de cepas de control.....	33
2.7.1.2 Preparación del inóculo.....	34
2.7.1.3 Siembra del inóculo	34
2.7.2 <i>Determinación de UFC/mL con efecto microbicida cuantificable</i>	34
2.7.3 <i>Mínima concentración bactericida (MIB)</i>	34

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 36

3.1 CARACTERIZACIÓN DE LA BIOMASA	36
3.1.1 <i>Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)</i>	36
3.2 NANOPARTÍCULAS DE ZINC (ZnNPs).....	38
3.2.1 <i>Espectroscopía UV-Vis</i>	38
3.2.2 <i>SEM</i>	39
3.2.3 <i>TEM</i>	44
3.2.4 <i>Indexación de ZnNPs</i>	45
3.3 NANOPARTÍCULAS DE COBRE (CuNPs).....	49
3.3.1 <i>Espectroscopía UV-Vis</i>	49

3.3.2 SEM.....	49
3.3.3 TEM.....	54
3.3.4 Indexación de CuNPs.....	56
3.4 NANOPARTÍCULAS BIMETÁLICAS COBRE/ZINC (Cu/Zn NPs)	59
3.4.1 Espectroscopía UV-Vis.....	59
3.4.2 SEM.....	60
3.4.3 TEM.....	67
3.4.4 Indexación de Cu/Zn NPs	69
3.5 PRUEBAS DE ACTIVIDAD BACTERICIDA.....	70
3.5.1 Cuenta de UFC/mL en cepas bacterianas	70
3.5.2 Determinación de UFC/mL con efecto microbicida cuantificable.....	71
3.5.3 Mínima concentración bactericida (MIB).....	75
CONCLUSIONES	81
REFERENCIAS	83
ANEXOS.....	103

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Esquema simplificado de la pared celular de bacterias <i>Gram (+)</i> y <i>Gram (-)</i> (Flores, 2014)	6
Figura 1.2 Estructuras características de las NPs metálicas (Ascencio, 2000)	10
Figura 1.3 Fases de formación de partículas metálicas por vía reducción química	13
Figura 1.4 Esquema de la interacción del haz de electrones con la muestra (Williams y Carter, 2009)	25
Figura 2.1 Diagrama general del método experimental	28
Figura 2.2 Esquema del proceso de bioreducción de alfalfa (Canizal <i>et al.</i> , 2001)	30
Figura 3.1 FTIR de la biomasa	36
Figura 3.2 Espectro UV-Vis de ZnNPs producidas a solución buffer pH 4, 7 y 12	39
Figura 3.3 Micrografías de ZnNPs a pH 4: a) vista general, b) formación de NPs	40
Figura 3.4 Análisis EDS de ZnNPs sintetizadas a pH 4	41
Figura 3.5 Micrografías de ZnNPs a pH 7: a) vista general, b) formación de NPs	41
Figura 3.6 Análisis EDS de ZnNPs sintetizadas a pH 7	42
Figura 3.7 Micrografías de ZnNPs a pH 12: a) vista general, b) morfología en forma de costra	43
Figura 3.8 Análisis EDS de ZnNPs sintetizadas a pH 12	43

Figura 3.9 Micrografías obtenidas por HRTEM de ZnNPs a pH 4	44
Figura 3.10 Micrografía obtenidas por HRTEM de ZnNPs a pH 7	45
Figura 3.11 Micrografías obtenidas por HRTEM de ZnNPs a pH 12	45
Figura 3.12 NPs a pH 4 indexadas con composición ZnO ₂ (cúbica) y ZnO (hexagonal)	46
Figura 3.13 NPs a pH 7 indexadas con composición ZnO ₂ (cúbica) y ZnO (hexagonal)	47
Figura 3.14 NPs a pH 12 indexadas con composición ZnO ₂ (cúbica) y ZnO (hexagonal)	48
Figura 3.15 Espectro UV-Vis de CuNPs producidas a solución buffer pH 4, 7 y 12	49
Figura 3.16 Micrografías de CuNPs a pH 4: a) vista general, b) imagen HRTEM	50
Figura 3.17 Análisis EDS de CuNPs sintetizadas a pH 4	51
Figura 3.18 Micrografías de CuNPs a pH 7: a) vista general, b) formación de relieves	52
Figura 3.19 Análisis EDS de CuNPs sintetizadas a pH 7	52
Figura 3.20 Micrografías de CuNPs a pH 12: a) vista general, b) morfología homogénea	53
Figura 3.21 Análisis EDS de CuNPs sintetizadas a pH 12	54
Figura 3.22 Micrografías obtenidas por HRTEM de CuNPs a pH 4	54
Figura 3.23 Micrografías obtenidas por HRTEM de CuNPs a pH 7	55

Figura 3.24 Micrografías obtenidas por HRTEM de CuNPs a pH 12.....	55
Figura 3.25 NPs a pH 4 indexadas con composición CuO (cúbica FCC)	56
Figura 3.26 NPs a pH 7 indexadas con composición CuO (cúbica FCC)	57
Figura 3.27 NPs a pH 12 indexadas con composición CuO (cúbica FCC)	58
Figura 3.28 Espectro UV-Vis de Cu/Zn NPs producidas a solución buffer pH 4, 7 y 12	59
Figura 3.29 Micrografías de Cu/Zn NPs a pH 4: a) vista general, b) imagen HRTEM	60
Figura 3.30 Análisis EDS de Cu/Zn NPs sintetizadas a pH 4	61
Figura 3.31 Mapeo de Cu/Zn NPs sintetizadas a pH 4.....	62
Figura 3.32 Micrografías de Cu/Zn NPs a pH 7: a) vista general, b) formación de figuras geométricas	63
Figura 3.33 Análisis EDS de Cu/Zn NPs sintetizadas a pH 7	63
Figura 3.34 Mapeo de Cu/Zn NPs sintetizadas a pH 7.....	64
Figura 3.35 Micrografías de Cu/Zn NPs a pH 12: a) vista general, b) imagen HRTEM	65
Figura 3.36 Análisis EDS de Cu/Zn NPs sintetizadas a pH 12	66
Figura 3.37 Mapeo de Cu/Zn NPs sintetizadas a pH 12.....	67
Figura 3.38 Micrografías obtenidas por HRTEM de Cu/Zn NPs: a) y b) pH 4, c) pH 7	68
Figura 3.39 Micrografías obtenidas por HRTEM de Cu/Zn NPs a pH 12	69

Figura 3.40 NPs a pH 12 indexadas con composición cercana a $\text{Cu}_{0.64}\text{Zn}_{0.36}$ (cúbica FCC) y CuZn (monoclínica)	70
Figura 3.41 Efecto microbicida en función de la concentración de ZnNPs	76
Figura 3.42 Efecto microbicida en función de la concentración de CuNPs	78
Figura 3.43 Efecto microbicida en función de la concentración de Cu/Zn NPs. ...	80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Extractos de plantas utilizados en el proceso de síntesis de NPs metálicas	15
Tabla 2.1 Reactivos	29
Tabla 2.2 Descripción de la cepa de <i>E. coli</i> ATCC 25922	33
Tabla 3.1 Parámetros obtenidos en la síntesis de ZnNPs	48
Tabla 3.2 Parámetros obtenidos en la síntesis de CuNPs.....	58
Tabla 3.3 Cuenta en placa para cada repetición del inóculo 1×10^{-7} (Ec 1, Ec 2, Ec 3).....	71
Tabla 3.4 Cuenta en placa del crecimiento de <i>E. coli</i> con diferentes concentraciones de ZnNPs	72
Tabla 3.5 Cuenta en placa del crecimiento de <i>E. coli</i> con diferentes concentraciones de CuNPs.....	73
Tabla 3.6 Cuenta en placa del crecimiento de <i>E. coli</i> con diferentes concentraciones de Cu/Zn NPs.....	74
Tabla 3.7 No. de colonias de <i>E. coli</i> en función de la concentración de ZnNPs. Concentración del inóculo 1×10^{-6} UFC/mL.....	75
Tabla 3.8 No. de colonias de <i>E. coli</i> en función de la concentración de CuNPs. Concentración del inóculo 1×10^{-6} UFC/mL.....	77
Tabla 3.9 No. de colonias de <i>E. coli</i> en función de la concentración de Cu/Zn NPs. Concentración del inóculo 1×10^{-6} UFC/mL.....	79

INTRODUCCIÓN

El agua es uno de los recursos naturales más importantes para todos los seres vivos en el mundo. Hoy en día, la contaminación del agua está siendo alterada e incrementada como resultado de la creciente contaminación microbiana y química debido a la industrialización y la creciente población mundial (Khalil *et al.*, 2011; Ramírez-Castillo *et al.*, 2015). La contaminación microbiológica se considera de riesgo debido a los daños a la salud que puede provocar, llegando inclusive a causar la muerte (Inoue *et al.*, 2002). Existen agentes físicos y químicos, como el cloro, ozono y luz ultravioleta que son usados para la desinfección del agua (De la Rosa-Gómez *et al.*, 2008); no obstante, debido a la resistencia desarrollada por algunos microorganismos, en años recientes se está probando el uso de NPs metálicas como agentes microbicidas en el tratamiento de agua.

Las nanopartículas (NPs) son racimos de átomos, iones o moléculas estabilizados a través de un material para evitar su aglomeración, sus estructuras tienen un tamaño en la escala nanométrica 1×10^{-9} m (Gómez-Gallego *et al.*, 2016). La aplicación de NPs metálicas o de óxidos metálicos ha adquirido mucho interés en virtud de las propiedades que muestran, una de ellas es que poseen un número de átomos muy altos en su superficie dando como resultado un incremento del área superficial (Esparza-González *et al.*, 2016).

En la actualidad existen diversos procedimientos para la síntesis de NPs metálicas controlando su tamaño, forma y composición. Las NPs pueden ser sintetizadas usando como agentes reductores varios extractos de plantas (Paul *et al.*, 2015), lo que la convierte en una técnica verde y amigable con el medio ambiente.

Entre las NPs metálicas frecuentemente sintetizadas se encuentran las de zinc (ZnNPs) y cobre (CuNPs), ambos metales han mostrado una fuerte actividad microbicida frente a diversos microorganismos los cuales incluyen hongos, virus y bacterias *Gram*-positiva y *Gram*-negativa (Chakra *et al.*, 2016), estas propiedades pueden ser mejoradas si ambos metales se manejan a escala nanométrica. Las ZnNPs y CuNPs se presentan como una alternativa prometedora para combatir la resistencia microbiana mediante mecanismos de acción que sean capaces de

penetrar la pared celular de los microorganismos o dañar la membrana citoplasmática por el contacto con el metal (Sharma *et al.*, 2010; Quaranta *et al.*, 2011).

Este proyecto de investigación propone la síntesis de NPs metálicas de Zn y Cu utilizando el método de la bioreducción, proponiendo el uso de lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) como agente reductor. Esta planta es reconocida como maleza acuática y sin un uso en particular. Para establecer las condiciones óptimas se consideraron variables como el tamaño de malla para el tamizado, la velocidad de centrifugado, la concentración de la solución metálica y el pH de la solución. Las NPs fueron caracterizadas utilizando microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM). Finalmente con las ZnNPs y CuNPs obtenidas, se realizaron estudios de actividad microbicida frente a la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922.

En el apartado 1 se presentan los fundamentos teóricos referidos a este tema de investigación. Los temas que se abordaron fueron la contaminación del agua, nanotecnología, NPs metálicas, métodos de síntesis, mecanismos de acción de las NPs, métodos espectroscópicos y de caracterización microestructurales.

En el apartado 2 se muestra la metodología utilizada para la realización de este estudio, se describe el método de síntesis empleado, los equipos y técnicas de detección y caracterización utilizados para las NPs y el procedimiento seguido para probar la actividad microbicida de las NPs.

En el apartado 3 se presentan los resultados obtenidos de la síntesis de las NPs así como los de la caracterización de las mismas. Están incluidos los estudios por microscopías electrónicas de barrido y de transmisión y el análisis de los resultados de estas técnicas, así como los datos obtenidos de la realización de las pruebas microbicidas utilizando diferentes inóculos y concentraciones de la suspensión metálica.

Finalmente se presentan las conclusiones del trabajo realizado y las referencias utilizadas para contextualizar los resultados del mismo.

1 FUNDAMENTOS

1.1 CONTAMINACIÓN DEL AGUA

Los humanos requieren el consumo de agua potable para vivir, sin embargo, los recursos naturales se han vuelto escasos debido en parte a la creciente población por lo que su requerimiento en varias regiones habitadas es la preocupación de muchas organizaciones gubernamentales. Asimismo, el agua es utilizada no solo para consumo humano, sino también en procesos industriales y en muchas actividades antropogénicas cotidianas, lo que la convierte en el principal medio de transporte de los subproductos desechados que provocan su contaminación (Khalil *et al.*, 2011; Ramírez-Castillo *et al.*, 2015).

En resumen, el consumo humano representa un porcentaje reducido del volumen de agua que es utilizado a diario en el mundo. Dicho consumo de agua por persona varía debido a diversos factores entre los que destacan: el clima de la región, el nivel socioeconómico y actividad económica de la región, las costumbres, la disponibilidad y dificultad para acceder al agua; el nivel de cultura del agua que tienen las persona para su uso, entre otros (Rosegrant *et al.*, 2002; FCEA, 2006; Márquez y Ortega, 2017).

Se considera que el agua está contaminada, cuando ésta ya no reúne las condiciones requeridas para los usos a los que se destina en su estado natural. En la actualidad, en México se considera que el 26% de los ríos, lagos y embalses son de buena calidad, mientras el 74% restante presenta algún grado de contaminación. Los principales contaminantes son la materia orgánica, nutrientes (nitrógeno y fósforo) y microorganismos, así como metales en regiones con actividad industrial (Pérez, 2007; Alba *et al.*, 2013).

1.1.1 Contaminantes microbianos del agua

La contaminación microbiológica es un factor importante a cuidar debido a los daños a la salud que puede provocar, llegando inclusive a causar la muerte (Inoue

et al., 2002). Las bacterias han sido usadas como indicadores de la calidad sanitaria del agua desde el siglo XIX, y son los microorganismos patógenos en las aguas naturales su mayor amenaza (Rivera-Garza *et al.*, 2000). En la actualidad la disponibilidad de este recurso, donde se detecta la presencia de microorganismos patógenos, ha cobrado un interés especial debido a que estos representan un factor de riesgo que afecta negativamente la salud humana ya que son la causa de infecciones gastrointestinales que pueden causar la muerte (Moaty *et al.*, 2016).

Debido a que la variedad de microorganismos en el agua puede ser muy elevada, se hace prácticamente imposible verificar mediante análisis rutinarios y rápidos la ausencia de toda esta potencial flora microbiana presente en agua para consumo humano. Por ello, se recurre a la investigación de organismos más comunes y que normalmente están presentes en las deyecciones humanas y de animales, que de esta forma actúan como organismos indicadores de contaminación fecal, lo que posibilita el asegurar la eficacia de la potabilización y depuración del agua. La presencia de estos microorganismos, indica la certeza de presencia de patógenos en medio acuoso (Alba *et al.*, 2013). En general, las enfermedades relacionadas con el agua causan 3,4 millones de muertes cada año en todo el mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha informado que el 80% de las enfermedades se propagan a través del agua contaminada (Saravanan *et al.*, 2016).

Los grupos coliformes fecales y totales se utilizan como indicadores de contaminación biológica debido a su rápida multiplicación y pequeño tamaño (Pierce, 2010). Los coliformes fecales son un subgrupo de los coliformes totales y funcionan como un indicador más específico de contaminación fecal. Del total de los coliformes en las heces humanas el 96.4% es de este tipo, siendo *Escherichia coli* el miembro predominante (Rivera-Garza *et al.*, 2000). Aunque *E. coli* constituye parte de la flora bacteriana del tubo digestivo del hombre y de los animales de sangre caliente, se ha demostrado que algunas cepas poseen factores de virulencia y producen enteritis (Alba *et al.*, 2013). En México los

coliformes fecales son usados como indicador de contaminación por patógenos del agua (NOM-001-SEMARNAT- 1996, 1996). La OMS recomienda que el agua para beber contenga cuentas de coliformes fecales y totales de 0 en 100 mL de cualquier muestra (OMS, 2011).

La gran mayoría de los problemas de salud relacionados con el agua son el resultado de la contaminación microbiológica (bacteriológica, viral o protozoaria), por lo que la desinfección del agua es de incuestionable importancia para abastecer de agua potable a la población. Agentes físicos y químicos, como el cloro, ozono y luz ultravioleta son usados para este propósito (De la Rosa-Gómez *et al.*, 2008); en años recientes se está probando el uso de NPs metálicas como agentes microbicidas en el tratamiento de agua.

1.1.2 Bacterias

Las bacterias son microorganismos unicelulares que presentan un tamaño de pocos micrómetros (entre 0.5 y 5, por lo general) y diversas formas incluyendo coco (esferas), bacilos (barras) y espirilos (hélices). Las bacterias son procariontas y, por lo tanto, a diferencia de las células eucariotas (de animales, plantas, hongos y protozoos), no tienen el núcleo definido ni presentan, en general, orgánulos membranosos internos. Generalmente poseen una pared celular compuesta de peptidoglicano. Muchas bacterias disponen de flagelos o de otros sistemas de desplazamiento y son móviles (Prats, 2005; Del Aguila y Oroche, 2016).

Las bacterias pueden diferenciarse de acuerdo a su morfología, su tamaño, su forma de reproducción y composición química. Por la estructura de sus paredes celulares puede dividirse en *Gram-positivas* y *Gram-negativas* (de acuerdo a su respuesta frente a la tinción diferencial de *Gram*, Figura 1.1) debido principalmente al grosor de la pared celular que es mayor en las primeras y a los constituyentes moleculares presentes en la célula (Madigan *et al.*, 2003; Negroni, 2009).

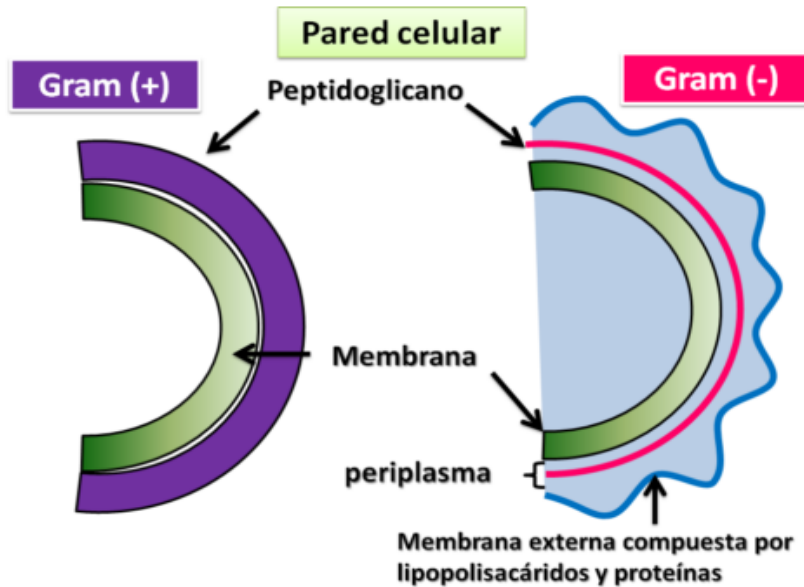


Figura 1.1 Esquema simplificado de la pared celular de bacterias *Gram (+)* y *Gram (-)* (Flores, 2014).

Dentro de las bacterias, *E. coli* es sin duda el microorganismo procarionte estudiado con mayor profundidad. Es una bacteria *Gram*-negativa extendida en forma de varilla y de reproducción rápida ya que en condiciones óptimas se divide cada 20 minutos, tiene un tamaño promedio de 1 a 2 μm de largo y un ancho de 0.5 μm , se puede dividir tanto por reproducción asexual como por intercambio genético; es capaz de sobrevivir y crecer a condiciones ácidas de hasta un $\text{pH} = 2.5$ y temperaturas de 7 $^{\circ}\text{C}$, permaneciendo viable durante varios meses (Pierce, 2010; Zyoud *et al.*, 2016). Aunque algunas cepas de *E. coli* son tóxicas y causan enfermedades, en su mayor parte son benignas, la infección con este organismo está asociada con la colitis hemorrágica, aunque también produce gastroenteritis (Paredes y Roca, 2004; Pierce, 2010).

Su rápida reproducción ha permitido la caracterización y análisis de numerosas mutaciones de *E. coli* que alteran desde el aspecto de la colonia hasta la resistencia a los fármacos, haciéndola un microorganismo ideal para el estudio de compuestos microbicidas (Pierce, 2010; Ruiz-Garbajosa y Cantón, 2016). Es por ello que la *E. coli* es una bacteria modelo para medir el grado de contaminación microbiana en el agua.

1.2 NANOTECNOLOGÍA

La nanotecnología es el diseño, caracterización, y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas complejos mediante el control de la forma, el tamaño y las propiedades de la materia a escala nanométrica (The Royal Society, 2004). El término nanotecnología abarca un amplio rango de herramientas, técnicas y potenciales aplicaciones, entre las disciplinas que convergen en ellas se encuentran la física, la química, la biología, la medicina, la ingeniería, entre otras.

Entre las aplicaciones conocidas para los nanomateriales destacan armamentos, tratamiento de agua, diagnóstico de enfermedades, procesamiento de alimentos, materiales de construcción, informática, alimentos transgénicos, cosméticos, textiles y herramientas (Huy *et al.*, 2013). Una de las principales aplicaciones de los nanomateriales es el tratamiento de ciertas enfermedades, con la construcción átomo a átomo de moléculas complejas que realizan funciones primordiales como por ejemplo la fabricación de insulina (Villafuerte-Robles, 2009; Gómez-Gallego *et al.*, 2016).

En general, las nanoestructuras son una nueva clase de materiales en donde por lo menos una de sus dimensiones se encuentra menor a 100 nm. De acuerdo al número de dimensiones que se encuentren en el régimen nanométrico, los nanomateriales se pueden clasificar en cuatro tipos (Gutiérrez-Wing *et al.*, 2000).

- a) **Materiales de dimensión cero (0D)**, en donde las tres dimensiones se ubican en el régimen nanométrico, a esta corresponden las NPs <10 nm conocidas también como puntos cuánticos (Aiken III y Finke, 1999).
- b) **De una dimensión (1D)**, teniendo una longitud variable, conservan una sola dimensión en el régimen de nanómetros, como es el caso de nanoalambres y nanotubos.
- c) **De dos dimensiones (2D)**, con áreas de tamaño indefinido pero manteniendo su espesor en <100 nm, como en el caso de películas delgadas.

- d) **De tres dimensiones (3D)**, en la que los sólidos tridimensionales están formados por unidades nanométricas (Gutiérrez-Wing *et al.*, 2000; Wing, 2005).

Lo interesante, es que las propiedades de los nanomateriales se pueden manipular para modificar su tamaño o forma sin afectar su composición química (Gómez-Gallego *et al.*, 2016).

1.3 NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

Las nanopartículas (NPs) son racimos de átomos, iones o moléculas estabilizados a través de un material para evitar su aglomeración, sus estructuras tienen un tamaño en la escala nanométrica 1×10^{-9} m (Gómez-Gallego *et al.*, 2016). Esta característica en particular permite crear enlaces entre moléculas pequeñas y materiales. Las NPs pueden formarse por la mayoría de los elementos de la tabla periódica, los elementos metálicos forman una amplia variedad de ellas y tienen la característica de formarse solas o combinadas con otro metal. Las NPs metálicas poseen propiedades químicas y físicas mejores que los materiales en bulto, por ejemplo:

- a) Los metales de transición hierven a temperatura más baja que los materiales en bulto, su temperatura de ebullición depende del tamaño, forma y composición de las NPs (Rosano-Ortega *et al.*, 2006; Antoniammal y Arivuoli, 2012).
- b) Los sistemas bimetálicos que presentan un comportamiento de separación superficial se funden en dos etapas: difusión en la superficie seguida de una fusión total (Cao, 2004; Poole y Owens, 2007; Lee, 2008).
- c) La humedad en nanomateriales puede ser inducida por tratamientos térmicos o por modificaciones físicas o químicas del sustrato (formación de islas) (Velev y Kaler, 2000; Zanella, 2012).

La aplicación de NPs metálicas o de óxidos metálicos ha adquirido mucho interés en virtud de las propiedades que muestran, una de ellas es que poseen un número

de átomos muy altos en su superficie dando como resultado un incremento del área superficial y generando efectos cuánticos, esta propiedad incrementa la reactividad física y química de los nanomateriales maximizando sus propiedades según su campo de aplicación (Esparza-González *et al.*, 2016).

A medida que el tamaño de la partícula metálica disminuye, la densidad continua de estados electrónicos en su estructura de banda se divide, hasta que dominan los niveles discretos de energía, este carácter discreto de los niveles electrónicos (al igual que ocurre en átomos o moléculas) es un elemento clave para controlar las propiedades de las mismas. Los cambios de geometría y de tamaño en un sistema o la alteración de las posiciones de los componentes (átomos, moléculas) provocan cambios significativos en la distribución o en el número de dichos niveles y da lugar a cambios de las distintas propiedades que caracterizan a un objeto (conductividad eléctrica, absorción luminosa, etc). Este hecho es crucial ya que determina que la materia cambie sus propiedades macroscópicas a medida que el volumen del material se hace más y más pequeño (Drexler, 1987).

En un metal es posible el movimiento de electrones no confinados, que resulta en un fuerte reflectividad conocida como brillo metálico. En contraste, en las partículas metálicas a escala nanométrica los electrones pueden moverse libremente, pero ahora éstos electrones presentan una particularidad, se muevan de manera cuasi-ordenada y no al azar. Este movimiento colectivo se denomina “plasmón” (nubes de electrones). Por lo anterior, las dispersiones coloidales de NPs debido a este fenómeno presentan color, el cual dependerá del tamaño y forma de la partícula, de su concentración y de la constante dieléctrica del medio. Los plasmones desempeñan un gran papel en las propiedades ópticas de los metales. En la mayoría de los metales, la frecuencia del plasma se encuentra en la región del ultravioleta, haciéndolos brillantes en el espectro visible (Ball, 2005).

En general, las NPs metálicas presentan arreglos geométricos simples como las estructuras del tipo cúbica centrada en las caras (fcc, por sus siglas en inglés face centered cubic) o cúbicas simples (que replican la simetría de esta clase de

elementos químicos), o con la presencia de maclas o gemelamientos, los cuales son defectos que cambian el sentido de continuidad de los átomos en una recta, y de acuerdo a su número producen configuraciones decahedrales e icosaedrales (Ascencio *et al.*, 1998; Ascencio, 2000), como se muestra en la Figura 1.2, lo que propicia que se relacionen con los cristales. Sin embargo, las configuraciones de las nanoestructuras metálicas pueden presentar configuraciones basadas en simetrías prohibidas como la pentagonal o ser amorfas y no mostrar periodicidad. Asimismo, un sistema cristalino permite que la repetición de una celda unitaria cubra en su totalidad un volumen cualquiera, en contraparte, las nanoestructuras no crecen a mayor escala por la estabilización de la superficie de estos agregados (Ascencio, 2000; Yacamán *et al.*, 2001).

ESTRUCTURAS

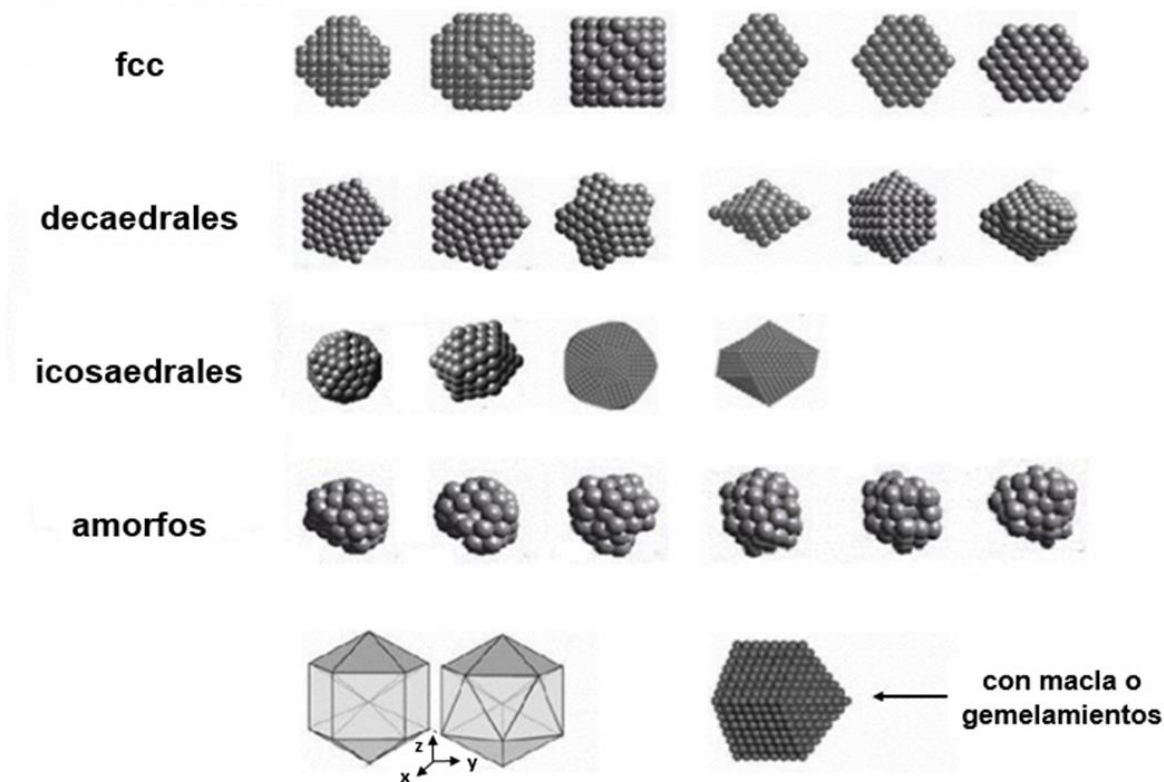


Figura 1.2 Estructuras características de las NPs metálicas (Ascencio, 2000).

Las NPs metálicas como Cu, CuO, Ag, ZnO, han mostrado una fuerte actividad microbicida frente a diversos microorganismos los cuales incluyen hongos, virus y bacterias *Gram*-positiva y *Gram*-negativa (Chakra *et al.*, 2016).

1.3.1 Nanopartículas de zinc (ZnNPs)

El zinc es un micronutriente esencial para muchas plantas, interactúa con proteínas y enzimas para nutrirlas; sin embargo, un exceso de zinc en las plantas causa clorosis e impide el desarrollo y crecimiento de las mismas (Nair y Chung, 2017). Por otro lado el óxido de zinc es un material inorgánico, su principal característica son las propiedades microbicidas que han mostrado y que han resultado seguras para los seres humanos en los bloqueadores solares y en ropa, asimismo en pinturas, pigmentos, semiconductores y como un fertilizante muy efectivo en suelos (Esparza-González *et al.*, 2016; Bajpai *et al.*, 2016; Nair & Chung, 2017).

La aplicación de métodos no convencionales para obtener NPs de ZnO, ha derivado en la búsqueda de las nuevas rutas de síntesis tales como el uso de colágeno y métodos electroquímicos (Romih *et al.*, 2017). Una desventaja que tienen las NPs ZnO es que se disuelven rápido en el medio ambiente liberando iones de zinc e incrementando su presencia en suelos y agua lo que a largo plazo puede resultar tóxico (Nair y Chung, 2017).

1.3.2 Nanopartículas de cobre (CuNPs)

El cobre es el metal semiconductor por excelencia, además muestra propiedades físicas, químicas, antimicrobianas y una abundancia considerable en la superficie terrestre (Betancourt-Galindo *et al.*, 2013). El cobre es tóxico para el ser humano en altas concentraciones, se usa para transportar agua en la que puede ser soluble y una vez en plantas o animales, tiende a acumularse. Las CuNPs han atraído mucho la atención en los últimos años, debido a sus aplicaciones antibacterianas y antifúngicas. Se han aplicado varios métodos de síntesis para obtener CuNPs incluyendo reducción, sonoquímica, reducción termal, técnicas de microemulsión e irradiación láser y láser inducido. El método químico es el más utilizado para sintetizar CuNPs; sin embargo, son necesarios métodos más sencillos y económicos (Chakra *et al.*, 2016).

1.4 MÉTODOS DE SÍNTESIS

En la actualidad existen diversos procedimientos para la síntesis de NPs metálicas con tamaño, forma, estructura y composición de manera controlada. Las NPs pueden ser sintetizadas usando varios procedimientos físicos, químicos y biológicos (Prusty y Parida, 2014). En los métodos químicos se incluyen: reducción química, electroquímica, polimerización por emulsión, sonoquímica, termoquímica, fotoquímica, entre otros (Sugimoto, 2001). En este trabajo se utilizó uno de los métodos alternativos para la producción de NPs metálicas de cobre y zinc, el de bioreducción.

1.4.1 Reducción química

El método de reducción química fue publicado por primera vez por Faraday en 1857 y, actualmente, se ha convertido en el método más común para la preparación de NPs. El mecanismo de formación de NPs se basa en la reducción de la sal metálica al correspondiente átomo metálico cerovalente, a continuación estos átomos actúan como centros de nucleación dando lugar a racimos atómicos o clusters cuyo crecimiento continuará a medida que se mantenga el suministro de átomos o en el momento de estabilizarlos a través de moléculas que se adsorben en la superficie para prevenir la aglomeración. Se pueden establecer analogías entre estos procesos de formación de partículas y las reacciones en cadena, con sus bien conocidas fases de iniciación, propagación y terminación como se aprecia en la Figura 1.3 (Trindade, 2001).

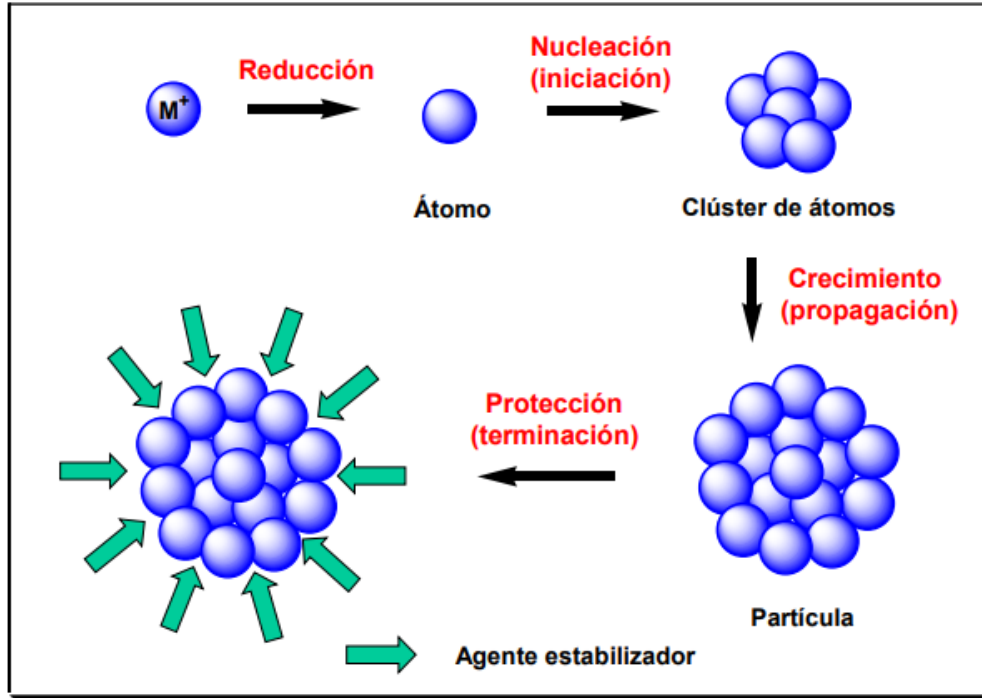


Figura 1.3 Fases de formación de partículas metálicas por vía reducción química.

La principal ventaja del método de reducción química es su reproducibilidad y la posibilidad de obtener coloides monodispersos con una distribución estrecha de tamaños de partículas (Morales-Luckie *et al.*, 2008). Diferentes agentes de reducción se encuentran descritos en la literatura, en primer lugar se encuentra el método descrito por Faraday, 1857, basado en la reducción de $[AuCl_4]^-$ con citrato sódico. En 1976, Hirai *et al.*, describieron el proceso basado en la reducción del precursor metálico con alcoholes, en donde el alcohol se oxida al correspondiente compuesto carbonílico; este método ha sido ampliamente utilizado en la preparación de NPs de metales estabilizados por polímeros. En 1981, Schmid, *et al.*, describieron la ruta de diborano (B_2H_6) como reductor.

Los métodos químicos involucran el uso de agentes reductores de origen sintético, que actúan sobre iones metálicos para producir NPs, además de agentes surfactantes para el control de la morfología y tamaño, (como dodecilsulfato de sodio, soluciones poliméricas, etc), así como de solventes orgánicos. Sin embargo, estos reactivos son usualmente nocivos para el ser humano y el ambiente (López *et al.*, 2013).

1.4.1.1 Bioreducción química

La reducción química como ya se mencionó, es el método más versátil para obtener NPs metálicas, es simple y económico (Kruk *et al.*, 2015). El fenómeno de resonancia de plasmón revela un color específico del metal basado en el tamaño de la partícula sintetizada. Utilizando agentes reductores y estabilizadores naturales, se pueden generar NPs metálicas con tamaño y forma controlados mediante la bioreducción química como un nuevo método para evitar la formación de óxido (Chakra *et al.*, 2016).

1.4.2 Bioreducción

En general, los sistemas biológicos como las plantas acuáticas tienen un gran potencial para extraer metales pesados del agua y/o suelos, y acumularlos en sus tejidos por medio de dos rutas (Gardea-Torresdey *et al.*, 1999): 1) una activa utilizando el metabolismo y 2) otra pasiva por medio de los grupos funcionales contenidos en sus tejidos; sin embargo, los sistemas biológicos vivos sólo actúan a concentraciones bajas del metal y no son aplicables en condiciones ácidas. En contraparte los sistemas muertos o inactivados tienen la ventaja de no ser afectados a altas concentraciones del metal y no requieren de un tratamiento previo con nutrientes para equilibrar y mantener la actividad biológica de la planta (Gardea-Torresdey *et al.*, 1996).

Mukherjee *et al.*, (2001) abrió una ruta de síntesis de NPs metálicas a través de organismos eucariontes, y han continuado sus investigaciones basadas en hongos, especialmente en la síntesis extracelular de NPs de Ag y Au (Mukherjee *et al.*, 2002; Ahmad *et al.*, 2005). Estos trabajos demostraron que el cambio de las bacterias a los hongos como un medio de desarrollo natural “nanofábricas”, tiene la ventaja de que el procesamiento y el manejo de la biomasa es mucho más simple (Sastry *et al.*, 2003).

En la última década el método de biosíntesis de NPs metálicas utilizando extractos de plantas ha recibido mucho interés por parte de los investigadores como una

alternativa a los procedimientos químicos y métodos físicos de síntesis de NPs. Gardea-Torresdey *et al.*, fueron los primeros en reportar la formación de NPs de oro y plata dentro de la estructura de plantas vivas (Gardea-Torresdey *et al.*, 2002; Gardea-Torresdey *et al.*, 2003). Sastry *et al.*, (2003), también han logrado la biosíntesis de NPs metálicas a través de extractos de hojas de plantas. Ellos estudiaron la bio-reducción iones de oro (AuCl_4^-) en un caldo de hoja del geranio (Shankar *et al.*, 2003) y neem (Shankar *et al.*, 2004). Asimismo, se logró la biosíntesis de nanotriángulos de oro utilizando hojas de tamarindo y estudiaron su potencial aplicación como sensores de vapor (Ankamwar *et al.*, 2005). Por último, se logró también la síntesis de nanotriángulos y NPs de oro utilizando extractos de *Aloe vera* (Chandran *et al.*, 2006). En la Tabla 1.1, se muestra una relación de extractos de plantas que han sido utilizados para la síntesis de NPs metálicas.

Tabla 1.1 Extractos de plantas utilizados en el proceso de síntesis de NPs metálicas.

Extracto de planta	Metal	Fuente
Lirio acuático (<i>Eichhornia crassipes</i>)	Ag, Fe	Wei <i>et al.</i> , 2017; Silva <i>et al.</i> , 2017; Shokkanna, 2016.
<i>Abutilion indicum</i>	Cu	Ijaz <i>et al.</i> , 2017.
<i>Sesbania grandiflora</i>	Zn, Fe	Rajendran y Sengodan, 2017.
<i>Vetiveria zizanioides</i> <i>Cannabis sativa</i>	Au	Swain <i>et al.</i> , 2016.
Goma arábica (<i>Gum acacia</i>)	Zn	Bajpai <i>et al.</i> , 2016.
<i>Coffea arabica</i>	Ag	Dhand <i>et al.</i> , 2016.
Cáscara de granada (<i>Punica granatum</i>)	Cu	Ghidan <i>et al.</i> , 2016.
Nopal (<i>Opuntia ficus-indica</i>)	Ag-Cu	Rocha-Rocha <i>et al.</i> , 2016.
<i>Mukia maderasapatna</i>	Cu, Pb, Ag, Zn	Saravanan <i>et al.</i> , 2016.
<i>Carica papaya</i>	Ag	Banala <i>et al.</i> , 2015.
<i>Gloriosa superba L.</i>	Cu	Naika <i>et al.</i> , 2015.
Lila india (<i>Azadirachta indica</i>)	Ag, Zn	Kumar <i>et al.</i> , 2015; Velusamy <i>et al.</i> , 2015; Elumalai y Velmurugan, 2015.

Canizal *et al.*, (2001) proponen que la reducción de los iones metálicos a metales cerivalentes se lleva a cabo utilizando a los taninos hidrosolubles, como por ejemplo el ácido gálico, los cuales se descomponen a través del lavado ácido que se le da a la biomasa de las plantas favoreciendo la formación de radicales de compuestos orgánicos donde la carga negativa recae sobre los átomos de carbono, los cuales interactúan con los iones metálicos presentes en las soluciones acuosas hasta reducirlos a su estado cerivalente. La estabilización de las NPs se realiza a través de fuerzas de Van der Waals en donde las moléculas orgánicas quedan adsorbidas en su superficie y proporcionan una barrera estérica de manera que los centros metálicos quedan separados el uno del otro, previniéndose la aglomeración (Trindade *et al.*, 2001).

1.5 LIRIO ACUÁTICO

El lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) es una planta libre flotadora miembro de la familia de las *Pontederiaceae*, que ocupa un lugar sobresaliente entre las comunidades de hidrófilas de agua dulce de las regiones tropicales y subtropicales en el mundo. Los lóbulos de la flor presentan tonalidades que van del color morado al lila y al azul claro, destacando en el lóbulo superior central una mancha de color amarillo (Gopal, 1987). Su distribución en México es sumamente amplia, ya que crece en una gran diversidad de hábitats dulce acuícola localizados desde el nivel del mar hasta los 2250 m de altitud. En las regiones fuera de su área natural de distribución, el lirio acuático es considerado maleza o peste (planta indeseable) por la serie de problemas que acarrea su presencia debido al rápido crecimiento de su población y es una de las plantas invasoras más difíciles de exterminar en áreas inundables manejadas por el hombre en las regiones tropicales y subtropicales en el mundo. En hábitats perturbados sustituye con frecuencia a elementos de la flora nativa. Además, tiene diversos efectos perjudiciales, entre los que se destacan: el entorpecimiento de la navegación por ríos y lagunas, la elevación de los índices de evaporación y el impedimento del paso de la luz al fondo de los estanques, lo que trae como consecuencia la

eliminación de microalgas que son el alimento de crustáceos y peces (Gopal, 1987; Mangas-Ramírez y Elías-Gutiérrez, 2004).

En todo el mundo, el lirio acuático se considera como un problema medioambiental grave debido a que eutrofiza los sistemas acuáticos (Barrett, 1989). Por otro lado, la alta concentración de taninos en el lirio acuático favorece la capacidad de bioacumulación de metales pesados (Zaranyika y Ndapwadza, 1995; Rodríguez *et al.*, 1998; Pinto *et al.*, 2004); sin embargo, esto representa serios problemas para los sistemas en general, ya que cuando la planta se degrada, se lleva a cabo la reincorporación del metal al ecosistema. Además, los metales en las plantas causan toxicidad cuando son consumidas por otros organismos y éstos a su vez pueden incorporar los metales al resto de la cadena trófica (Pinto *et al.*, 2004). De forma general, la retención de los metales por las plantas es regulada por la disponibilidad de los metales pesados en el agua (Cunningham y Ow, 1996; Vassilev *et al.*, 1998; Mejáre y Bülow, 2001; Ramos *et al.*, 2002). La raíz actúa como una primera barrera para la captación y translocación de metales pesados (Robinson *et al.*, 1993), su contenido decrece en el siguiente orden: raíces > tallos > hojas > frutos > semillas (Garty, 2001; Silva *et al.*, 2017).

Adicionalmente, el uso del lirio acuático como alimento (forraje) para animales ha sido objetado debido a que esta planta acuática contiene un alto contenido de taninos (Zaranyika y Ndapwadza, 1995; Rodríguez *et al.*, 1998; Pinto *et al.*, 2004), esta es la molécula orgánica responsable de la biosíntesis de NPs metálicas generadas a través del método de bio-reducción utilizando plantas verdes como agentes reductores (Canizal *et al.*, 2001; Ascencio *et al.*, 2003; Rosano-Ortega *et al.*, 2006).

1.6 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LAS NANOPARTÍCULAS

Actualmente, los materiales a nanoescala han surgido como agentes antimicrobianos alternativos, debido a su elevada área superficial y propiedades físicas únicas (Dhand *et al.*, 2016), presentando un enfoque moderno e innovador

para desarrollar y probar nuevas formulaciones basadas en NPs metálicas con propiedades antimicrobianas que eliminen los mecanismos de resistencia a los antibióticos tradicionales (Padalia *et al.*, 2015; Celis, 2012).

La capacidad microbicida de las NPs está vinculada a la naturaleza del material y a ciertas características intrínsecas de las mismas, tales como sus dimensiones nanométricas (lo cual les permite ser absorbidas con mayor facilidad en microorganismos) y su alta relación área/volumen que les permite un mayor contacto e interacción con dichos microorganismos. Entre las NPs que han demostrado tener propiedades microbicidas se encuentran las de óxido de zinc y cobre (Flores, 2014).

Los metales plata y cobre son tradicionalmente conocidos como materiales antimicrobianos muy eficientes. Se ha considerado que estos metales reaccionan con proteínas combinando el grupo de enzimas -SH (es un grupo sulfhidrilo compuesto por azufre e hidrógeno, también conocido como tiol), dada esta reacción se hace la inactivación de dichas proteínas. Cuando estos metales se preparan en forma de partículas muy pequeñas (nanométricas), se espera que muestren mejores características antimicrobianas debido a su mayor área de superficie específica (Yoon *et al.*, 2007; Esparza, 2015).

La actividad antibacteriana y antifúngicas del uso de NPs de óxido de zinc se ha reportado en investigaciones recientes. Se ha comprobado que entre más pequeño sea el tamaño de la partícula de ZnO, más fuerte es su actividad antimicrobial. La ventaja de usar NPs de óxido de zinc es que éstas inhiben fuertemente la acción de microorganismos patógenos, aun cuando se usen pequeñas concentraciones, puesto que poseen actividades antifúngicas y antibacteriales (Esparza, 2015).

Las CuNPs también han mostrado aplicaciones antibacterianas y antifúngicas. Cuando el cobre está en un estado de oxidación (Cu^{2+}), es altamente efectivo como agente antimicrobicida debido a la interacción con ácidos nucleicos, sitios activos enzimáticos y componentes de la membrana de las células que causan la

enfermedad. Más aún, ha sido demostrado que el cobre tiene la habilidad de reducir el índice de crecimiento de la bacteria *Escherichia coli* en más de 99.99%, ya que le causa daño a las paredes de las células y altera de forma negativa su contenido celular. El cobre ha sido de interés particular porque a diferencia de otros metales antimicrobiales, presenta un espectro amplio de acción contra bacterias y hongos (Esparza, 2015).

1.7 MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS

El mecanismo de acción antimicrobiano para la plata parece interrumpir la producción de energía dentro de la célula de las bacterias. Además, la plata puede oxidar los organismos, interrumpir la respiración celular y afectar las enzimas en su entorno de una manera que hace que sea imposible que los organismos nocivos prosperen. De esta forma, la plata coloidal combate organismos nocivos. La manera en que afecta a los virus es un poco diferente, posiblemente oxidando el virus y reduciendo su función. Se cree que la plata afecta directamente el ADN del organismo, esto puede desactivar el virus, volviéndolo inerte y no dañino (Global Healing Center, 2017).

Existen estudios en los que se muestra que la plata es un potente inhibidor de 650 organismos probados en vivo. La investigación mostró que la plata tuvo éxito incluso contra cepas resistentes. La plata coloidal fue eficaz contra una variedad de virus vivos (Coburn y Dignan, 2012).

Aunque muchos organismos se han adaptado para resistir a los antibióticos, la disrupción celular de la plata sigue siendo eficaz contra compuestos dañinos comunes. Afortunadamente, la plata no es tóxica para los microorganismos y no muestra signos de resistencia a bacterias. Al igual que con cualquier producto que ingiera, cuánto mayor sea la calidad, mejores serán los resultados y menos probable será que padezca efectos secundarios. La argyria, o el azulado de la piel, puede ser resultado de la ingestión de partículas de plata grandes (mayores a 100 nm). Para evitar la argyria, es importante que elija un suplemento de plata con

partículas pequeñas (menores a 100 nm) de plata (Global Healing Center, 2017). Este mecanismo de acción de la plata puede extenderse para las NPs.

El mecanismo íntimo que explica la actividad antibacteriana del cobre no está totalmente claro. Un elemento crucial en la actividad antibacteriana es la capacidad del cobre para ceder y aceptar electrones en un proceso continuo. Algunos estudios sugieren que el cobre, en concentraciones elevadas, tiene un efecto tóxico sobre las bacterias debido a la liberación de radicales de hidroperóxido, los iones de cobre potencialmente podrían sustituir iones esenciales para el metabolismo bacteriano, como el hierro, interfiriendo inicialmente con la función de la membrana celular y luego a nivel del citoplasma alterando la síntesis proteica, ya sea inhibiendo la formación de proteínas o provocando la síntesis de proteínas disfuncionales, alterando la actividad de enzimas esenciales para el metabolismo bacteriano (Rodríguez-Montelongo *et al.*, 1993; Gordon *et al.*, 1994).

Otros estudios sugieren que el cobre puede ejercer un efecto bacteriostático o bactericida, dependiendo de su concentración en el medio (Gordon *et al.*, 1994). Especies de hongos, como la *Candida albicans*, es un patógeno importante en pacientes inmunodeprimidos, su crecimiento es inhibido y luego destruido en contacto con superficies de cobre. Estudios recientes indican que la actividad antifúngica ocurre mediante un proceso complejo denominado "muerte por contacto" en el cual se produce fundamentalmente un daño a la membrana citoplasmática, que se despolariza; no está claro si el daño afecta a las proteínas o los lípidos de la membrana. Esto facilita la entrada de iones de cobre a la célula, amplificando el daño y secundariamente se produce un aumento en el estrés oxidativo, sin apreciar daño aparente del ADN de estas células (Quaranta *et al.*, 2011).

La actividad antibacteriana de las ZnNPs, según proponen en sus estudios (Sawai *et al.*, 1996, 1998), se basa en la generación de peróxido de hidrógeno, como uno de los muchos factores de actividad antibacteriana, mientras Stoimenov *et al.*,

(2002) indican que el mecanismo se basa en la unión de partículas sobre la superficie de la bacteria debido a las fuerzas electrostáticas. Otra teoría indica que las NPs penetran la pared celular de los microorganismos, a través de proteínas portadoras o canales iónicos, y se unen a organelos, interviniendo así en el proceso metabólico como un resultado de la producción de especies reactivas al oxígeno (Sharma *et al.*, 2010).

1.8 INDEXACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

Se sabe que los materiales cristalinos cambian sus propiedades si se cambia o destruye su ordenamiento espacial. Durante su estudio y análisis, se observa que al destruir el ordenamiento, se pierde el brillo natural de la región ordenada, mientras que la región desordenada aparece oscura. De esta manera, es posible ver la región desordenada, y medir su tamaño, aunque esta no difracte.

Los tamaños de la muestra en estudio, son siempre pequeños (en escala nanométrica), pero mantienen las características particulares que tiene en cada muestra sólida, por lo que, lo primero que se toma en cuenta en el análisis es la forma del material cristalizado. Esto es de particular importancia para las NPs al momento de analizar las imágenes correspondientes. Estas consideraciones se aplican también a otras formas de difracción; la ventaja que presenta el análisis por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) es que la información generada por difracción, permite detectar los defectos del cristal. En pocas palabras, determinar la forma de los cristales no es una limitante debido a que se están utilizando electrones de alta energía (Williams y Carter, 2009).

Indexar un patrón de difracción (DP) (o Transformada de Fourier de un material) consiste en averiguar a qué familia de planos corresponde cada punto de dicho patrón. Para ello se deberán conocer o bien las distancias interplanares a partir de las distancias exactas de los puntos debidos a la difracción al haz central, o bien utilizar las distancias relativas y los ángulos entre los puntos de difracción, que son únicos para cada relación de familia de planos y conducen también a un correcto indexado del patrón (Hernández, 2008).

La indexación del DP asocia cada punto o anillo del DP con un plano (hkl), o conjunto de planos {hkl}, en el cristal. De la indexación de los puntos, se puede deducir la orientación del cristal en términos del eje de zona mediante la dirección del haz representado por [UVW], esta dirección es normal al plano del DP en el que se encuentran indexados y antiparalela al haz de electrones (Williams y Carter, 2009).

1.9 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

1.9.1 Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (IR)

La espectroscopía FTIR es una herramienta muy poderosa y bastante conocida. El principio básico de esta técnica se basa en la excitación de grupos moleculares por un haz de luz infrarroja (2.5 a 15 μm ; equivalentes a número de onda comprendido entre 4000 a 650 cm^{-1}), que genera movimientos vibracionales en los enlaces de la molécula (Carr y Williams, 1997; Kowalska *et al.*, 2012). Los movimientos vibracionales se distinguen por el tipo de desplazamiento generado en los enlaces, conociéndose como vibraciones de tensión o flexión. Las tensiones provocan un estiramiento o estrechamiento del enlace y las flexiones generan una deformación del enlace. Si el número de átomos que forman un enlace es de tres o más, los movimientos también pueden presentarse como simétricos y antisimétricos (Gazi *et al.*, 2005; Miller y Dumas, 2010; Bonda *et al.*, 2012). Los movimientos simétricos se caracterizan porque los enlaces se desplazan en direcciones contrarias y los movimientos antisimétricos se caracterizan por un movimiento en la misma dirección o sentido (Gazi *et al.*, 2005; Miller y Dumas, 2010).

Las moléculas en el IR pueden manifestar una serie de bandas de absorción, cada banda corresponde con un movimiento de vibración de un enlace específico dentro de la molécula, a este conjunto de señales se les conoce como la "huella dactilar" del compuesto (Matthäus *et al.*, 2008; Miller y Dumas, 2010; Colagar *et al.*, 2011). La mayoría de los componentes de un enlace químico tienen movimientos vibracionales con frecuencias dentro del infrarrojo medio (4000 a 650

cm⁻¹) (Carr y Williams, 1997; Kowalska *et al.*, 2012), la radiación es absorbida por un enlace cuando la frecuencia vibracional de la onda electromagnética usada es la misma que la del propio enlace, haciendo posible la asignación de picos de absorción a grupos funcionales específicos (Didonna *et al.*, 2011; Bonda *et al.*, 2012). El número de onda absorbida por un enlace vibracional depende de los átomos que forman el enlace, el tipo de enlace formado y el tipo de vibración inter e intramolecular (Miller y Dumas, 2010; Bonda *et al.*, 2012).

1.9 2 Espectroscopía UV-Vis

La espectroscopía UV-Vis está basada en el proceso de absorción de la radiación ultravioleta-visible (radiación con longitud de onda comprendida entre los 160 y 780 nm) por una molécula. La absorción de esta radiación causa la promoción de un electrón a un estado excitado.

La espectroscopía UV-vis es una técnica ampliamente utilizada en el área de los nanomateriales, ya que permite saber si el proceso de síntesis ha concluido con la formación de NPs. Los materiales a nivel nanométrico presentan propiedades ópticas que difieren grandemente de sus contrapartes en bulto (Zhao *et al.*, 2006). Los espectros de absorción óptica de NPs metálicas son dominados por resonancias de plasmón superficial (Pal *et al.*, 2007). La posición y la forma del pico de absorción dependen principalmente de factores como el tamaño, la forma y la polidispersidad de las partículas, el metal, el medio circundante y las sustancias adsorbidas en sus superficies (Mitra y Bhaumik, 2007; Slistan-Grijalva *et al.*, 2008).

1.10 MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN MICROESTRUCTURALES

1.10.1 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés Scanning Electron Microscopy) es una técnica de análisis topográfico, estructural y composicional, la cual se ha usado extensamente en el estudio de tópicos tales

como semiconductores (Faure *et al.*, 2011; Henderson, 2011; Wang *et al.*, 2011; Mahajan y Mhaske, 2012; Murcia-López *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2012; Sangchay *et al.*, 2012), NPs (Ubonchonlakate *et al.*, 2012), modificación de productos comerciales (Liu *et al.*, 2012), catálisis heterogénea (Narayana *et al.*, 1998; Oh *et al.*, 2010; Palacio *et al.*, 2012), dispositivos de juntura p-n (Shifu *et al.*, 2008), películas delgadas (Lee *et al.*, 2006), física de nanocomposiciones (Zhou *et al.*, 2011), fotoelectroquímica (Juskenas *et al.*, 2012), dadas sus posibilidades de resolución, magnificación y versatilidad de variantes que permite que sea aplicada a diversidad de muestras, ambientes y necesidades experimentales (procesos térmicos, corrosivos, etc.).

En términos generales, un equipo de SEM es capaz de tomar una “imagen” de la muestra aunque realmente lo que se detecta es la respuesta del material al impacto de un haz de electrones (electrones llamados primarios), en vez de registrar fotones propiamente dichos (como en la microscopía óptica). Al ser impactada por el haz de electrones de alta energía, la muestra produce una serie de señales que son registradas en los diferentes detectores del equipo, en donde cada una de dichas señales ofrece independientemente información acerca de la topografía, composición y hasta conductividad eléctrica de la muestra. Por supuesto, para adquirir la “imagen” se hace mover el haz en el plano xy (con sistemas ópticos, antes de impactar la muestra) de forma que recorra el área deseada o planificada. La resolución que puede alcanzarse, es decir, la capacidad de distinguir en la imagen entre dos puntos diferentes pero próximos entre sí en la superficie del material, puede ser tan alta como 2 nm (Vilà *et al.*, 2010).

1.10.2 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

La microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés Transmission Electron Microscopy) es una de las técnicas más utilizadas en la caracterización de NPs hasta la escala de Angstroms ($1 \text{ \AA} = 1 \times 10^{-10} \text{ m}$) proporcionando información del tamaño, forma y composición de los nanomateriales. La TEM es la técnica más utilizada para el estudio de elementos cuyas dimensiones se encuentran en el rango de 1-100 nm (Boyd y Yao, 2012).

La técnica consiste en irradiar con electrones una muestra de no más de 100 nm de grosor, para que esta sea transparente a los electrones, estos últimos son acelerados con una energía del orden de 100 keV o superior (Figura 1.4). Parte de estos electrones son transmitidos, otra parte son dispersados y otra parte da lugar a interacciones que producen distintos fenómenos como emisión de luz, electrones secundarios entre otros. La TEM emplea la transmisión/dispersión de los electrones para formar imágenes, la difracción de los electrones para obtener información acerca de la estructura cristalina y la emisión de rayos X característicos para conocer la composición elemental de la muestra (Williams y Carter, 2009).

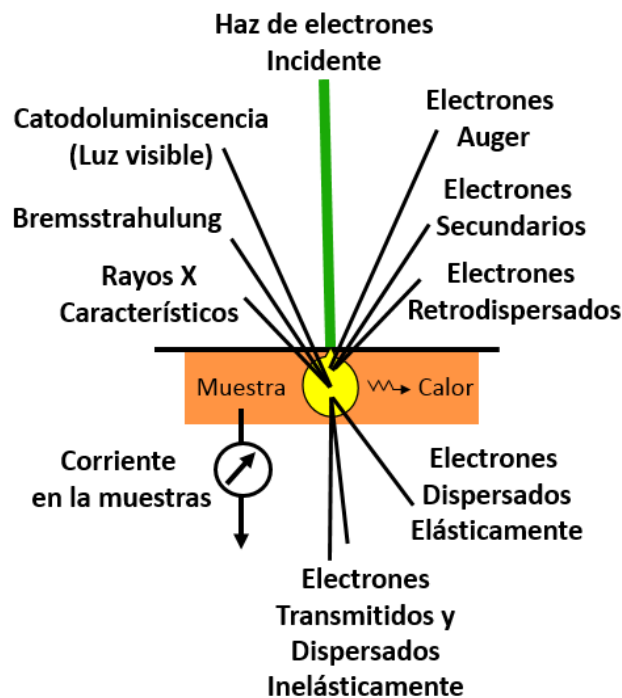


Figura 1.4 Esquema de la interacción del haz de electrones con la muestra (Williams y Carter, 2009).

La TEM combina un modo de imagen para lograr la caracterización morfológica (forma, tamaño, distribución, rugosidad), estructural (cristalina, cuasi cristalina o amorfa) y un modo analítico para la información química (análisis elemental mediante espectroscopia por dispersión de energía de rayos X, EDS). El poder del TEM reside en su capacidad para determinar la microestructura, la estructura y la

composición química de las fases en un solo instrumento en una ubicación de la muestra particular (Krishnamachari *et al.*, 2011; Boyd y Yao, 2012).

Un microscopio electrónico de transmisión proporciona dos tipos de información complementarias:

- a) Obtención de la imagen directa del material por análisis de los electrones transmitidos no dispersados.
- b) Obtención del llamado patrón de difracción a partir del análisis de la distribución espacial de los electrones dispersados elásticamente. A partir de este patrón se puede obtener una gran cantidad de información acerca de la disposición de los átomos en el sólido (Domínguez, 2011).

1.11 OBJETIVOS

1.11.1 *Objetivo general*

Sintetizar y caracterizar nanopartículas de zinc y cobre obtenidas por el método de bio-reducción y probar su efecto microbicida en consorcio de la bacteria *Gram*-negativo.

1.11.2 *Objetivos específicos*

- a) Muestrear y acondicionar el lirio acuático en la Laguna de Chignahuapan Almoloya del Rio.
- b) Sintetizar las nanopartículas de zinc y cobre variando el pH (4, 7, 12).
- c) Caracterizar las nanopartículas de zinc y cobre por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), espectroscopía UV-Vis, microscopía electrónica de barrido y microscopía electrónica de transmisión.
- d) Realizar pruebas de su actividad microbicida utilizando *Escherichia coli* como indicador.

Los valores de pH elegidos para realizar la síntesis de ZnNPs y CuNPs se eligieron en función de los resultados obtenidos por Silva *et al.*, (2017).

1.11.3 *Hipótesis*

El efecto microbicida de las nanopartículas de zinc y cobre es similar al de las de plata.

2. METODOLOGÍA

A continuación se muestra el diagrama general del método experimental durante la realización de este proyecto (Figura 2.1).

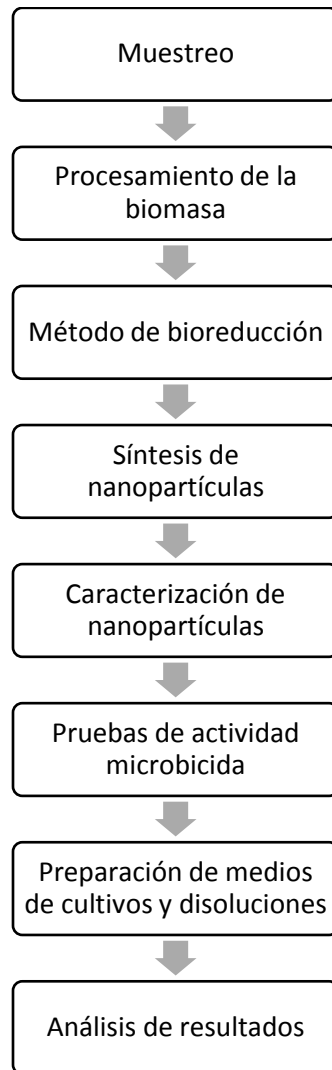


Figura 2.1 Diagrama general del método experimental.

2.1 REACTIVOS

En la Tabla 2.1 se enlistan todos los reactivos utilizados durante la realización de este proyecto:

Tabla 2.1 Reactivos.

REACTIVO	FÓRMULA	MARCA
Ácido clorhídrico ACS reactivo, 37%	HCl	Sigma-Aldrich
Nitrato de zinc hexahidratado ACS reactivo, ≥98%	ZnN ₂ O ₆ •6H ₂ O	Sigma-Aldrich
Nitrato de cobre trihidratado ACS reactivo, ≥98%	CuN ₂ O ₆ •3H ₂ O	Sigma-Aldrich
Solución Buffer pH 4 (Ácido cítrico/ Hidróxido de sodio/ Cloruro de sodio)	(C ₆ H ₈ O ₇ / NaOH/ NaCl)	Sigma-Aldrich
Solución Buffer pH 7 (Fosfato de potasio/ Fosfato disódico)	(K ₂ HPO ₄ / Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich
Solución Buffer pH 12 (Fosfato disódico/ Hidróxido de sodio)	(Na ₂ HPO ₄ / NaOH)	Sigma-Aldrich
Fosfato potásico dibásico, USP	K ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich
Cloruro de magnesio 6-hidrato, cristal, USP - FCC	MgCl ₂ •6H ₂ O	J. T. Baker
Hidróxido de sodio grado reactivo anhidro, ≥98%	NaOH	Sigma-Aldrich
Tripteina Soya Agar (TSA) para microbiología		Bioxon
Caldo Tripton de Soya (TSB) para microbiología		Bioxon

2.2 MUESTREO DEL LIRIO ACUÁTICO Y PROCESAMIENTO

Se colectaron aproximadamente 2 m² de individuos de lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) de la laguna Chignahuapan, ubicada en el municipio de Almoloya del Río en el Estado de México. Los ejemplares fueron colocados en bolsas de plástico y se transportaron inmediatamente al laboratorio para su procesamiento. El muestreo fue realizado de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NMX-AA-014-1980: Muestreo en Cuerpos Receptores.

Del lirio acuático colectado, se seleccionaron las hojas debido a que esta parte de la planta es la que tiene una mayor cantidad de taninos que son los responsables de la reducción metálica del zinc y cobre (Silva *et al.*, 2017). Posteriormente fueron lavadas con agua corriente hasta que el agua de enjuague presentó un color claro. Las hojas de lirio se dejaron escurrir y secar a temperatura ambiente durante 30 días. Posteriormente, se colocaron en un horno para su secado a 60 °C durante 3 h.

Los trozos secos se trituraron y se pulverizaron en un mortero de ágata hasta obtener un polvo fino que se tamizó utilizando una malla 100 µm. A partir de este tratamiento las hojas del lirio lavadas y tamizadas, se llamaron biomasa.

El acondicionamiento de la biomasa, se realizó conforme a lo descrito por Rosano-Ortega *et al.*, (2006) de la siguiente forma: la biomasa en polvo, se lavó 2 veces

con una solución de HCl 0.01 N, se dejó reposar 30 min entre cada lavado. La biomasa se filtró utilizando una tela de algodón y se sometió a una deshidratación en un horno de secado a 45 °C durante 48 h.

2.3 CARACTERIZACIÓN DE LA BIOMASA

2.3.1 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

Se analizaron por espectroscopía FTIR las hojas de *Eichhornia crassipes* antes y después del proceso de biosíntesis de ZnNPs, CuNPs y Cu/Zn NPs, en un equipo Varian 640-IR con ATR de diamante, generando los espectros correspondientes en el intervalo de 4000 a 500 cm^{-1} , con una resolución de 4 cm^{-1} y 16 barridos.

2.4 BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ZINC (ZnNPs) Y COBRE (CuNPs)

La biosíntesis de ZnNPs y CuNPs se realizó por el método de la bioreducción de acuerdo a lo propuesto por Canizal *et al.* (2001), según se describe en la Figura 2.2.

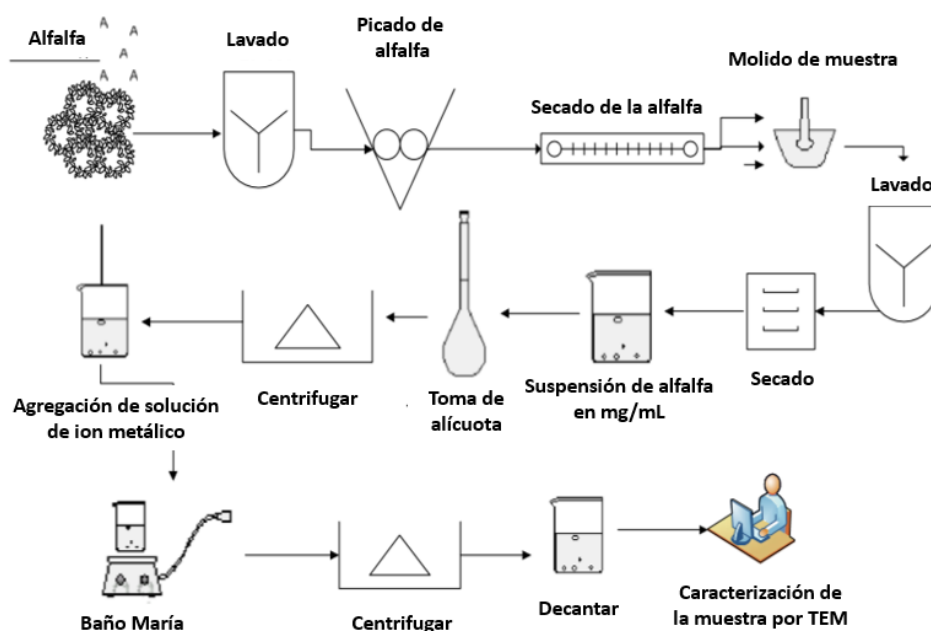


Figura 2.2 Esquema del proceso de bioreducción de alfalfa (Canizal *et al.*, 2001).

Una vez tratada la biomasa se utilizó para la síntesis de las NPs, se pesaron 0.125 g de la biomasa lavada de hojas de *Eichhornia crassipes*, y se colocaron en un tubo de polietileno de 50 mL con tapa roscada. Inmediatamente, se adicionaron 25 mL de agua deionizada y los tubos se agitaron en un baño ultrasónico (SB-5200DTN) por 15 min; 5 min después, se centrifugaron a 3900 rpm durante 35 min. A continuación, se adicionaron 5 mL de solución buffer (pH 4, 7, 12) en cada uno de los tubos, y éstos se agitaron 15 min más en el baño ultrasónico; 5 min después, las muestras se centrifugaron a 3900 rpm durante 35 min. Finalmente, a cada muestra se le adicionaron 25 mL de solución metálica de $ZnN_2O_6 \cdot 6H_2O$ o $CuN_2O_6 \cdot 3H_2O$ a 0.1 M y se agitaron de nuevo en el baño ultrasónico por 15 min más; las muestras reposaron 5 min y se centrifugaron nuevamente 35 min a 3900 rpm. La biomasa fue separada del sobrenadante por filtración para analizarla por espectroscopia FTIR y el sobrenadante se analizó por espectroscopia UV-Vis.

2.5 BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS BIMETÁLICAS (Cu/Zn NPs)

Para realizar la biosíntesis de las NPs bimetálicas se siguió el mismo procedimiento descrito en la sección anterior, a excepción de la solución metálica utilizada en cada muestra, se adicionaron 25 mL de una solución compuesta (1:1 en volumen) de soluciones $CuN_2O_6 \cdot 3H_2O$ y $ZnN_2O_6 \cdot 6H_2O$ a 0.1 M. Finalmente se continuó con el mismo procedimiento.

2.6 CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

2.6.1 Espectroscopía UV-Vis

Para detectar la presencia del plasmón de superficie de las NPs metálicas en solución, los espectros de absorción óptica de las soluciones de ZnNPs, CuNPs y Cu/Zn NPs se obtuvieron al realizar un barrido en un intervalo de longitud de onda de 200-1100 nm, usando un espectrofotómetro UV-Visible Thermo Scientific modelo Evolution Array. El blanco utilizado fue agua deionizada.

2.6.2 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La caracterización de las NPs se realizó con un análisis SEM para obtener una vista general de la formación de las NPs antes de caracterizarlas por TEM. Para el análisis por esta técnica se colocó una gota de la suspensión de ZnNPs, CuNPs y Cu/Zn NPs en una rejilla de cobre de 300 mesh, recubierta con carbón. La muestra se secó en alto vacío. Para el análisis por SEM, se utilizó el equipo JEOL modelo JSM-7800FEG con resolución de 0.7 nm, del Instituto de Física de la UNAM.

2.6.3 Espectroscopía por Dispersión de Energía de Rayos X (EDS)

La composición elemental de las NPs se llevó a cabo mediante el análisis por EDS, utilizando un detector de rayos x marca Oxford con una ventana de 50 mm X-max, la cual permitió confirmar la presencia elemental de los metales en las NPs analizadas.

2.6.4 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Para el análisis por TEM y HRTEM, se utilizó el equipo JEM-2010FEG con una resolución espacial punto a punto de 0.19 nm, en el Instituto de Física de la UNAM. Las muestras que se analizaron por esta técnica se prepararon como se describió en la sección 2.6.2.

2.6.4.1 Indexación de nanopartículas

La indexación de NPs se realizó utilizando las micrografías obtenidas del TEM. Estas imágenes se analizaron en el software Digital Micrograph, en el cual se aplicó en cada una de ellas la transformada de Fourier con el fin de obtener las distancias interplanares que se encuentran en cada una de las NPs, así como identificar la estructura cristalográfica de los planos mediante Powder Diffraction File (PDF) (ICDD, 2017).

2.7 PRUEBA DE ACTIVIDAD MICROBICIDA

Las NPs sintetizadas con lirio acuático fueron utilizadas para evaluar la actividad antimicrobiana utilizando una cepa de *E. coli* ATCC 25922, la cual ha sido ampliamente utilizada como modelo en experimentos bactericidas (Jayandran *et al.*, 2016; Vanathi *et al.*, 2016; Zyoud *et al.*, 2016; Ijaz *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2017). Para el presente trabajo se utilizó una cepa de *E. coli* ATCC 25922 con las características mostradas en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2 Descripción de la cepa de *E. coli* ATCC 25922.

Nombre	<i>Escherichia coli</i> (Migula) Castellani y Chalmers.
Propiedades antigénicas	Al serotipo O6, Biotipo 1.
Descripción en agar nutritivo	Colonias pequeñas, de bordes enteros, circulares, brillantes, de aspecto húmedo.
Descripción en agar MacConkey	Colonias lactosa positivas.
Medio de siembra	Agar/Caldo de Soya Trypticaseína.
Condiciones de crecimiento	37 °C y en condiciones aeróbicas.
Gram	Bacilos Gram negativos.
Familia	<i>Enterobacteriaceae</i> .
Patogenicidad	No provoca riesgos al ser humano.

Fuente: ATCC, 2016.

Las etapas de la prueba se describen a continuación:

2.7.1 Cuenta de UFC/mL en cepas bacterianas

Se utilizó el método de cuenta en placa para determinar el número de bacterias viables (unidades formadoras de colonias, UFC/mL) de acuerdo a lo indicado en la NOM-092-SSA1-1994. El experimento se realizó por duplicado de acuerdo a la siguiente metodología:

2.7.1.1 Siembra de cepas de control

Por separado se sembró en TSA (Agar Soya Tryptecaseína) por estría una asada de la cepa *E.coli* y las placas se incubaron de 18 a 24 h a 36 ± 1 °C. Posteriormente, se tomó una asada de las cepas y se colocó en TSB (Caldo Triptona de Soya) estéril contenido en un tubo de ensaye, el cual nuevamente se incubo de 18 a 24 h a 36 ± 1 °C.

2.7.1.2 Preparación del inóculo

Una vez contando con la suspensión bacteriana, se efectuaron diluciones, tomando un mililitro de la suspensión incubada en TSB, el cual se transfirió a un tubo de ensaye con 9 mL de disolución amortiguadora de fosfato-cloruro de magnesio estéril (esta dilución corresponde a la 1×10^{-1} UFC/mL) hasta llegar a la dilución de 1×10^{-7} UFC/mL (es donde se obtienen las concentraciones más utilizadas de *E.coli* para pruebas de actividad microbica) (Pal *et al.*, 2007; Yasin *et al.*, 2013; Banala *et al.*, 2015). Entre cada dilución, las suspensiones fueron homogenizadas en un agitador de tubos vortex. El inóculo recomendado para el estudio de la actividad antimicrobiana debe estar mínimo en 10^{-6} UFC/mL.

2.7.1.3 Siembra del inóculo

Se tomó 1 mL de las diluciones 10^{-7} (*E.coli*) y se colocó en cajas petri estériles. Enseguida se adicionó el medio de cultivo (TSA) homogenizado perfectamente y una vez solidificado el medio, las cajas se incubaron de 18 a 24 h a 36 ± 1 °C. Al término de este período, se contó el número de colonias y se calculó la concentración de las suspensiones microbianas.

2.7.2 Determinación de UFC/mL con efecto microbica cuantificable

Para poder determinar la dilución bacteriana en que el efecto microbica de las NPs en estudio es detectable, se prepararon soluciones con concentraciones de 10, 100, 1,000, 10,000 y 29,749 mg/L para ZnNPs, de 10, 100, 1,000, 10,000 y 24,160 mg/L para CuNPs, y de 10, 100, 1,000, 5,000 y 6,448 mg/L para las Cu/Zn NPs. Posteriormente, se preparó el inóculo de la bacteria de acuerdo a la sección 2.7.1.1, en diluciones 10^{-6} adicionando un mL de suspensión de ZnNPs, CuNPs y Cu/Zn NPs probando diferentes concentraciones.

2.7.3 Mínima concentración bactericida (MIB)

Estas concentraciones se definieron como la mínima cantidad de ZnNPs, CuNPs y Cu/Zn NPs en mg/L requerida para inhibir el 100% de los microorganismos presentes en la cuenta inicial del inóculo y se utilizó el método de cuenta en placa.

Se colocó 1 mL del inóculo determinado en la sección 2.7.2 en cajas Petri y se le adicionó 1 mL de las soluciones de ZnNPs, CuNPs y Cu/Zn NPs preparadas en la sección 2.7.3 probando concentraciones en el rango de 10 a 29,749 mg/L para ZnNPs, de 10 a 100 mg/L para CuNPs, y de 10 a 6,448 mg/L para Cu/Zn NPs, dejando reposar 3 h antes de adicionar el medio de cultivo. Las placas se incubaron de 18 a 24 h a 36 ± 1 °C y se realizó la cuenta en placa.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 CARACTERIZACIÓN DE LA BIOMASA

3.1.1 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

El análisis FTIR se llevó a cabo para identificar las vibraciones causadas por los compuestos que presentan las hojas de *Eichhornia crassipes*. En el espectro representado en la Figura 3.1, se muestra las bandas características de la biomasa. Se ha reportado en la literatura que el lavado ácido no influye en la formación de AgNPs (Dong *et al*, 2014; Abdelmonem y Amin, 2014; Soomro *et al.*, 2014); sin embargo, existen pocos reportes de esa influencia en las NPs sintetizadas para este trabajo (Zn/Cu) (Saravanan *et al.*, 2016; Ijaz *et al.*, 2017).

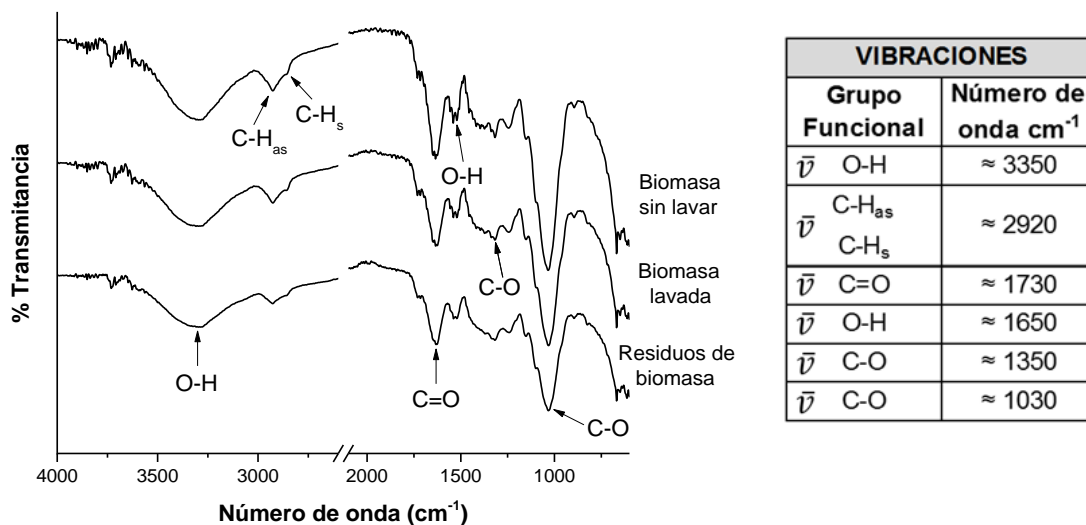


Figura 3.1 FTIR de la biomasa.

Las vibraciones localizadas alrededor de 3350 cm^{-1} y 2920 cm^{-1} se atribuyen a las vibraciones de tensión provocadas por los grupos OH de las moléculas lignocelulósicas y moléculas de agua enlazadas (Atehortua y Gartner, 2013) y compuestos fenólicos (taninos). Las bandas de absorción a 1730 cm^{-1} se

encuentran asociadas a las vibraciones por tensión asimétrica del enlace C=O por la presencia de taninos hidrolizables (Tondi y Petutschnigg, 2015).

La banda observada aproximadamente a 1650 cm^{-1} es característica de la presencia de moléculas de agua provocada por la vibración de tensión del grupo O-H (Carja *et al.*, 2010; Moradi *et al.*, 2012). Se observan las vibraciones de tensión asignadas al grupo funcional C-O localizadas en 1030 cm^{-1} y 1350 cm^{-1} que indican la presencia de ácido carboxílico y grupos amino, atribuidos a la presencia de los péptidos en la planta (Philip, 2009; Thombre *et al.*, 2014; Ghidan *et al.*, 2016).

La principal diferencia en la biomasa antes y después del lavado es la disminución de algunas bandas de vibración, se observa de manera muy clara sobre las bandas que se localizan en 1650 y 1730 cm^{-1} que están asociadas a los grupos O-H y grupos carboxílicos, los cuales participan en el metabolismo primario y secundario de plantas y de otros organismos, y los cuales se relacionan a los compuestos fenólicos o taninos, quienes son responsables de la reducción de las especies metálicas. La disminución de la intensidad en las bandas puede deberse a la pérdida de grupos tanino después del lavado ácido, el cual puede causar rompimiento de algunos de los enlaces y esto se observa como una disminución en la intensidad de las bandas.

El lirio acuático tiene ricas fuentes de compuestos fenólicos, terpenoides y alcaloides que ayudan en la síntesis de NPs mediante la reducción de iones metálicos y su posterior estabilización (Kiruba *et al.*, 2012; Makarov *et al.*, 2014; Islam *et al.*, 2015). También se observa una disminución de intensidad en las bandas asociadas a los ácidos carboxílicos y grupos amino en 1030 y 1350 cm^{-1} (Ghidan *et al.*, 2016). La elevada cantidad de proteínas tiene un rol clave en la síntesis y estabilización de las NPs, que se lleva a cabo mediante la adsorción de residuos proteicos en su superficie que evitan la aglomeración entre partículas (Thombre *et al.*, 2014; Devi y Joshi, 2015).

En referencia al espectro obtenido de la biomasa después de sintetizar las ZnNPs y CuNPs se observa una nueva disminución en la banda que corresponde al grupo carbonilo, esta molécula se encuentra presente en los taninos hidrosolubles que son los responsables directos de la reducción de iones metálicos a metales cerivalentes (NPs). Una parte de estos taninos se perdieron durante el lavado ácido que se le dio a la biomasa y algunos otros se descomponen o se rompen formando radicales de compuestos orgánicos donde la carga negativa recae sobre los átomos de carbono quienes interactúan con los iones metálicos presentes en las soluciones acuosas hasta reducirlos a su estado cerivalente. La estabilización de las NPs se realiza a través de fuerzas de Van der Waals en donde las moléculas orgánicas quedan adsorbidas sobre la superficie de las NPs y proporcionan una barrera estérica de manera que los centros metálicos quedan separados uno del otro previniendo la aglomeración.

3.2 NANOPARTÍCULAS DE ZINC (ZnNPs)

3.2.1 Espectroscopía UV-Vis

Para la síntesis de ZnNPs, se utilizaron 3 valores de pH (4, 7, 12) para ajustar la solución de $ZnN_2O_6 \cdot 6H_2O$ con la biomasa. Una de las formas para identificar la formación de NPs metálicas es el cambio de color en la solución, el cual no se hizo patente para estas NPs, el color original de la solución no cambió. Sin embargo, la obtención de las ZnNPs fue confirmada utilizando espectroscopía UV-Vis, mediante la detección del pico común del plasmón de superficie. La Figura 3.2 muestra los picos correspondientes al plasmón para las ZnNPs (Ramesh *et al.*, 2015; Elumalai y Velmurugan, 2015).

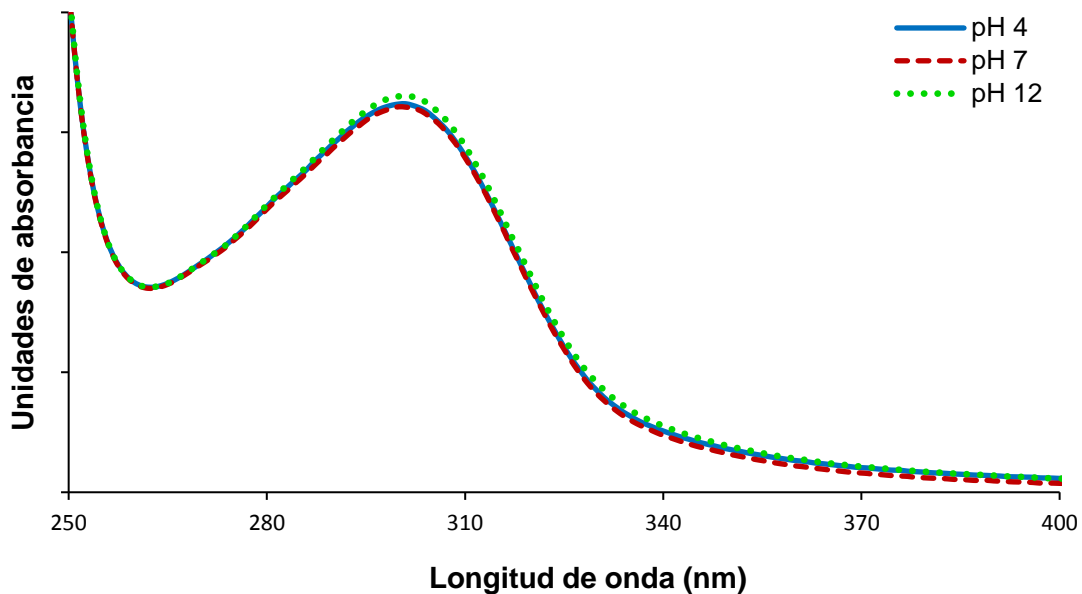


Figura 3.2 Espectro UV-Vis de ZnNPs producidas a solución buffer pH 4, 7 y 12.

La formación de ZnNPs se confirma para los tres valores de pH 4, 7 y 12, por la detección del plasmón de superficie a 300 nm aproximadamente. Se observa que la intensidad del plasmón para los tres valores de pH utilizados es muy similar, solo el pico que corresponde a pH 12 es ligeramente más intenso que los otros dos. En la literatura la concentración se relaciona con la absorbancia en el pico máximo de absorción, la homogeneidad de tamaño con el ancho del pico y el tamaño con la posición del pico, desplazándose hacia longitudes de onda menores cuando el tamaño de la partícula decrece (Canal, 2016), entre más grande sean estas, más intenso es el pico del plasmón, este resultado se confirmó en las NPs a pH 12 cuyo tamaño es ligeramente mayor que para los otros dos pH (Wang y Lin, 2006).

3.2.2 SEM

Como parte de la caracterización de las NPs se realizó un análisis SEM para obtener una vista general de la formación de las NPs antes de caracterizarlas por TEM. A continuación se presentan los resultados obtenidos:

a) Zn pH 4

En la Figura 3.3 se observan las micrografías de las ZnNPs obtenidas a pH 4 y con un aumento de 20,000X en el modo transmisión (STEM) en campo claro. Las NPs son los puntos brillantes con tamaño menor a 100 nm (0.1 μm). Estas vistas generales confirman la formación de las ZnNPs.

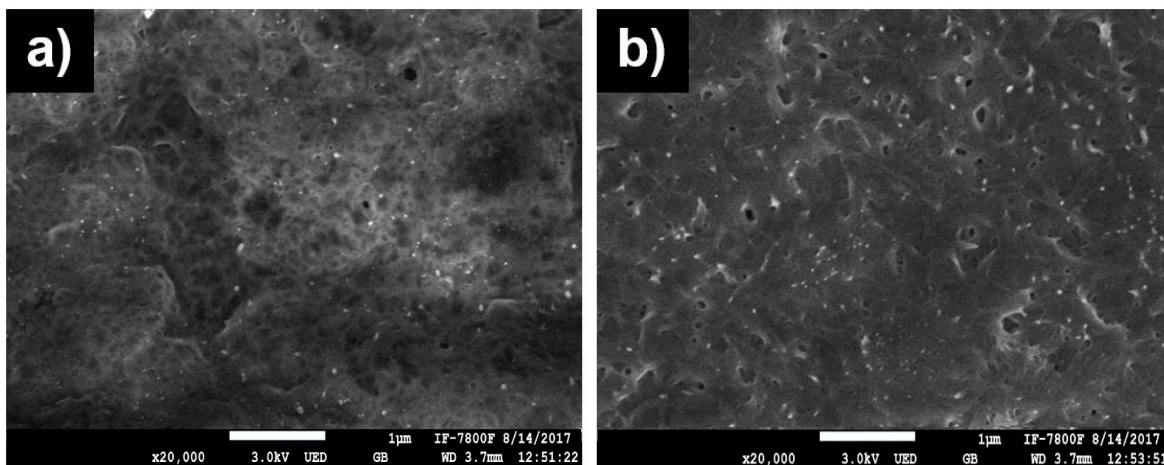


Figura 3.3 Micrografías de ZnNPs a pH 4: a) vista general, b) formación de NPs.

Una de la principales aportaciones del SEM es la morfología que los materiales presentan, en el caso de estas NPs por su tamaño no es posible describir una morfología asociadas a ellas, esta se determinó por TEM; sin embargo, a esta magnificación se puede observar que no se formaron aglomerados de NPs de tamaño detectable por SEM, lo cual es bueno porque se presentan partículas independientes que permitió conocer el intervalo de tamaño en que se encuentran.

La segunda etapa de los análisis por SEM es confirmar mediante el análisis por EDS la composición elemental de las NPs. Los resultados de este análisis se presentan en la Figura 3.4, en el que se observa que el Zn es uno de los elementos principales de la composición y se asocia a su presencia en tamaño cerovalente, mientras que el Na, Cl y O detectados corresponden a restos de la biomasa.

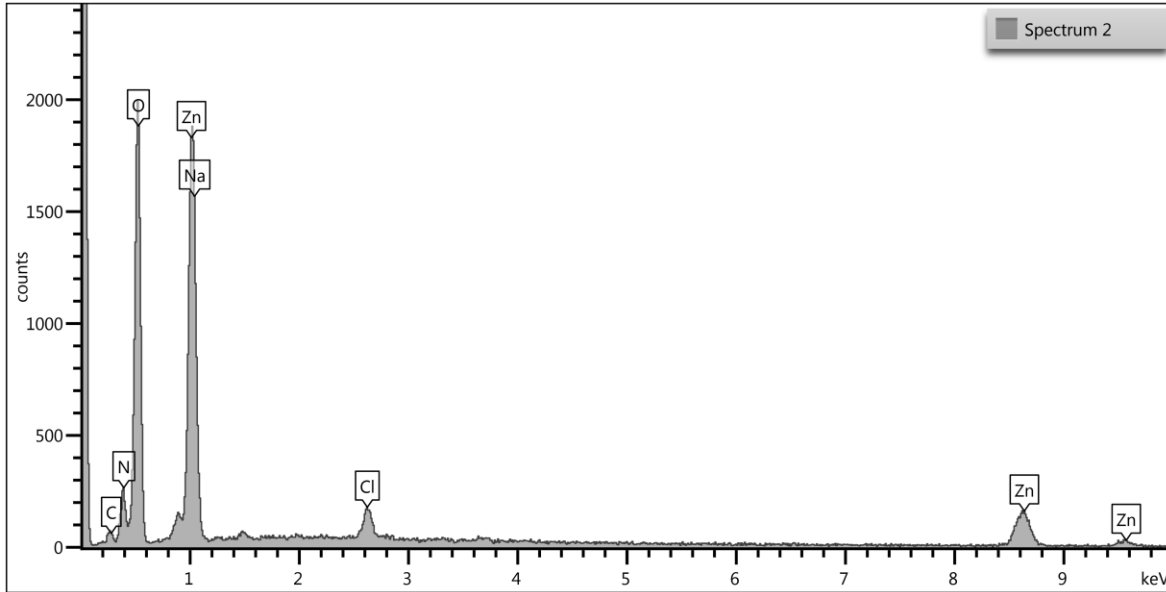


Figura 3.4 Análisis EDS de ZnNPs sintetizadas a pH 4.

b) Zn pH 7

En la Figura 3.5 se observan las micrografías de las ZnNPs obtenidas a pH 7 y con un aumento de 5,000X y 10,000X en el modo transmisión (STEM) en campo claro. Las NPs son los puntos brillantes que se observan con un tamaño menor.

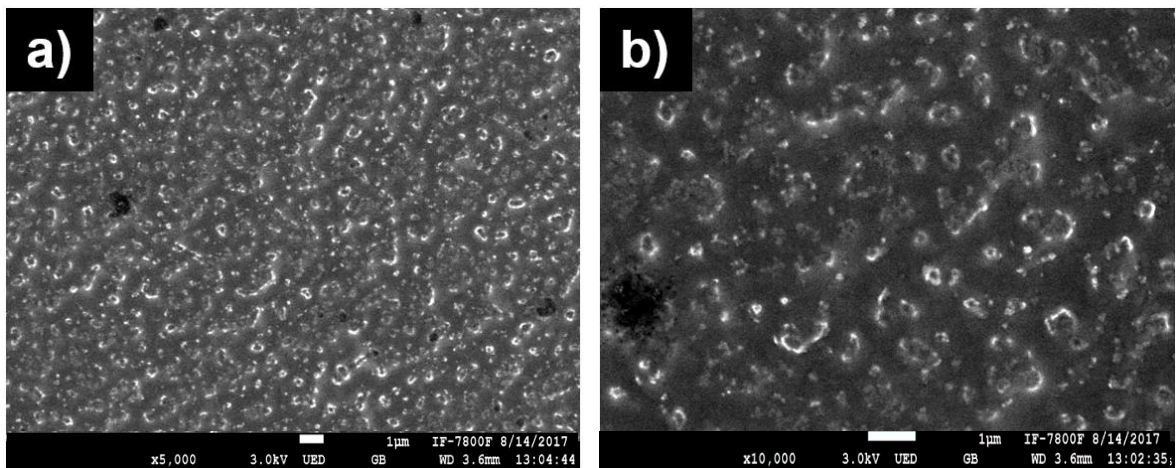


Figura 3.5 Micrografías de ZnNPs a pH 7: a) vista general, b) formación de NPs.

En referencia a la morfología tampoco es posible asociar para estas NPs una topografía definida, pero el análisis EDS que se presenta en la Figura 3.6, confirma que el principal elemento obtenido de esta vista general corresponde al

Zn, el resto de los elementos detectados corresponden a residuos de la biomasa, la cinta de carbón, restos de buffer y del reactivo utilizado ($\text{ZnN}_2\text{O}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).

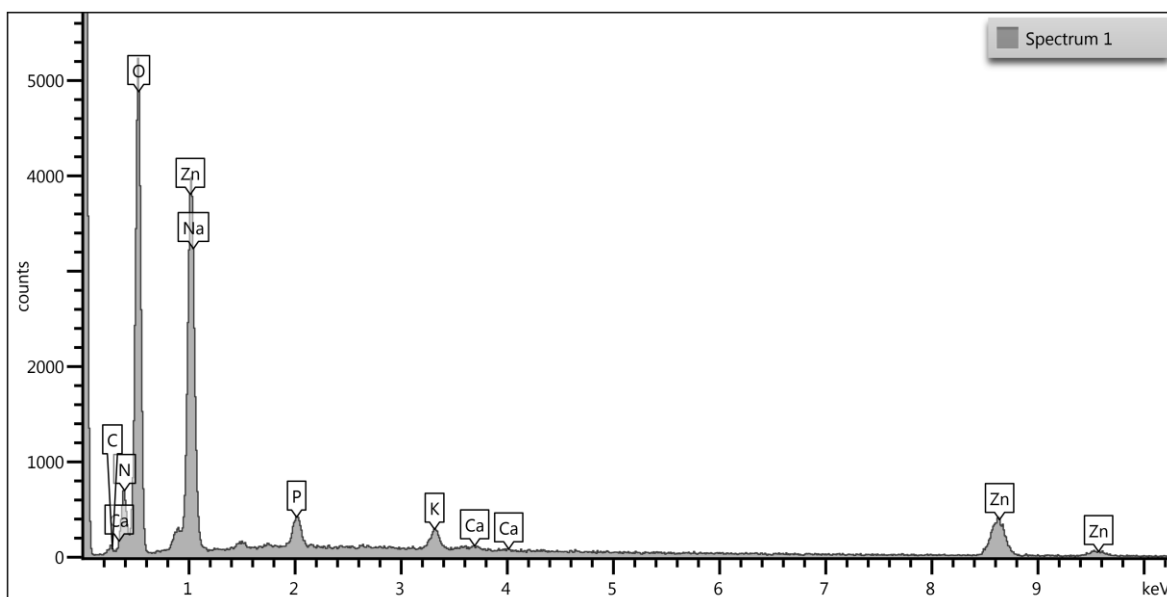


Figura 3.6 Análisis EDS de ZnNPs sintetizadas a pH 7.

c) Zn pH 12

Los resultados para las NPs obtenidas a pH 12 se presentan en la Figura 3.7, las micrografías presentan un aumento de 2,000X y 10,000X en el modo transmisión (STEM) en campo claro. Para estas NPs se observa una aglomeración de ZnNPs; a diferencia de los otros dos pH en los que no se observó la formación de una topografía similar, ésta se asocia al valor del buffer utilizado el cual tiene un alto contenido de sales lo que pudo causar la formación de cúmulos de partículas mayor a $1 \mu\text{m}$ (Figura 3.7b).

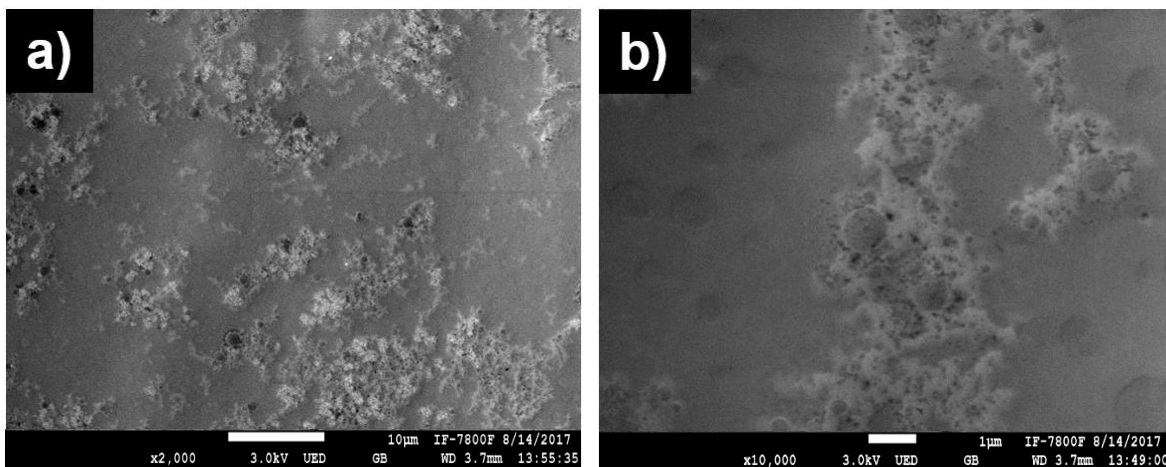


Figura 3.7 Micrografías de ZnNPs a pH 12: a) vista general, b) morfología en forma de costra.

Respecto al análisis EDS realizado para estas NPs (Figura 3.8), se verificó la composición de zinc en las partículas obtenidas que fue consistente con la determinación para los pH 4 y 7. El resto de los elementos corresponden a residuos de buffer, reactivo ($\text{ZnN}_2\text{O}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) y biomasa (Li *et al.*, 2016), ya que se está analizando la suspensión de ZnNPs en donde fueron adicionados estos reactivos en diferentes momentos de la síntesis.

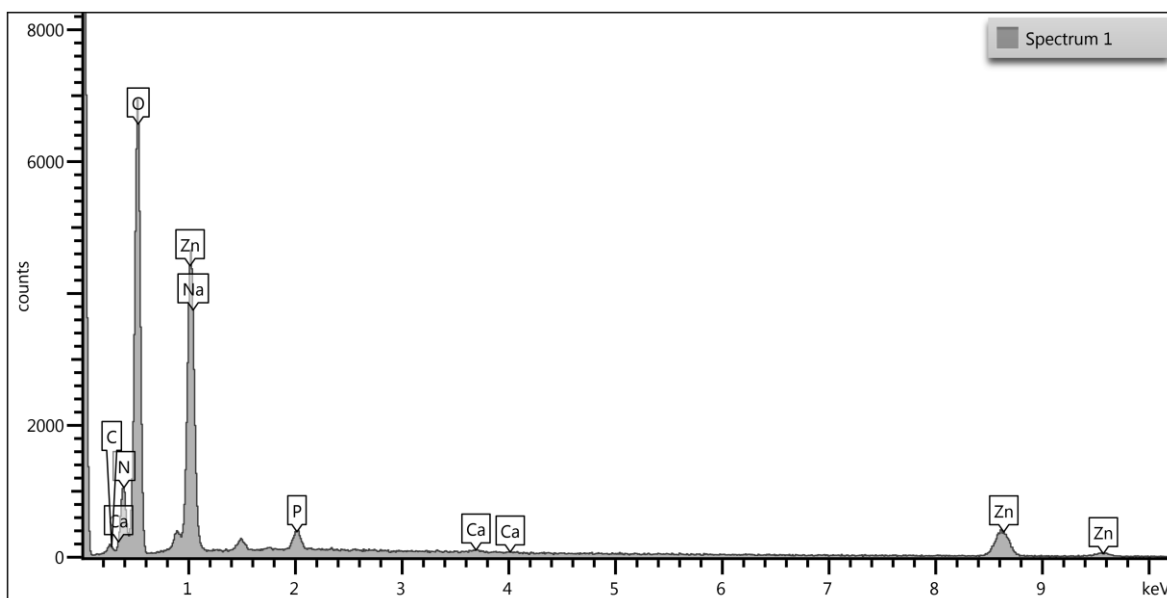


Figura 3.8 Análisis EDS de ZnNPs sintetizadas a pH 12.

3.2.3 TEM

Las NPs se analizaron por TEM para determinar su tamaño, composición y estructura la cual se determinó a través de la indexación de las NPs observadas.

a) ZnNPs pH 4

Las micrografías de las ZnNPs sintetizadas a pH 4 se presentan en la Figura 3.9, en donde se observan NPs con tamaño entre 5 y 10 nm, asimismo no se detecta la formación de aglomerados o agregados de partículas a este valor de pH. En todas las NPs (Fig. 3.9a, b y c) se observa la red cristalina característica de las NPs metálicas.

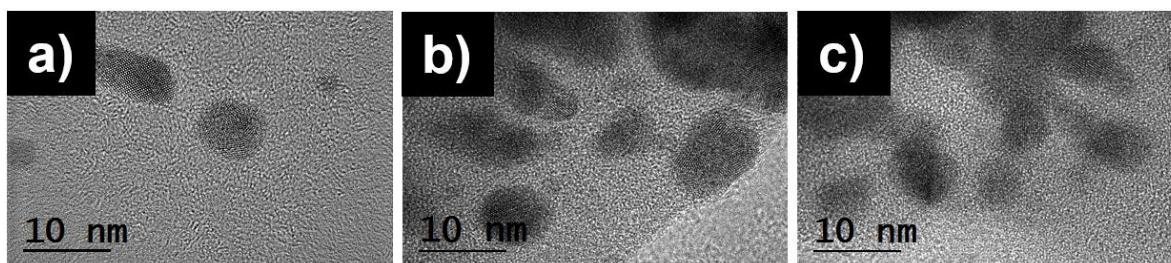


Figura 3.9 Micrografías obtenidas por HRTEM de ZnNPs a pH 4.

b) ZnNPs pH 7

El efecto de utilizar un buffer neutro en la síntesis de NPs se observa en las micrografías de la Figura 3.10, a diferencia del pH 4 estas NPs no se formaron de manera independiente por el contrario están formando agregados de partículas en los que se observa la estructura cristalina característica de los elementos metálicos pero su tamaño no se distingue con facilidad debido a que no se observan partículas independientes. En las tres micrografías se aprecian con dificultad las NPs cuyo tamaño oscila entre 2 y 5 nm.

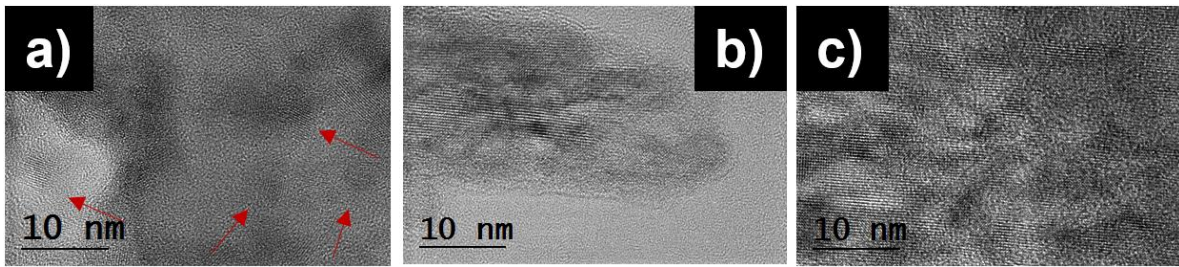


Figura 3.10 Micrografía obtenidas por HRTEM de ZnNPs a pH 7.

c) ZnNPs pH 12

Al sintetizar las ZnNPs a un pH 12 se observa de nueva cuenta la formación de partículas independientes sin agregados tal como se presenta en la Figura 3.11. El tamaño que se determinó para estas NPs está entre 2 a 5 nm o 6 a 10 nm y también se observa la estructura cristalina. En las micrografías que se presentan aquí se observa que a este pH se formaron una mayor cantidad de NPs pero de tamaño mayor obtenidas a pH 4.

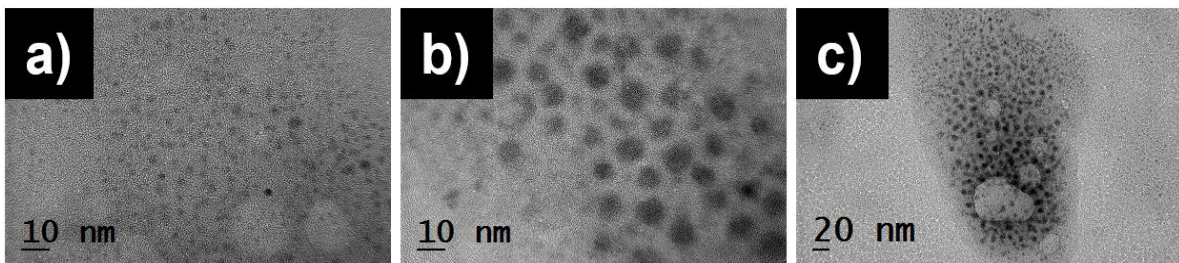


Figura 3.11 Micrografías obtenidas por HRTEM de ZnNPs a pH 12.

De acuerdo a la detección del pico del plasmón asociado a estas NPs para los diferentes valores de pH, el que corresponde a pH 12 resultó un poco más intenso, esto se asocia a una mayor presencia de NPs independientes, por lo que se puede concluir que el pH influye en la formación de ZnNPs, a pH básico se forma una mayor cantidad de ellas por lo que la intensidad del plasmón se incrementa según lo observado en la Figura 3.2, mientras que un pH neutro o ácido no garantiza una mayor cantidad de NPs.

3.2.4 Indexación de ZnNPs

Como parte de la caracterización de las NPs por TEM, se realizó su indexación con el objetivo de identificar su estructura cristalina y composición.

a) ZnNPs pH 4

Para el caso de las NPs obtenidas a pH 4, en la Figura 3.12 se muestran las micrografías con su transformada de Fourier, el análisis de los planos cristalográficos muestran que estas estructuras corresponden a las formas cúbicas y hexagonal con fases de composición ZnO_2 y ZnO respectivamente de acuerdo a las tablas cristalográficas PDF 781124 y 891397 (Anexo 1).

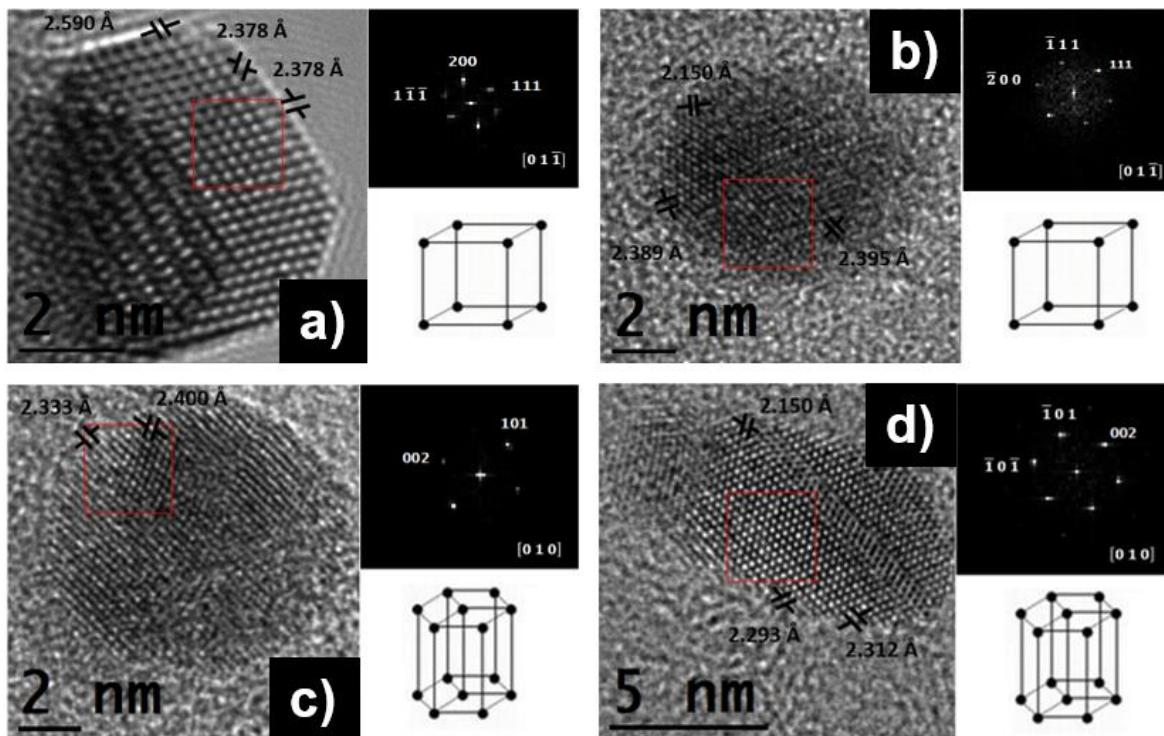


Figura 3.12 NPs a pH 4 indexadas con composición ZnO_2 (cúbica) y ZnO (hexagonal).

b) ZnNPs pH 7

En las micrografías obtenidas para este valor de pH (Figura 3.10) se observó la ausencia de NPs independientes, aun cuando era visible la estructura cristalina. Las distancias interplanares obtenidas para dichas micrografías con HRTEM (Figura 3.13) muestran estructuras cúbica y hexagonal, asimismo la composición corresponde a ZnO_2 y ZnO de acuerdo a las tablas cristalográficas PDF 781124 y 891397 (Anexo 1), tanto la estructura como la fase no cambiaron al variar el pH de síntesis.

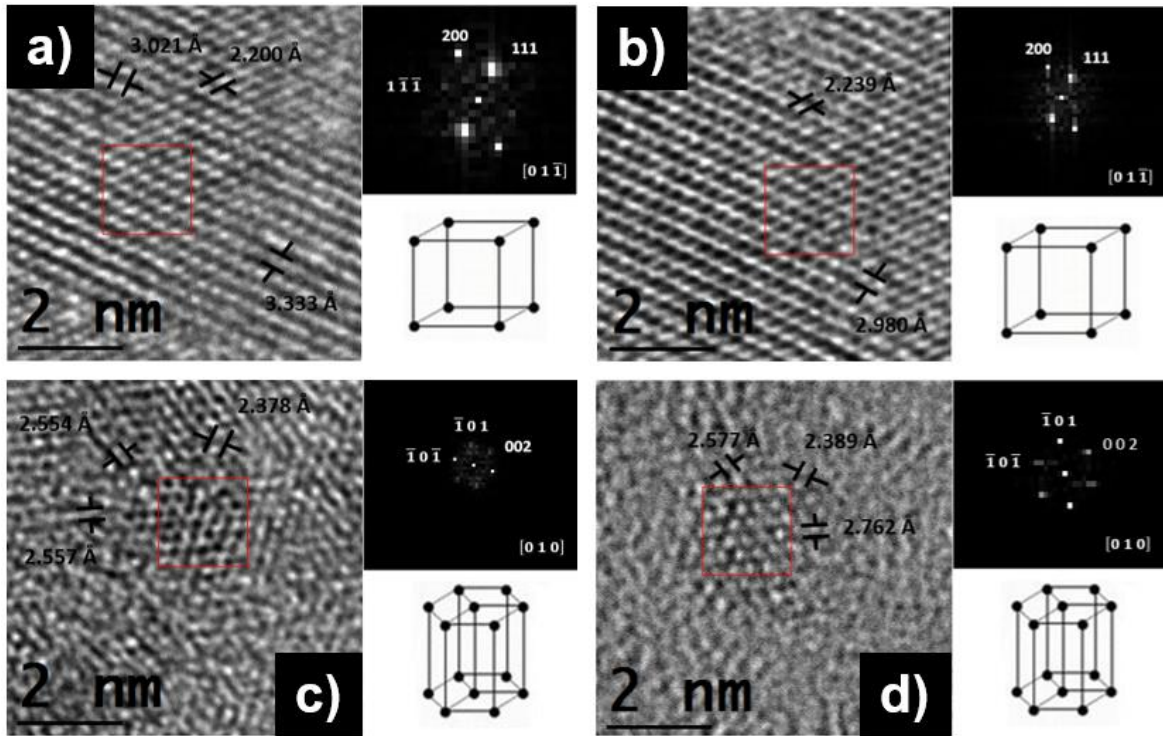


Figura 3.13 NPs a pH 7 indexadas con composición ZnO_2 (cúbica) y ZnO (hexagonal).

c) ZnNPs pH 12

La síntesis de las ZnNPs a pH 12, en donde se observó mayor número de NPs, las distancias interplanares y ejes de zonas determinados se presentan en la Figura 3.14. A diferencia de los dos valores de pH anteriores, la estructura hexagonal se identificó con mayor frecuencia a este valor de pH, esta puede estar relacionada al incremento del número y tamaño de las NPs. La estructura cúbica y la composición ZnO_2 y ZnO también se identifican de acuerdo a las tablas cristalográficas PDF 781124 y 891397 (Anexo 1), estas características tampoco cambiaron con el valor de pH.

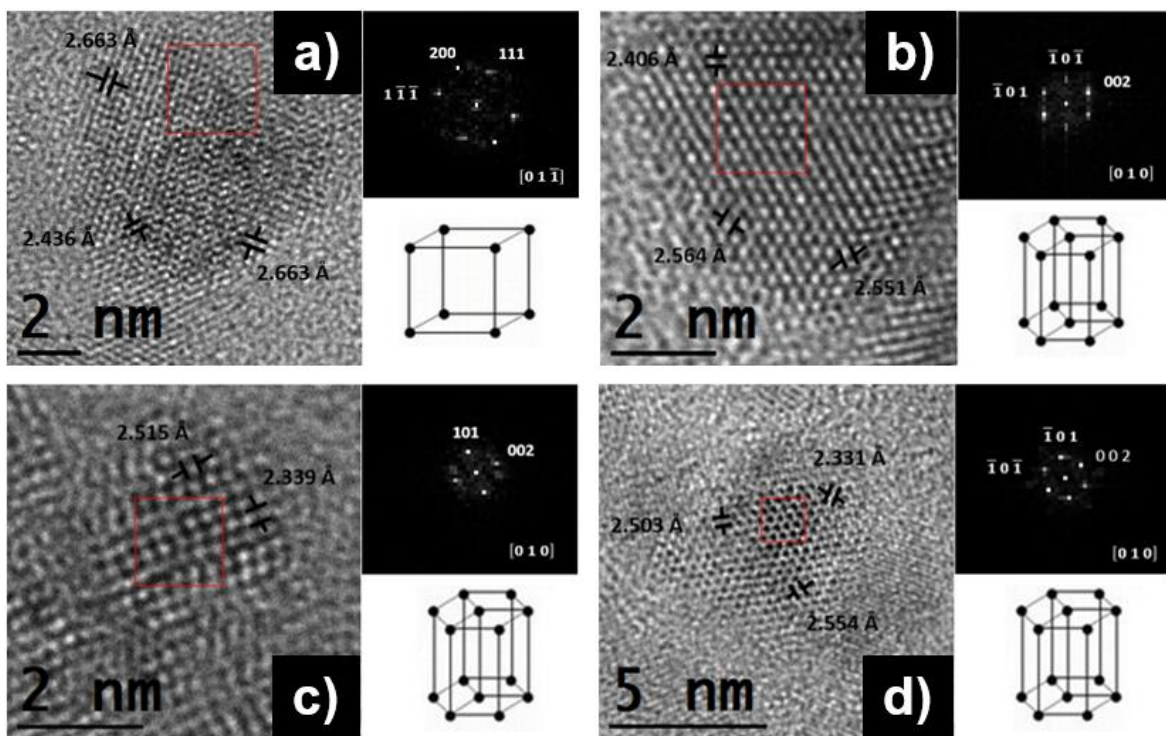


Figura 3.14 NPs a pH 12 indexadas con composición ZnO_2 (cúbica) y ZnO (hexagonal).

De acuerdo a los resultados obtenidos en cuanto al tamaño, estructura y composición de las ZnNPs sintetizadas a tres valores de pH (4, 7 y 12), a continuación se presenta una tabla que resume estos parámetros (Tabla 3.1).

Tabla 3.1 Parámetros obtenidos en la síntesis de ZnNPs.

pH	Tamaño	Estructura	Composición
4	5 -10 nm	Cúbica Hexagonal	ZnO_2 ZnO
7	2 - 5 nm	Cúbica Hexagonal	ZnO_2 ZnO
12	2 - 5 nm 6 - 10 nm	Cúbica Hexagonal	ZnO_2 ZnO

De acuerdo al resumen que se presenta en la Tabla 3.1 se observa que tanto la composición como la estructura de las NPs son independientes al tamaño, ya que éste no tiene atribución en la composición y la estructura para las NPs, además el pH utilizado durante la síntesis no muestra influencia ni en el tamaño, estructura y composición de las partículas.

3.3 NANOPARTÍCULAS DE COBRE (CuNPs)

3.3.1 Espectroscopía UV-Vis

Para las CuNPs se identificaron comportamientos similares a los observados con las ZnNPs, el primero de ellos fue no mostrar el cambio de color de la solución después de formar partículas, el color se mantuvo después de la formación de las NPs por lo que la detección de estas se llevó a cabo ubicando el pico de plasmón correspondiente a estas NPs, el resultado se presenta en la Figura 3.15.

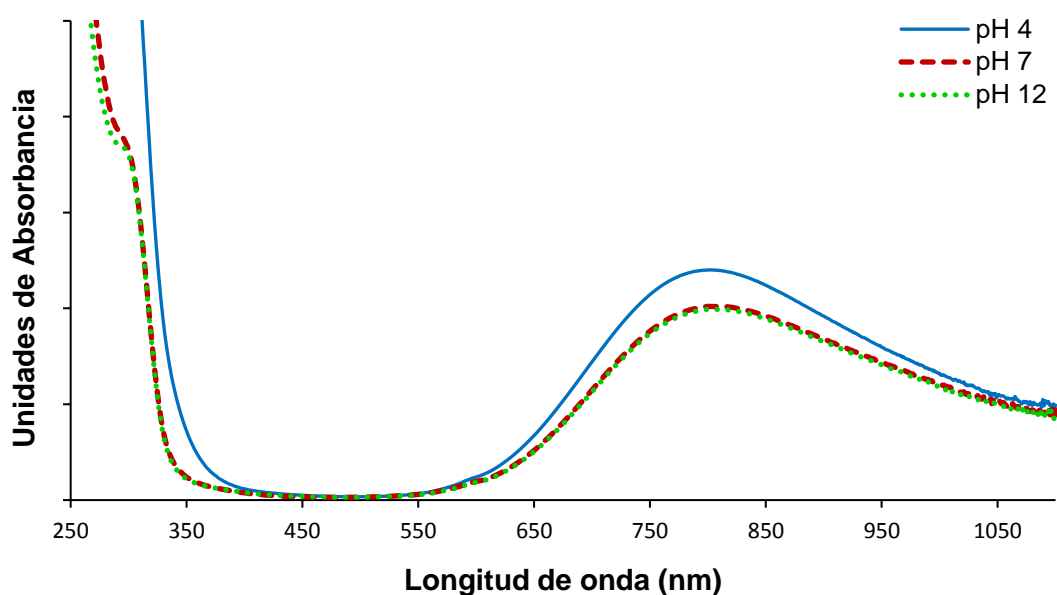


Figura 3.15 Espectro UV-Vis de CuNPs producidas a solución buffer pH 4, 7 y 12.

El máximo correspondiente al plasmón para las CuNPs se observa en 800 nm aproximadamente. A diferencia de las ZnNPs, el plasmón a pH 4 resultó ser el más intenso en comparación a los pH 7 y 12 debido a una mayor cantidad de CuNPs (Wang y Lin, 2006), aunque no se determinó este número, más adelante se presentan los resultados de tamaño, estructura y composición de las CuNPs.

3.3.2 SEM

Para la caracterización de las CuNPs se realizó un análisis SEM, la vista general de estas partículas se presenta en las micrografías de la Figura 3.16.

a) Cu pH 4

En esta Figura se observa que una magnificación a 270X no permite apreciar el detalle de la muestra mientras que la micrografía con 10,000X en método transmisión STEM en campo claro si muestra una diferencia en el peso molecular de los elementos contenidos en la muestra distinguiéndolos del soporte de carbón.

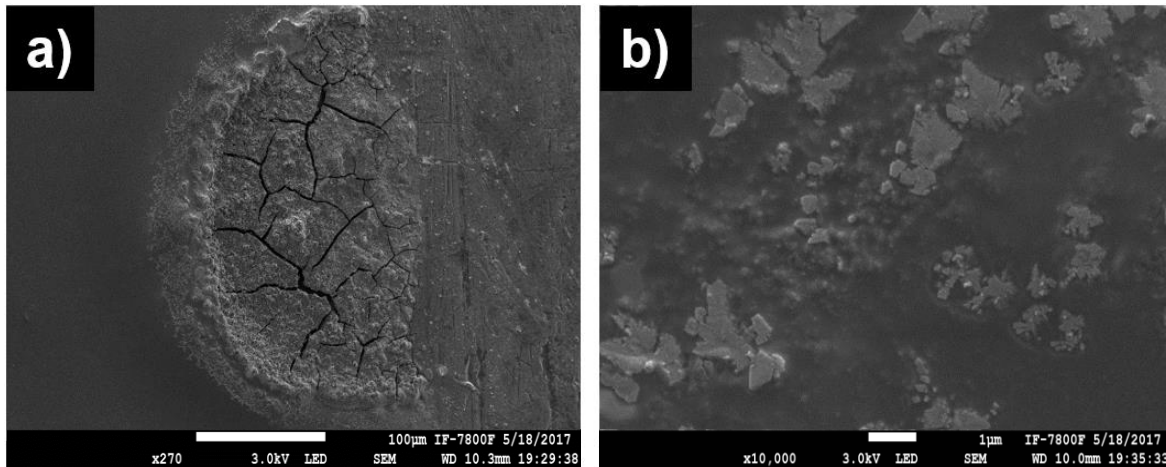


Figura 3.16 Micrografías de CuNPs a pH 4: a) vista general, b) imagen HRTEM.

De manera general se aprecia una morfología homogénea en donde los puntos más oscuros se pueden asociar a la presencia de CuNPs.

Para confirmar la presencia de cobre en la muestra analizada se realizó un análisis EDS para observar la composición elemental de las NPs. El resultado del análisis del EDS se presenta en la Figura 3.17.

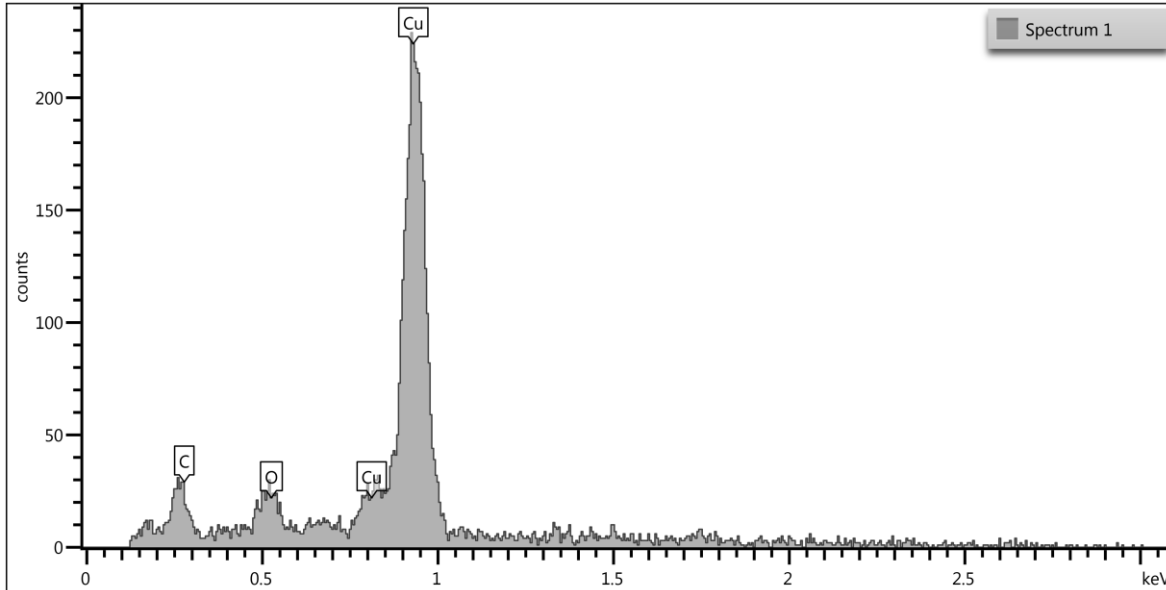


Figura 3.17 Análisis EDS de CuNPs sintetizadas a pH 4.

El análisis EDS detecta la presencia de carbón y oxígeno que son elementos provenientes de la biomasa y como elemento principal se detecta al cobre.

b) Cu pH 7

Se analizaron por SEM las CuNPs obtenidas a pH 7, de éstas se presentan dos micrografías a 1,000X y 10,000X en la Figura 3.18. La morfología que se observa a 1,000X corresponde a una placa continua y homogénea sin que se aprecie la formación de aglomerados en su superficie. Al aumentar a 10,000X se aprecia con más detalle el relieve de la primera micrografía, se confirma que es una placa o película continua sin la formación de agregados en su superficie.

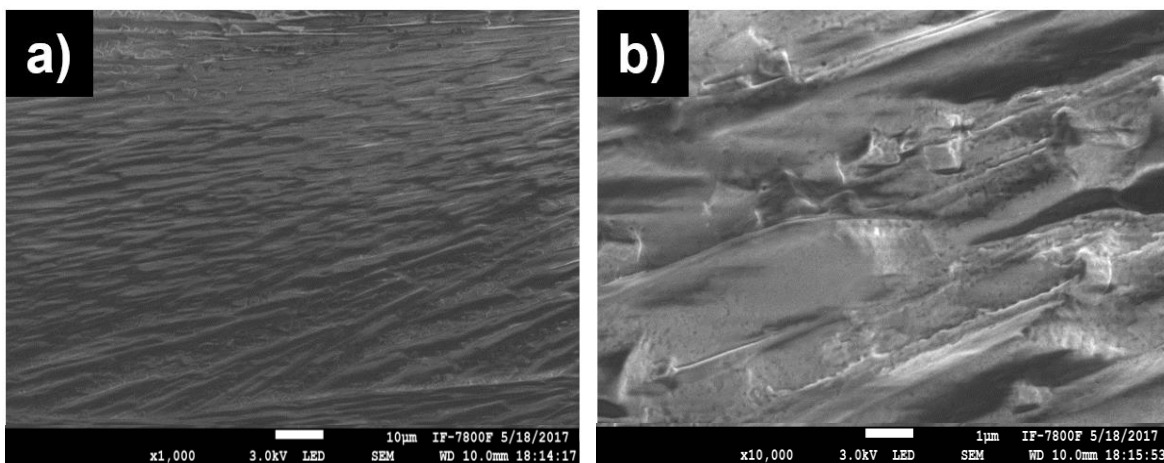


Figura 3.18 Micrografías de CuNPs a pH 7: a) vista general, b) formación de relieves.

El análisis EDS realizado sobre esta morfología corresponde principalmente al Cu. Al igual que en el análisis anterior se detecta la presencia de C, N y O que pueden corresponder a los restos de la biomasa utilizada durante la síntesis (Figura 3.19).

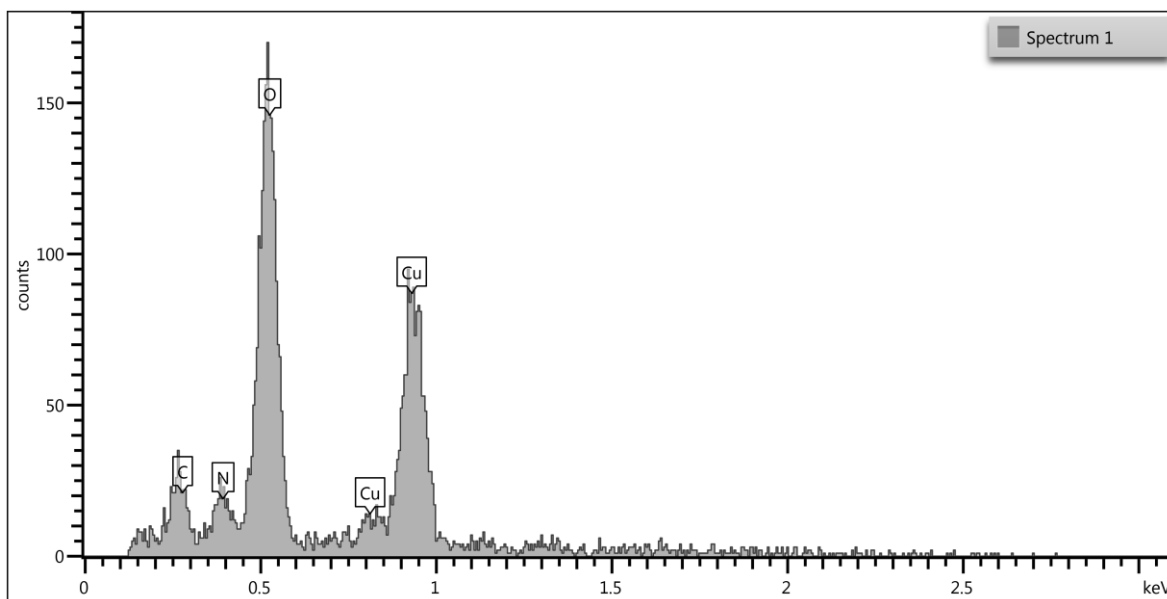


Figura 3.19 Análisis EDS de CuNPs sintetizadas a pH 7.

c) Cu pH12

De acuerdo a las micrografías mostradas en la Figura 3.20, se observa una vista general a 2,000X y un acercamiento a 10,000X. En ambas micrografías se observa una morfología homogénea y diferente a los pH anteriores donde no se identificaron formas definidas. En el caso de la magnificación a 10,000X la

morfología se asemeja a un aglomerado de partículas grandes, sin que se aprecien zonas o puntos brillantes que pudieran ser asociados a las NPs metálicas, esto se justifica debido a que la amplificación pudo no ser suficiente para ver este efecto.

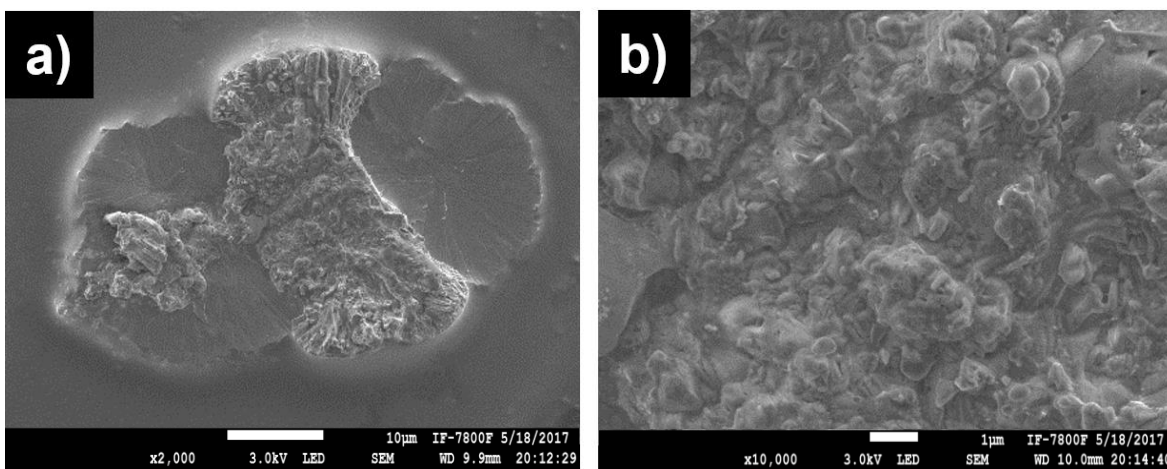


Figura 3.20 Micrografías de CuNPs a pH 12: a) vista general, b) morfología homogénea.

El complemento de las micrografías se realiza mediante el análisis EDS el cual se presenta en la Figura 3.21, de acuerdo a sus resultados se comprueba la composición de las CuNPs, la cual fue consistente con los análisis realizados a pH 4 y 7; asimismo se detectó la presencia de compuestos pertenecientes a la biomasa, tales como el oxígeno.

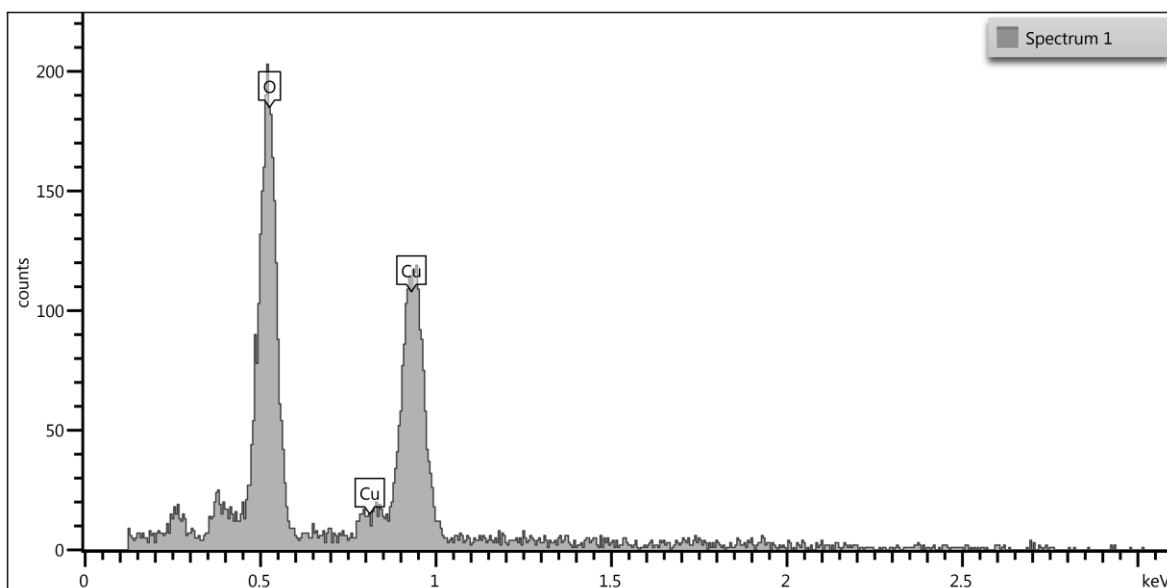


Figura 3.21 Análisis EDS de CuNPs sintetizadas a pH 12.

3.3.3 TEM

Los resultados por SEM permitieron comprobar la composición general de las NPs, no obstante para determinar la estructura, tamaño y composición de las partículas fue necesario realizar su caracterización por TEM.

a) CuNPs pH 4

En la Figura 3.22 se presentan las micrografías para las CuNPs obtenidas a pH 4.

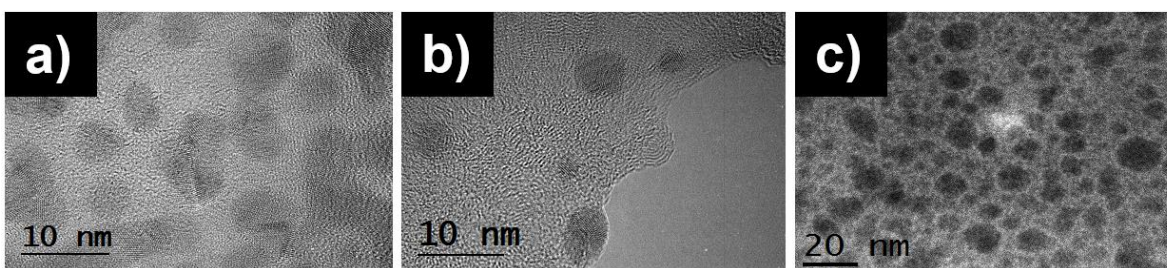


Figura 3.22 Micrografías obtenidas por HRTEM de CuNPs a pH 4.

Las NPs observadas no muestran la formación de aglomerados permitiendo un mejor control sobre la dispersión de tamaños de partícula (Buendía, 2009), se observan partículas independientes, el tamaño de las NPs oscila entre 2 a 5 nm y de 6 a 10 nm.

b) CuNPs pH 7

Las CuNPs obtenidas a pH 7 se muestran en la Figura 3.23.

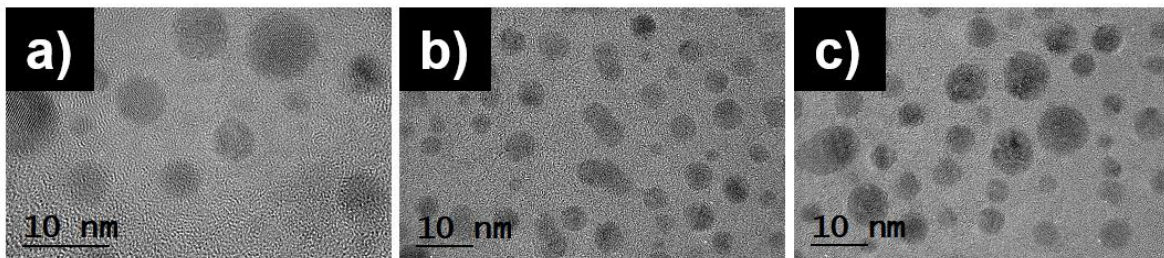


Figura 3.23 Micrografías obtenidas por HRTEM de CuNPs a pH 7.

Al igual que el pH anterior en estas micrografías no se aprecian aglomerados de NPs, se observan diferentes tamaños que, en este caso se agrupan en dos intervalos de 2 a 5 nm y de 6 a 10 nm. En las partículas de mayor tamaño (Figura 3.23a) también es posible apreciar las franjas características de las NPs metálicas, lo que confirma su formación.

c) CuNPs pH 12

En la Figura 3.24 se presentan las micrografías para las CuNPs obtenidas a pH 12.

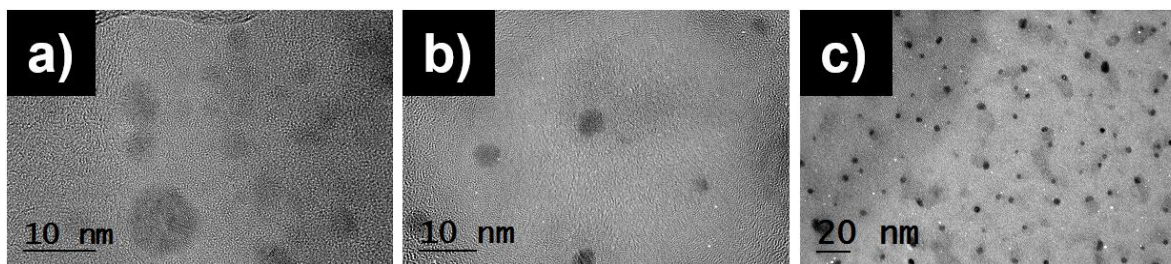


Figura 3.24 Micrografías obtenidas por HRTEM de CuNPs a pH 12.

Para este pH tampoco hubo formación de aglomerados. Las CuNPs detectadas tienen un tamaño que oscilan entre 2 a 5 nm. Para este caso se tomó una micrografía en campo claro (Figura 3.24c) en la que se observa con facilidad la presencia de NPs independientes y con una distribución homogénea, además de que en este caso, el campo claro muestra diferencia entre el soporte y la presencia de las NPs de acuerdo a su peso molecular.

3.3.4 Indexación de CuNPs

Con los resultados obtenidos hasta ahora se determinó el tamaño de las CuNPs; para analizar su estructura y composición química se realizó la indexación de las mismas como parte de su caracterización.

a) CuNPs pH 4

En la Figura 3.25 se muestran cuatro micrografías representativas de las CuNPs obtenidas a pH 4, en cada inciso se presenta una micrografía con una NP centrada y cuyo tamaño oscila en lo reportado en el apartado anterior, en la segunda parte se observa los planos determinados para esa NPs y al final está la estructura cristalográfica que corresponde a los planos obtenidos.

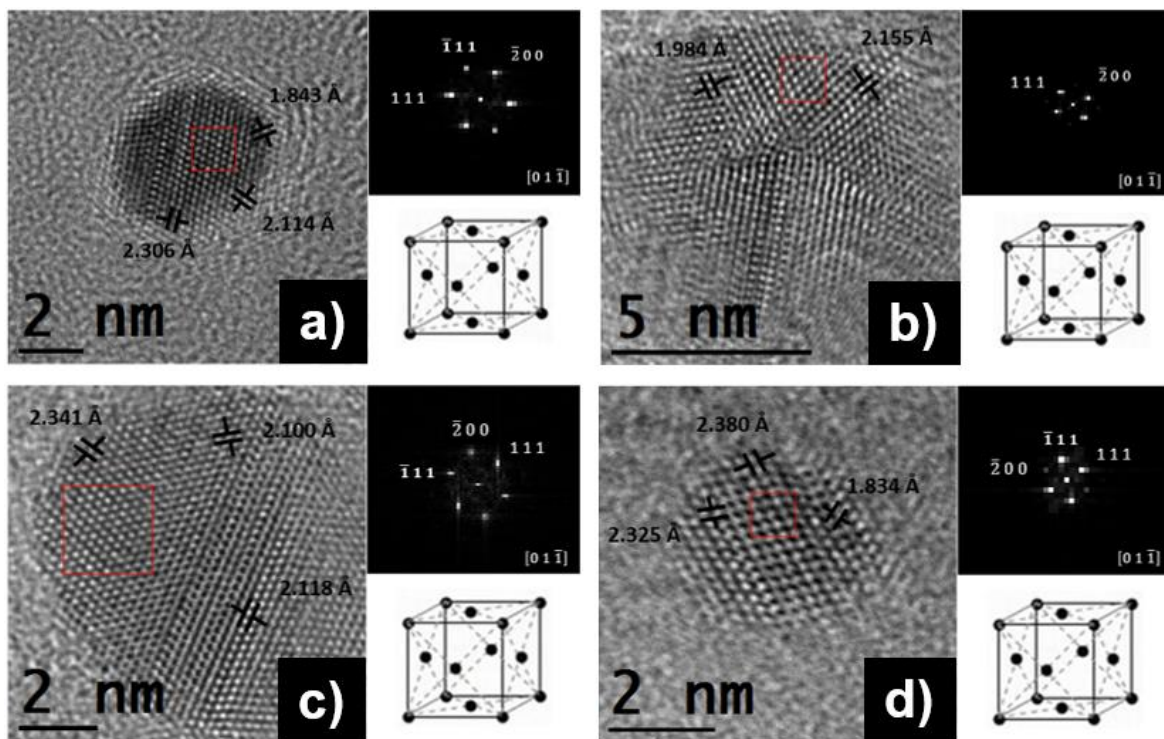


Figura 3.25 NPs a pH 4 indexadas con composición CuO (cúbica FCC).

La forma determinada de acuerdo a la estructura cristalina correspondiente es cúbica centrada en las caras en todos los casos, y la composición reportada en las tablas cristalográficas PDF 780428 (Anexo 2) pertenece a la fórmula química CuO para todas las micrografías.

b) CuNPs pH 7

En la Figura 3.26, se muestran imágenes de la transformada de Fourier para las CuNPs obtenidas a pH 7, cuyo tamaño está dentro del rango indicado previamente. En este caso las estructuras cristalinas corresponden a la forma cúbica centrada en las caras para las cuatro micrografías, así también presentan una fase de CuO de acuerdo a la tabla cristalográfica PDF 780428 (Anexo 2).

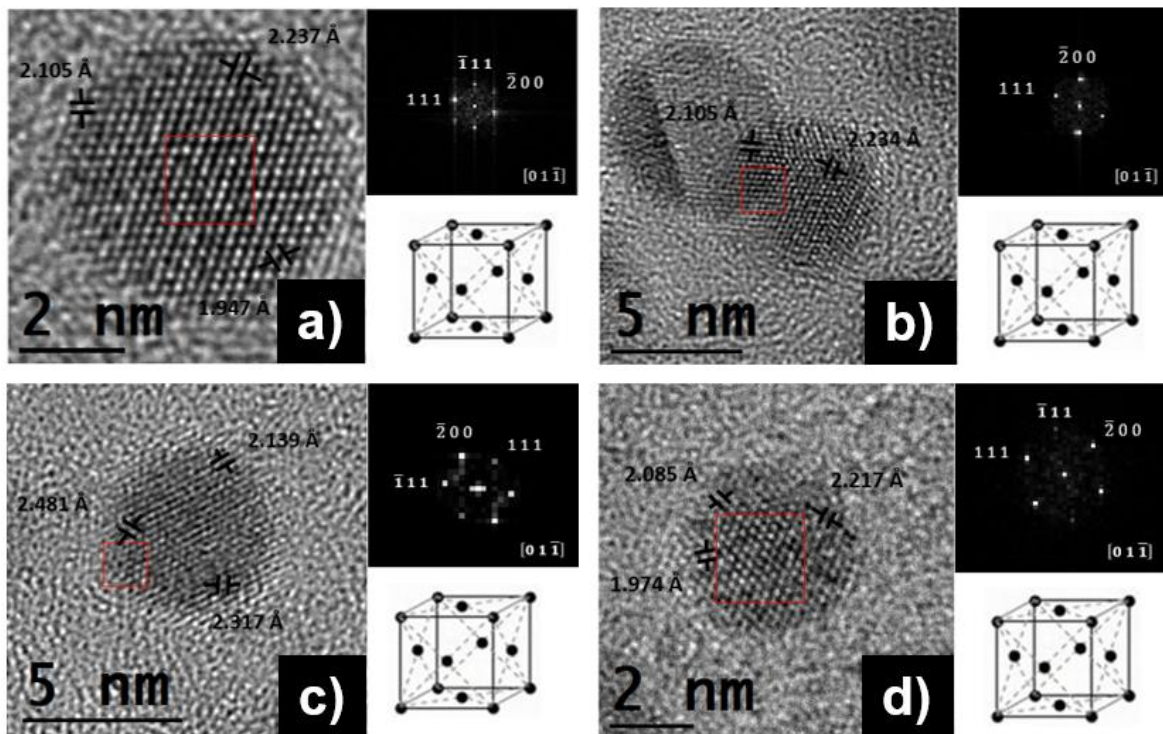


Figura 3.26 NPs a pH 7 indexadas con composición CuO (cúbica FCC).

a) CuNPs pH 12

En la Figura 3.27 se muestran las distancias interplanares obtenidas en las micrografías de las CuNPs sintetizadas a pH 12. Se determinó que las CuNPs corresponden a estructuras cúbicas centrada en las caras, de acuerdo a la tabla cristalográfica PDF 780428 (Anexo 2).

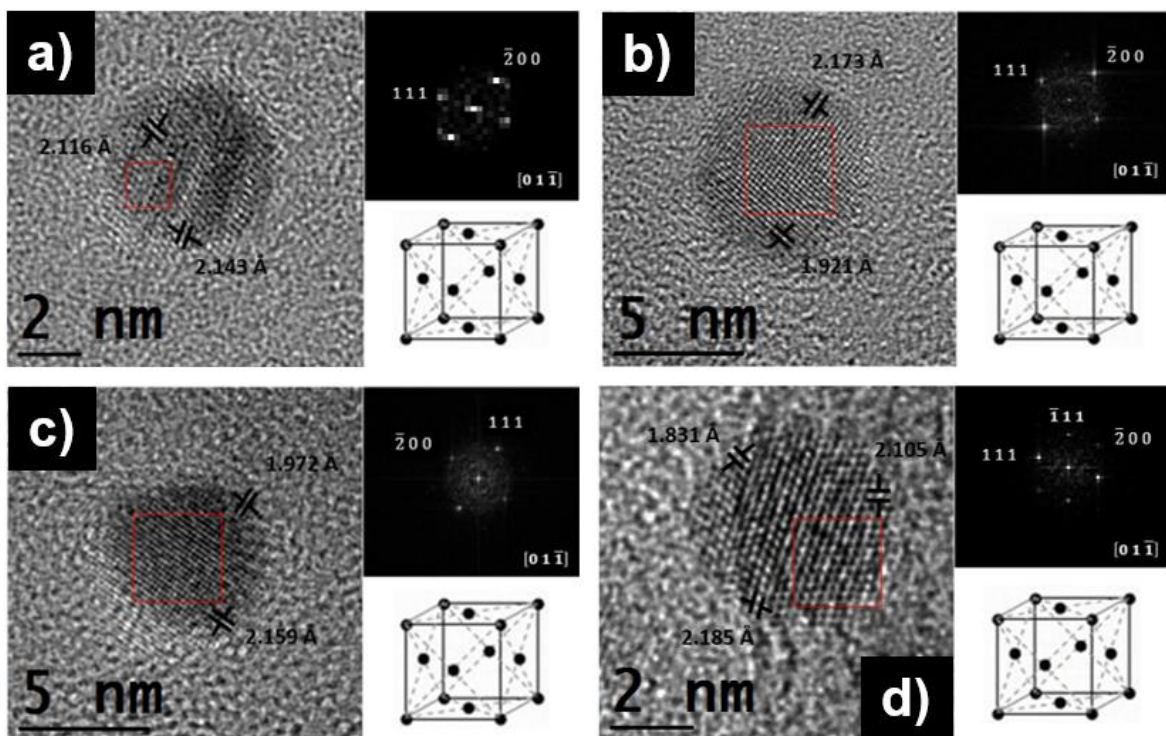


Figura 3.27 NPs a pH 12 indexadas con composición CuO (cúbica FCC).

Al igual que para las NPs obtenidas a pH 4 y 7 la composición química corresponde a CuO según la indexación descrita en el apartado 2.

En la Tabla 3.2 se presenta un resumen con los parámetros obtenidos para las CuNPs. Como se observa en la Tabla, no hay una relación directa entre el pH y el tamaño de 2 a 5 nm de las NPs solo en el caso del pH 12 no se producen NPs mayores a este rango. En cuanto a la estructura y composición no hay una influencia del pH o tamaño de las NPs, en todos los casos se determinaron la misma estructura cristalina y composición química. Por lo que la producción de CuNPs no presenta una influencia importante por la variación del pH.

Tabla 3.2 Parámetros obtenidos en la síntesis de CuNPs.

pH	Tamaño	Estructura	Composición
4	2 - 5 nm 6 - 10 nm	Cúbica FCC	CuO
7	2 - 5 nm 6 - 10 nm	Cúbica FCC	CuO
12	2 - 5 nm	Cúbica FCC	CuO

3.4 NANOPARTÍCULAS BIMETÁLICAS COBRE/ZINC (Cu/Zn NPs)

3.4.1 Espectroscopía UV-Vis

La síntesis de las ZnNPs y CuNPs se logró por el método de la bioreducción, ambas NPs se probaron más adelante frente a una cepa de *E. coli*. Como una forma de incrementar el efecto bactericida de ambas NPs, se realizó una síntesis probando una relación 1:1 en volumen de las soluciones de $\text{CuN}_2\text{O}_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ y $\text{ZnN}_2\text{O}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, esta proporción representa una relación equimolar entre las moléculas de Cu y Zn. Con esta mezcla en solución se esperaba obtener partículas bimetálicas Cu/Zn, las cuales según la indexación se obtuvieron en menor cantidad. La detección de las NPs se realizó a través del pico de plasmón por espectroscopia UV-Vis, los resultados se presentan en la Figura 3.28.

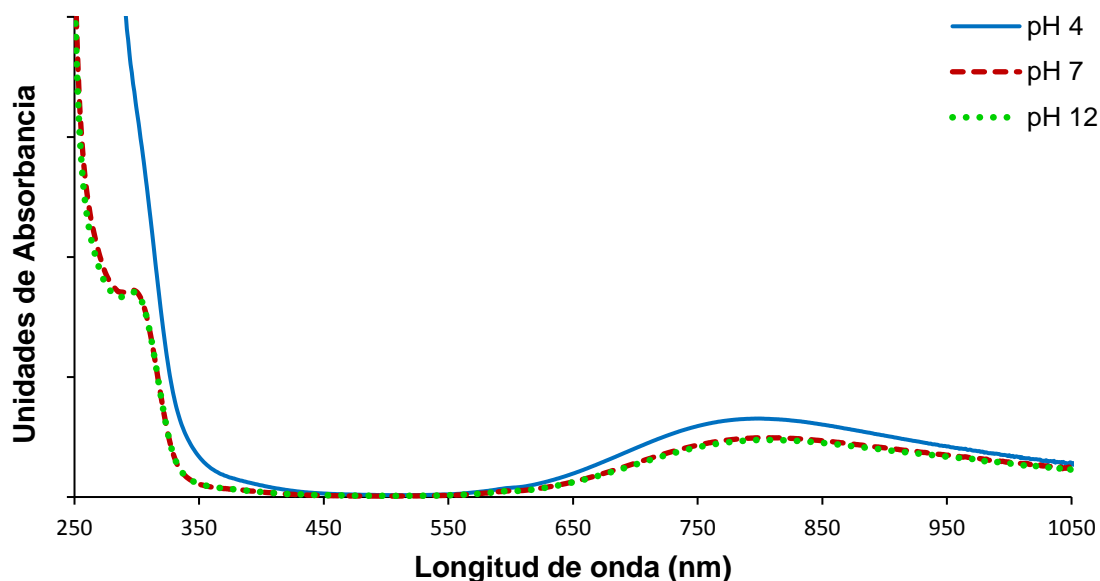


Figura 3.28 Espectro UV-Vis de Cu/Zn NPs producidas a solución buffer pH 4, 7 y 12.

En la Figura se observa que para los pH 7 y 12 se forman los picos de plasmón identificados para las ZnNPs (300 nm) y CuNPs (800 nm). Para pH 4, solo se observa el pico para las CuNPs, que es también el más intenso debido a un gran número de NPs obtenidas (Wang y Lin, 2006). La aparición de los picos independientes indica que no todas las moléculas de cobre y zinc formaron una sinergia para producir NPs bimetálicas (Cu/Zn), sino que la producción de NPs se

dio en su mayoría por separado y por ello el pico de plasmón no muestra desplazamientos ni se observa la formación de un nuevo pico que corresponda a otro tipo de partículas. Sin embargo se probó el efecto bactericida de esta suspensión de NPs.

3.4.2 SEM

Las NPs bimetálicas, se caracterizaron de la misma manera que las ZnNPs y CuNPs, comenzando por el análisis SEM que permitió obtener un panorama general de la morfología formada por dichas NPs.

a) Cu/Zn pH 4

La preparación de las muestras en todos los casos fue la misma, se buscó que la suspensión formara una película sobre la cinta de carbón utilizada para preparar las muestras para su observación por SEM, en ninguno de los casos se presentaron factores que pudieran influir sobre la morfología formada por la suspensión de NPs antes de su análisis. En la Figura 3.29 se observa las micrografías de las Cu/Zn NPs obtenidas a pH 4 y con un aumento de 430X y 3,000X.

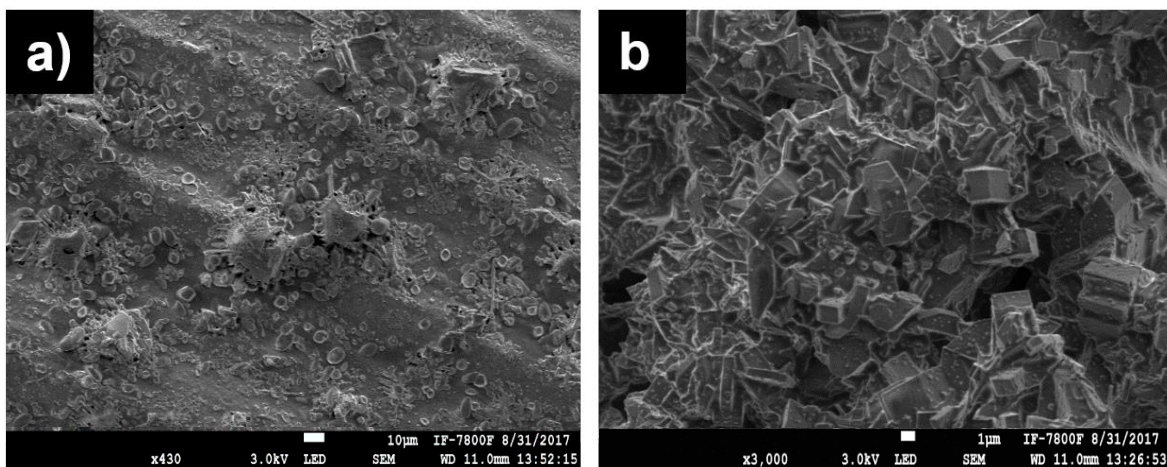


Figura 3.29 Micrografías de Cu/Zn NPs a pH 4: a) vista general, b) imagen HRTEM.

A diferencia de las ZnNPs y CuNPs obtenidas en suspensiones independientes la suspensión Cu/Zn muestra una morfología más definida y ordenada al formar la

película. A 430X se observa la formación de una película irregular pero sin diferencias importantes en su morfología. A 3,000X se observan figuras geométricas mejor definidas las cuales están formando la película de la suspensión, este efecto se observa al tener la presencia simultánea de cobre y zinc; sin embargo no es indicativo de la sinergia entre el cobre y zinc para formar NPs bimetálicas.

El análisis EDS realizado para la suspensión con NPs bimetálicas se presenta en la Figura 3.30; en este análisis se confirma la presencia de Zn y Cu en la muestra, además se identificaron componentes de la biomasa tales como C y O.

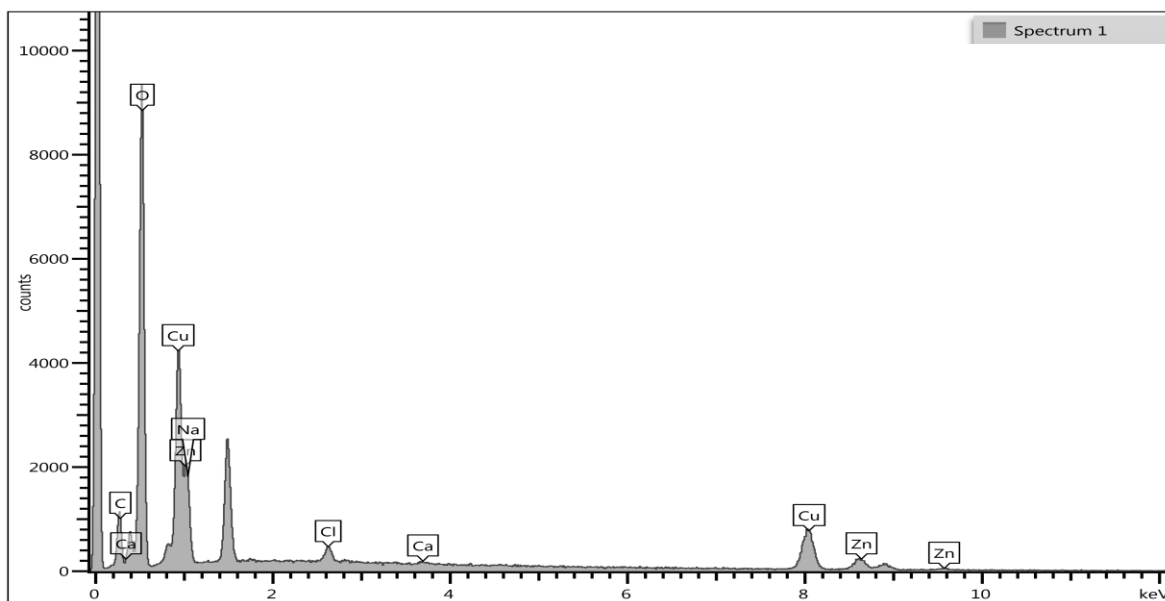


Figura 3.30 Análisis EDS de Cu/Zn NPs sintetizadas a pH 4.

Para el caso de estas muestras se realizó un estudio adicional a fin de comprobar que la distribución de las Cu/Zn NPs en la suspensión fuera homogénea, esto se confirmó mediante un análisis de mapeo realizado sobre las mismas películas formadas para su análisis por SEM. Los resultados de este análisis se presentan en la Figura 3.31, en el que se observa la distribución de los elementos en un área específica, y se muestra por un lado la presencia de Cu y Zn como elementos principales de la síntesis, y por otro que la distribución de ambos elementos en la suspensión sí es homogénea. La presencia de los otros elementos Al, Cl y O se deben al portamuestras y a los restos de la biomasa utilizada en la síntesis.

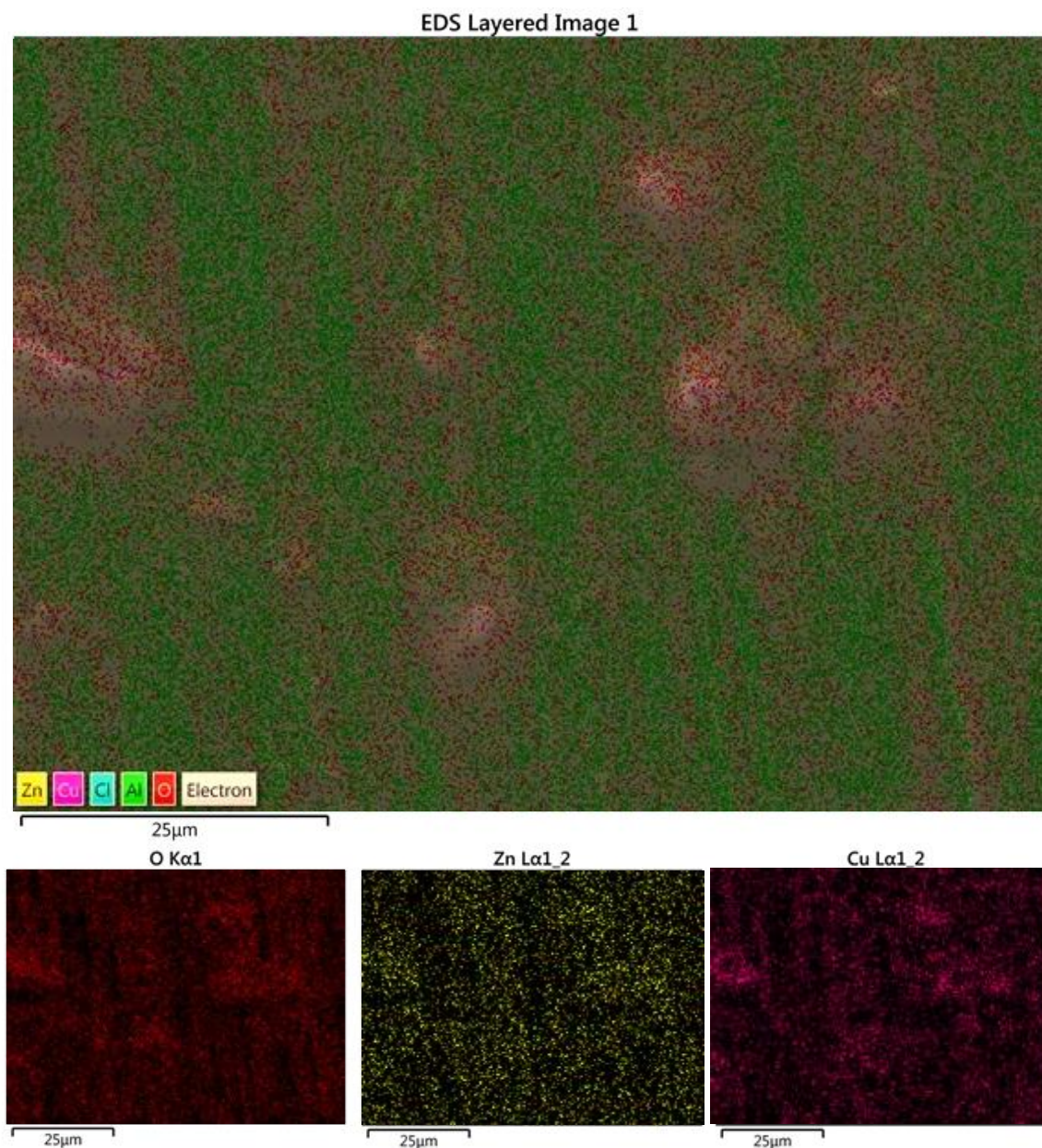


Figura 3.31 Mapeo de Cu/Zn NPs sintetizadas a pH 4.

b) Cu/Zn pH 7

La síntesis de las NPs bimetálicas se realizó utilizando los mismos valores de pH empleados para las ZnNPs y CuNPs con el fin de identificar una influencia asociada al pH de la solución. En la Figura 3.32 se presenta las NPs bimetálicas obtenidas a pH 7.

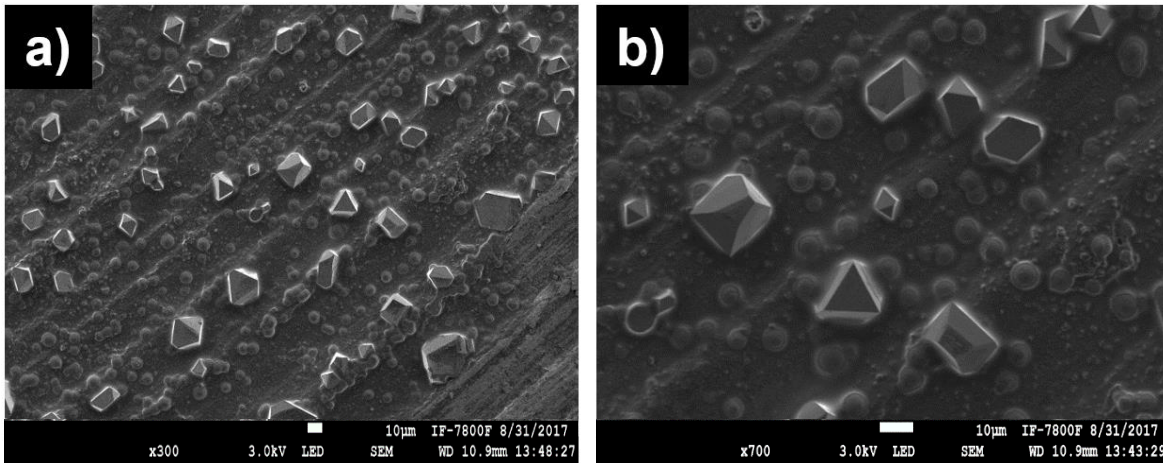


Figura 3.32 Micrografías de Cu/Zn NPs a pH 7: a) vista general, b) formación de figuras geométricas.

Al igual que el pH 4 la presencia simultánea de zinc y cobre en la solución produce figuras geométricas definidas que conforman la morfología de la película formada por la suspensión. Tanto a 300X como a 700X se observan dichas figuras geométricas con formas variadas pero bien definidas.

El análisis EDS para estas muestras (Figura 3.33) confirma que estas figuras geométricas están compuestas de Zn y Cu principalmente, la cual proviene de la mezcla de solución metálica utilizada para esta síntesis.

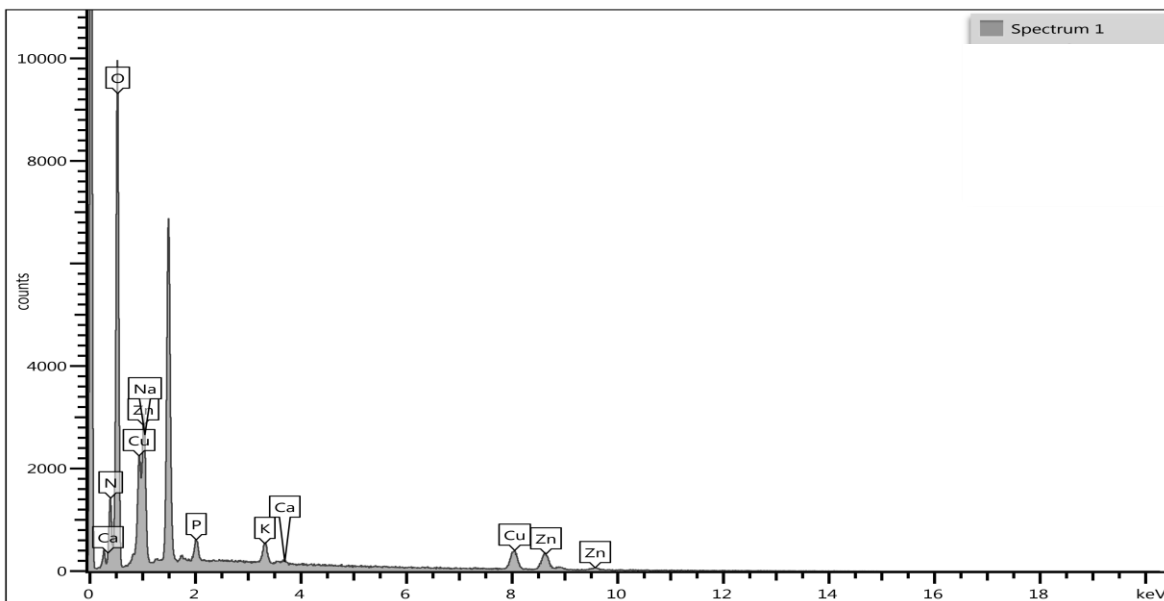


Figura 3.33 Análisis EDS de Cu/Zn NPs sintetizadas a pH 7.

La distribución del Cu y Zn dentro de la suspensión se analizó mediante un análisis de mapeo, en el que se comprobó que dicha distribución es homogénea en la suspensión de NPs bimetálicas (Figura 3.34).

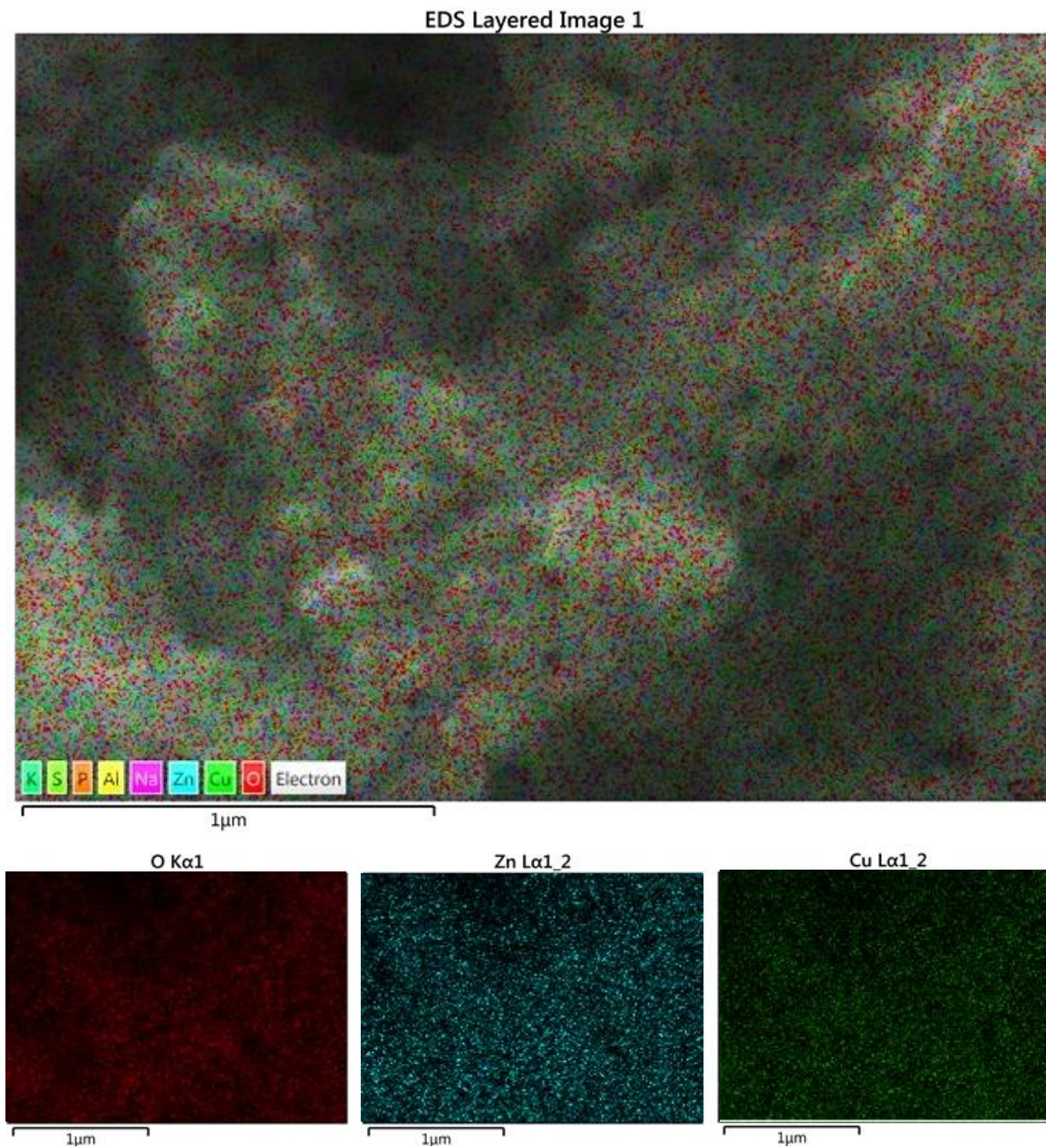


Figura 3.34 Mapeo de Cu/Zn NPs sintetizadas a pH 7.

c) Zn/Cu pH12

Las micrografías mostradas en la Figura 3.35 corresponden a la suspensión de partículas bimetálicas obtenidas a pH 12.

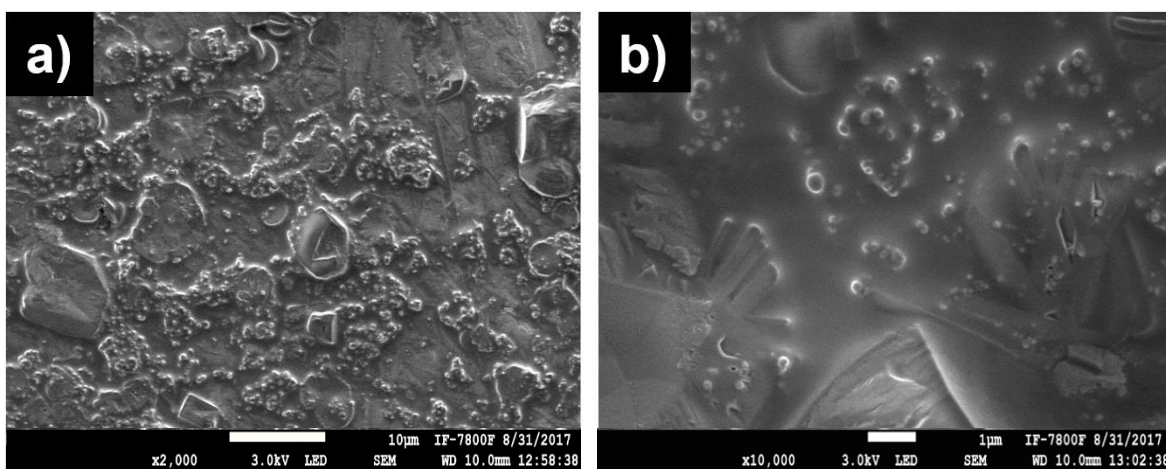


Figura 3.35 Micrografías de Cu/Zn NPs a pH 12: a) vista general, b) imagen HRTEM.

La presencia de los metales Cu y Zn en solución no garantizó que al utilizar un pH básico se crearan formas geométricas definidas para conformar la morfología de la película. Es importante resaltar que a diferencia de los valores de pH anteriores, un pH básico no promueve la generación de estas figuras geométricas aun cuando la morfología observada para estas NPs es completamente independiente a la que se detectó para las ZnNPs y CuNPs. La morfología observada para esta muestra tiende a ser más ordenada que para las partículas mencionadas.

El análisis EDS que se presenta en la Figura 3.36 y que corresponde a estas NPs obtenidas a pH 12 permitió verificar que la composición de la suspensión continúa siendo de Cu y Zn al igual que para los otros valores de pH.

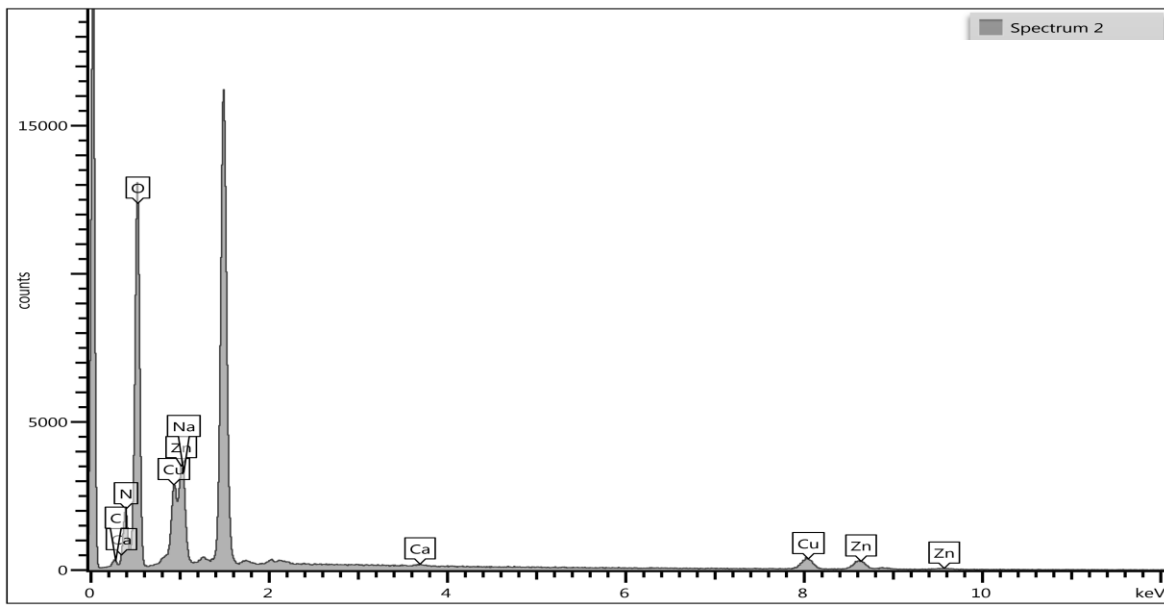


Figura 3.36 Análisis EDS de Cu/Zn NPs sintetizadas a pH 12.

Asimismo la distribución de las ZnNPs y CuNPs en la suspensión bimetalica se analizó por el mapeo de elementos en el que se observa que en efecto, la distribución de cobre y zinc continúa siendo homogénea aun cuando no se hayan obtenido figuras geométricas definidas en este valor de pH (Figura 3.37).

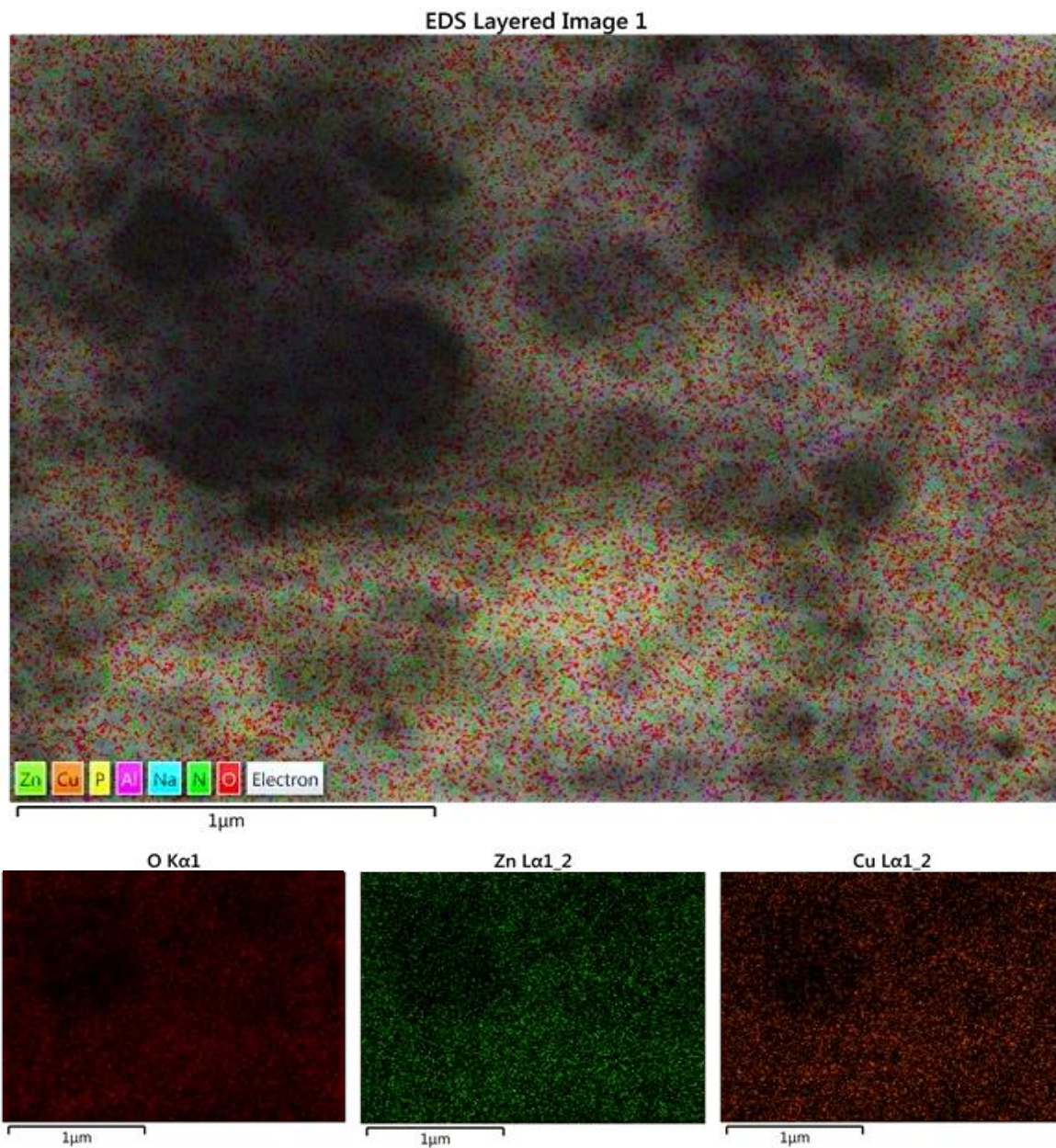


Figura 3.37 Mapeo de Cu/Zn NPs sintetizadas a pH 12.

3.4.3 TEM

El tamaño, estructura y composición química de las NPs bimetálicas Cu/Zn se determinó utilizando TEM y los resultados se muestran a continuación:

a) Cu/Zn NPs pH 4 y 7

La síntesis de NPs a partir de la solución metálica de Zn/Cu a pH 4 y 7 no produjo partículas visibles por el TEM. En la Figura 3.38 se presenta tres micrografías que corresponden a estos dos valores de pH, se puede observar en las Figuras 3.38a y b (cuadros) que corresponden al pH 4 aparece la red cristalina característica de las NPs metálicas, la cual es la forma sólida de cómo se ordenan y empaquetan los átomos, moléculas, o iones; sin embargo, no se distingue el borde de las NPs lo que dificulta determinar su tamaño e indexación; en la Figura 3.38c se puede observar la ausencia de partículas con red cristalina, por el contrario se observan la presencia de películas delgadas, algunas de las cuales muestran dobleces. Esto contrasta con los resultados observados por SEM en los que para estos pH se aprecian formas geométricas bien definidas.

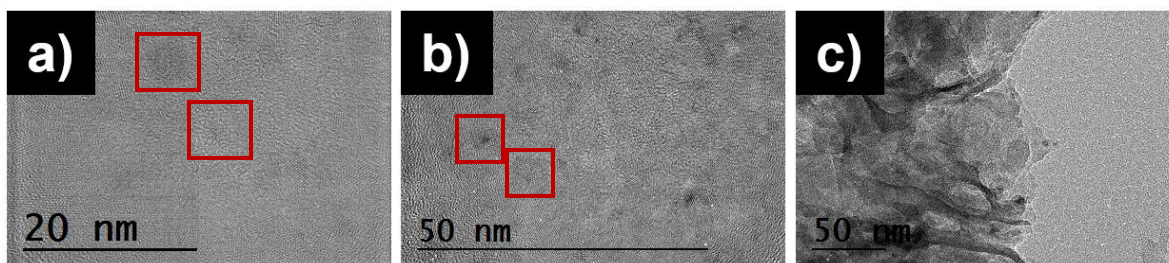


Figura 3.38 Micrografías obtenidas por HRTEM de Cu/Zn NPs: a) y b) pH 4, c) pH 7.

b) Cu/Zn NPs pH 12

El análisis por SEM para las Cu/Zn NPs obtenidas a pH 12 mostró una morfología no definida; sin embargo, los resultados de la caracterización por TEM para estas mismas NPs muestran la presencia de partículas independientes con un tamaño estimado de 2 a 5 nm. Tampoco se aprecia la formación de aglomerados de NPs y las partículas observadas si muestran las franjas características de los elementos metálicos (Figura 3.39).

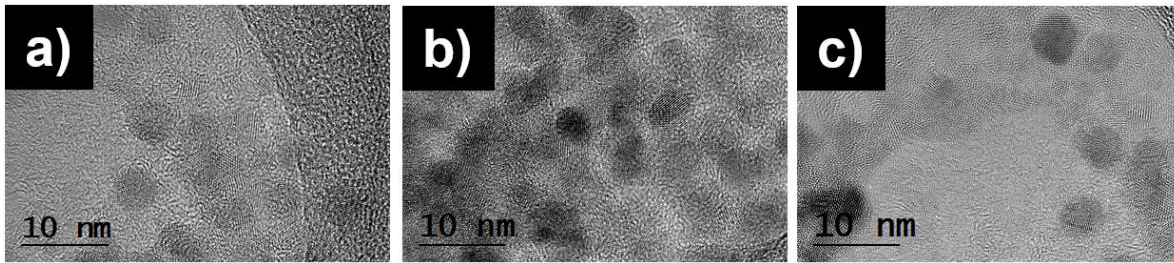


Figura 3.39 Micrografías obtenidas por HRTEM de Cu/Zn NPs a pH 12.

La presencia simultánea de cobre y zinc en la solución solo permitió la formación de NPs a un pH básico aun cuando al formar una partícula para su análisis de morfología por SEM no se observa un orden determinado o figuras geométricas determinadas. A simple vista y antes de indexar estas NPs se observa la misma característica que para las partículas ZnNPs y CuNPs, las estructuras que se forman son independientes y no se encuentran formando parte de un cuerpo común o aglomerado de NPs.

3.4.4 Indexación de Cu/Zn NPs

a) Cu/Zn NPs pH 12

De acuerdo a los resultados obtenidos por HRTEM, las únicas partículas visibles son las que obtuvieron a pH 12, por lo que solo se indexaron estas NPs. En la Figura 3.40 se presenta la misma disposición que para las ZnNPs y CuNPs, del lado izquierdo se presenta una micrografía con la partícula a indexar, del lado derecho se encuentra el eje de zona y debajo la estructura correspondiente. De acuerdo a la indexación realizada se observó un resultado interesante ya que las ZnNPs presentaron estructuras cúbica y hexagonal, mientras que las CuNPs mostraron una estructura cúbica centrada en las caras, las Cu/Zn NPs produjeron estructuras cúbicas centradas en las caras, y de manera aislada se formaron algunas partículas bimetalicas Cu/Zn que presentaron una estructura monoclinica.

Según las distancias interplanares se deduce que para este valor de pH tanto el cobre como el zinc producen estructuras particulares, mientras que la combinación de ambos genera otras formas geométricas por lo que el cristal que conforma dichas NPs depende del metal utilizado para la síntesis a este valor de pH en

particular. En cuanto a la composición, se pudo identificar que las distancias interplanares son muy cercanas a la estructura cristalina $\text{Cu}_{0.64}\text{Zn}_{0.36}$ (cúbica FCC) y CuZn (monoclónica) de acuerdo a las tablas cristalográficas PDF 501333 y 080349, respectivamente (Anexo 3).

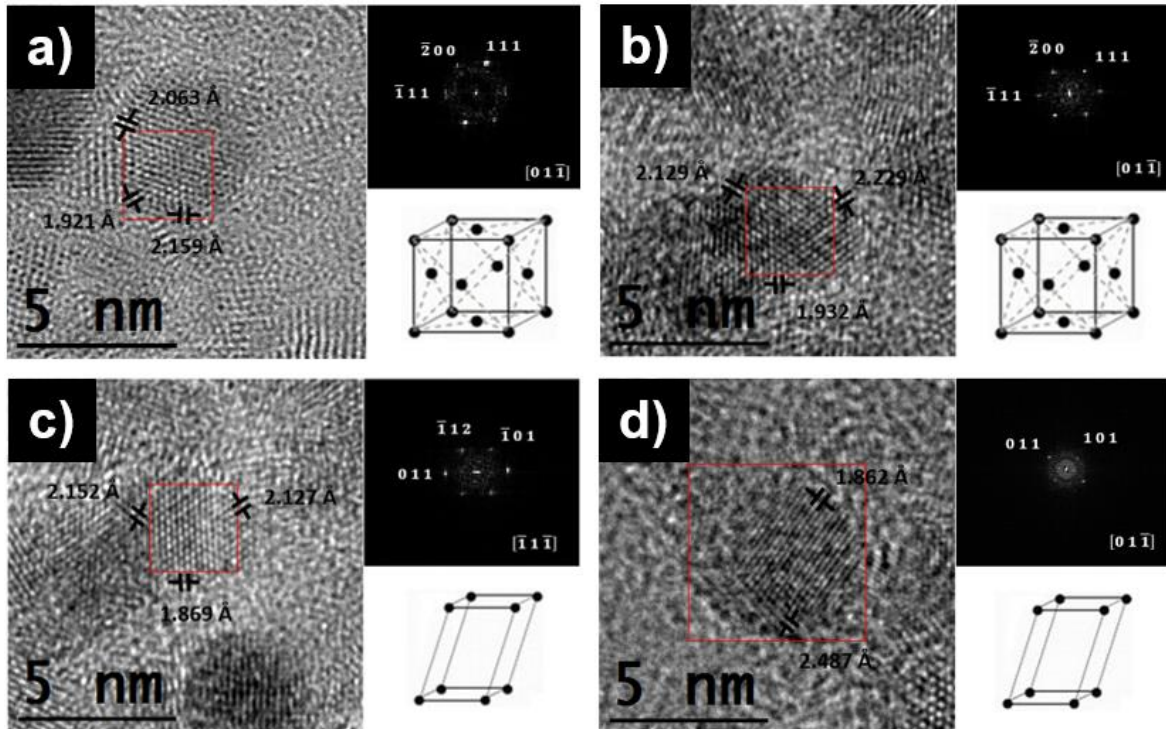


Figura 3.40 NPs a pH 12 indexadas con composición cercana a $\text{Cu}_{0.64}\text{Zn}_{0.36}$ (cúbica FCC) y CuZn (monoclónica).

3.5 PRUEBAS DE ACTIVIDAD BACTERICIDA

Una vez obtenidas las ZnNPs, CuNPs y Cu/Zn NPs se probó su capacidad microbicida frente a una bacteria modelo que fue la *Escherichia coli* (*E. coli*); estas pruebas son una aplicación directa de las NPs. La bacteria modelo *E. coli* pertenece al grupo de los coliformes que se identifican como indicadores de contaminación microbiológica en agua (NOM-003-SEMARNAT-1997).

3.5.1 Cuenta de UFC/mL en cepas bacterianas

La determinación de las unidades formadoras de colonias (UFC), utilizó el método de las diluciones sucesivas para cuantificar el número de microorganismos viables en los inóculos de las cepas *E. coli* ATCC 25922. Para el conteo UFC/mL se

consideraron únicamente las placas en las que durante el preconteo el número de colonias se encontró dentro del rango de 25 a 250 UFC/mL de acuerdo a lo indicado en la NOM-092-SSA1-1994. La concentración de UFC/mL se determinó dividiendo el número de colonias contadas en cada placa entre la dilución 1×10^{-7} del inóculo utilizada. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3 Cuenta en placa para cada repetición del inóculo 1×10^{-7} (Ec 1, Ec 2, Ec 3).

Muestra	Dilución	UFC/mL
Ec 1	1×10^{-7}	1.82×10^8
Ec 2	1×10^{-7}	3.35×10^8
Ec 3	1×10^{-7}	3.59×10^8

De acuerdo a la cantidad de microorganismos que crecieron en las placas de cada repetición las unidades formadoras de colonias que crecen a partir de *E. coli* ATCC 25922 se encuentran en el orden de 10^8 UFC/mL (1.82×10^8 , 3.35×10^8 y 3.59×10^8 respectivamente), las diferencias de conteo entre Ec 1 y Ec 3 se deben a errores experimentales que no son significativos en el conteo de las placas. Por lo que de acuerdo a estos resultados esta cepa es viable para obtener inóculos de hasta 100,000,000 de UFC/mL. Las concentraciones más utilizadas de *E.coli* para pruebas de actividad microbicida se encuentran en el rango 10^4 a 10^8 UFC/mL (Banala *et al.*, 2015; Yasin *et al.*, 2013; Pal *et al.*, 2007) estas diferencias dependen de las características propias de cada cepa utilizada durante las pruebas realizadas.

3.5.2 Determinación de UFC/mL con efecto microbicida cuantificable

a) ZnNPs

A partir de las UFC determinadas en la sección 3.5.1, se realizó un barrido comenzando con un inóculo más concentrado (1×10^{-1} UFC/mL) hasta llegar al que se probó en la sección anterior (1×10^{-7} UFC/mL), estas diferentes concentraciones del inóculo buscaban determinar la cantidad óptima de microorganismos a partir de los cuales el efecto microbicida de las ZnNPs fuera detectable. En este mismo

sentido se aplicaron cinco diferentes concentraciones de la suspensión de ZnNPs: 10, 100, 1,000, 10,000 y 29,749 mg/L, esta última corresponde a la cantidad de nanopartículas obtenidas después de la síntesis. La combinación de ambas variables (concentraciones de inóculo y ZnNPs) con un período de incubación de 24 h dio como resultado las condiciones óptimas para realizar las pruebas de actividad microbiciada restantes, los resultados de dicha combinación se presentan en la Tabla 3.4. Hasta una concentración de inóculo de 1×10^{-6} UFC/mL, el número de colonias es incontable.

Tabla 3.4 Cuenta en placa del crecimiento de *E. coli* con diferentes concentraciones de ZnNPs.

Dilucion del inóculo	UFC/mL inicial	Concentración de ZnNPs aplicada				
		10 mg/L	100 mg/L	1,000 mg/L	10,000 mg/L	29,749 mg/L
Sin diluir	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.
1×10^{-1}	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.
1×10^{-2}	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.
1×10^{-3}	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.
1×10^{-4}	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.
1×10^{-5}	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	327
1×10^{-6}	Inc.	640	560	245	94	23
1×10^{-7}	176	385	206	156	37	11

Inc.: Incontable

De acuerdo a los resultados observados en la Tabla 3.4 se observa que para una concentración de inóculo de 10^{-6} ya es detectable el efecto microbiciada de las ZnNPs a partir de una concentración de 10 mg/L a la que el conteo cambia de incontable (Inc.) a 640 UFC/mL, a medida que va aumentando la cantidad de ZnNPs aplicada va disminuyendo la cantidad de UFC/mL, así para la concentración original de NPs (29,749 mg/L) solo se contaron 23 UFC/mL.

b) CuNPs

Tanto la cantidad óptima de microorganismos como la concentración de CuNPs a utilizar, se determinaron de la misma manera que para las ZnNPs. Las concentraciones aplicadas también partieron de 10 mg/L y alcanzaron 24,160 mg/L que corresponden a la cantidad original de CuNPs después de la síntesis. Asimismo el período de incubación se mantuvo en 24 h. Las disoluciones para el inóculo fueron las mismas. En la Tabla 3.5 se presentan los resultados obtenidos para las CuNPs, hasta una concentración de inóculo de 1×10^{-5} el número de colonias es incontable y para 100 mg/L de CuNPs en la suspensión también permanecen incontables. Sin embargo, se eligió la concentración de 1×10^{-6} UFC/mL porque en ella todas las dosis de la suspensión tienen efectos microbicidas

Tabla 3.5 Cuenta en placa del crecimiento de *E. coli* con diferentes concentraciones de CuNPs.

Dilucion del inóculo	UFC/mL inicial	Concentración de CuNPs aplicada				
		10 mg/L	100 mg/L	1,000 mg/L	10,000 mg/L	24,160 mg/L
Sin diluir	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.
1×10^{-1}	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.
1×10^{-2}	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.
1×10^{-3}	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.
1×10^{-4}	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.
1×10^{-5}	Inc.	Inc.	541	294	136	28
1×10^{-6}	Inc.	524	9	0	0	0
1×10^{-7}	123	96	0	1	0	0

Inc.: Incontable

Para las CuNPs la disolución del inóculo utilizada fue 1×10^{-6} , se observa que las UFC cambian de incontable (Inc.) a 524 UFC/mL, a diferencia de las ZnNPs, las CuNPs a partir de una concentración de 1,000 mg/L muestran una completa inhibición para el crecimiento de *E. coli* mientras que las ZnNPs no mostraron este efecto, aún para una concentración de 29,749 mg/L. Por lo que de acuerdo a estos resultados se deduce que las CuNPs muestran una mayor actividad microbicida.

c) Cu/Zn NPs

Las disoluciones de inóculo, las concentraciones de NPs a partir de 10 mg/L y hasta 6,448 mg/L se utilizaron para aplicar las Cu/Zn NPs que son las partículas que para este trabajo se identificaron como bimetálicas. En la Tabla 3.6 se presentan los resultados obtenidos para las NPs bimetálicas.

Tabla 3.6 Cuenta en placa del crecimiento de *E. coli* con diferentes concentraciones de Cu/ZnNPs.

Dilución del inóculo	UFC/mL inicial	Concentración de Cu/ZnNPs aplicada				
		10 mg/L	100 mg/L	1,000 mg/L	5,000 mg/L	6,4478 mg/L
Sin diluir	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.
1x10 ⁻¹	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.
1x10 ⁻²	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.
1x10 ⁻³	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.
1x10 ⁻⁴	Inc.	Inc.	Inc.	526	348	206
1x10 ⁻⁵	Inc.	736	445	348	197	83
1x10 ⁻⁶	Inc.	7	2	0	1	0
1x10 ⁻⁷	138	2	Sin crecimiento			

Inc.: Incontable

Al igual para las ZnNPs y CuNPs, al utilizar una disolución de inóculo de 10⁻⁶ el conteo de colonias cambia de incontable (Inc.) a solo 7 UFC/mL, ésta concentración es la mínima observada para inhibir el crecimiento utilizando las NPs sintetizadas para este trabajo, además a partir de 1,000 mg/L se obtienen 0 UFC/mL. De acuerdo a estos resultados se deduce que a pesar de que esta suspensión Cu/Zn NPs forma algunas partículas bimetálicas y la mayoría como partículas independientes de cobre y zinc muestra un mejor efecto microbicida que la suspensión de las nanopartículas individuales.

3.5.3 Mínima concentración bactericida (MIB)

a) ZnNPs

A partir del inóculo 10^{-6} y utilizando una cantidad de UFC muy cercana se probó el efecto microbicida de las ZnNPs obtenidas a diferentes valores de pH, el rango de concentración de NPs aplicada fue la misma que en las pruebas anteriores (10 mg/L a 29,749 mg/L). El medio de cultivo se dejó en contacto con las suspensiones bacterianas durante 3 h y después el período de incubación se mantuvo a 24 h. Los resultados por duplicado obtenidos se presentan en la Tabla 3.7.

Tabla 3.7 No. de colonias de *E. coli* en función de la concentración de ZnNPs. Concentración del inóculo 1×10^{-6} UFC/mL.

pH	Dilución del inóculo	UFC/mL inicial	Concentración de ZnNPs aplicada				
			10 mg/L	100 mg/L	1,000 mg/L	10,000 mg/L	29,749 mg/L
4	1×10^{-6}	1610	630	579	306	16	6
	1×10^{-6}	1760	627	487	336	13	4
7	1×10^{-6}	1780	528	440	161	3	2
	1×10^{-6}	1650	552	422	141	1	1
12	1×10^{-6}	1820	536	425	165	0	1
	1×10^{-6}	1770	431	378	193	0	0

De acuerdo a los resultados, se observa que a medida que aumenta la cantidad de ZnNPs aplicada disminuyen las UFC para todos los valores de pH. Las ZnNPs obtenidas a pH 4 no alcanzan un 100% de efectividad microbicida utilizando la máxima concentración de NPs. Las ZnNPs obtenidas a pH 7 y 12 muestran que al aplicar una concentración de 1,000 mg/L las UFC contadas se reducen a la mitad en comparación con las ZnNPs a pH 4; además las NPs a pH 12 alcanzan un 100% de efectividad microbicida a partir de 10,000 mg/L. Los resultados de caracterización mostraron que la estructura y composición de las ZnNPs son independientes al pH utilizado en la síntesis, en cuanto al tamaño a pH 4 y pH 12 se obtuvieron las NPs más grandes y a pH 7 y 12 se obtuvieron las partículas más pequeñas, y en particular a pH 12 se detectó una mezcla de ambos tamaños, por lo que se deduce que ni la estructura y ni la composición influyen en la actividad

microbicida de las NPs, como por el contrario el tamaño si muestra una influencia ya que las partículas más grandes (pH 4) muestran un efecto microbicida menor mientras que NPs más pequeñas alcanzan casi un 100% de efectividad microbicida. De manera gráfica este efecto se observa en la Figura 3.41.

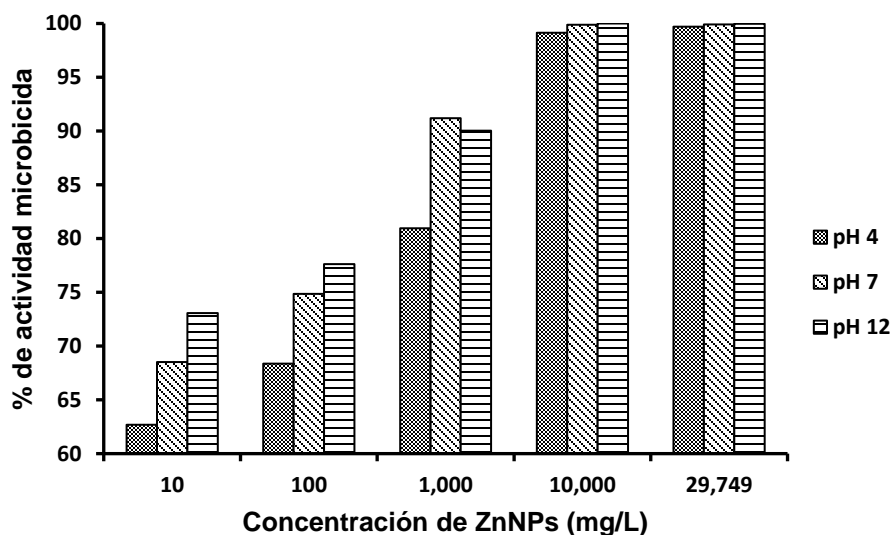


Figura 3.41 Efecto microbicida en función de la concentración de ZnNPs.

b) CuNPs

A partir de condiciones experimentales similares: inóculo 10^{-6} , rango de concentración 10 a 100 mg/L y pH de síntesis de las CuNPs; se obtuvo la mínima concentración bactericida para las CuNPs, utilizando un tiempo de contacto de 3 h para las suspensiones bacterianas y después un período de incubación de 24 h, el número de colonias contabilizadas se presentan por duplicado. En la Tabla 3.8 se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 3.8 No. de colonias de *E. coli* en función de la concentración de CuNPs.
Concentración del inóculo 1×10^{-6} UFC/mL.

pH	Dilución del inóculo	UFC/mL inicial	Concentración de CuNPs aplicada					
			10 mg/L	30 mg/L	50 mg/L	70 mg/L	90 mg/L	100 mg/L
4	1×10^{-6}	1560	143	28	16	1	0	1
	1×10^{-6}	2080	142	33	7	2	0	0
7	1×10^{-6}	3250	393	37	18	3	3	3
	1×10^{-6}	3450	288	10	11	3	3	4
12	1×10^{-6}	3430	655	76	58	46	18	7
	1×10^{-6}	3740	537	80	31	28	19	5

La concentración original de la suspensión de CuNPs fue de 24,160 mg/L la cual no fue necesaria aplicar ya que en la sección 3.5.2 se observa que a partir de 100 mg/L ya es detectable un 100% de efectividad microbiciada (Naika *et al.*, 2015). En la Tabla se observa que desde una concentración de CuNPs a 10 mg/L, las NPs obtenidas a pH 4 muestran una mayor actividad microbiciada y conforme aumenta el pH (7 y 12) disminuye la actividad observada, debido a una menor cantidad de NPs. Las mismas CuNPs a pH 4 muestran que a partir de 90 mg/L se observa un 100% de efectividad microbiciada. Mientras que para las CuNPs a pH 7 y 12 no se alcanza el 100% de efectividad aunque si se observa que a mayor concentración se detectan menos UFC. La caracterización mostró que la estructura y composición de las CuNPs también son independientes al pH de síntesis, en cuanto al tamaño para los tres valores de pH se detectaron NPs entre 2 y 5 nm pero a pH 4 y 7 se observan también NPs entre 6 y 10 nm. Por lo que se deduce de nueva cuenta que la efectividad microbiciada de las CuNPs es independiente a su estructura y composición, mientras que el tamaño sí muestra una influencia en la efectividad microbiciada, sobre todo si se detecta una mezcla de tamaños como en el caso de las ZnNPs a pH 12, y en el caso de las CuNPs dicha mezcla de tamaños se detecta para los pH 4 y 7, solo que en este caso el pH 4 mostró una mayor actividad microbiciada. En la Figura 3.42 se observa de manera gráfica el efecto microbiciada.

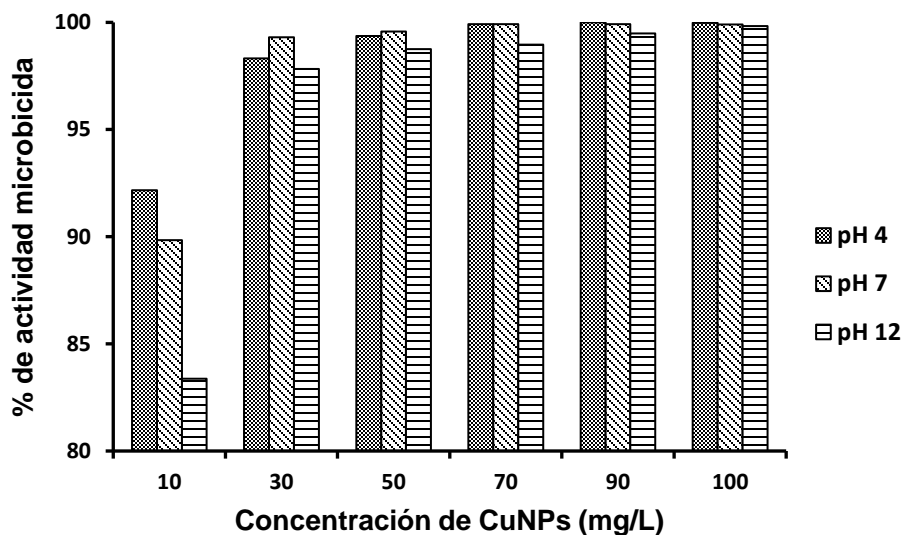


Figura 3.42 Efecto microbicida en función de la concentración de CuNPs.

Las CuNPs mostraron una mayor efectividad microbicida que las ZnNPs, ya que las primeras mostraron actividad antimicrobiana a partir de un 100 mg/L, mientras que las segundas fue partir de 10,000 mg/L; esta diferencia se debe a que el cobre tiene una efectividad microbicida mayor que el zinc, ya que como se discutió antes, el único parámetro que influye entre estas NPs metálicas es el tamaño, no obstante, ambos tipos de NPs se encuentran en el mismo rango de tamaño (Esparza, 2015; Chakra *et al.*, 2016).

c) Cu/Zn NPs

Las condiciones experimentales utilizadas para las ZnNPs y CuNPs se replicaron para las Cu/Zn NPs, concentración de inóculo, pH de síntesis para las NPs y el rango de concentración entre 10 mg/L y 6,448 mg/L. Se utilizaron 3 h como tiempo de contacto y el período de incubación fue de 24 h. En la Tabla 3.9 se presentan los resultados para estas NPs.

Tabla 3.9 No. de colonias de *E.coli* en función de la concentración de Cu/Zn NPs.
Concentración del inóculo 1×10^{-6} UFC/mL.

pH	Dilución del inóculo	UFC/mL inicial	Concentración de Cu/Zn NPs aplicada				
			10 mg/L	100 mg/L	1,000 mg/L	5,000 mg/L	6,448 mg/L
4	1×10^{-6}	1490	62	1	0	0	0
	1×10^{-6}	1620	37	1	0	0	0
7	1×10^{-6}	1870	2	0	0	0	0
	1×10^{-6}	1380	1	1	0	0	0
12	1×10^{-6}	1220	0	0	0	0	0
	1×10^{-6}	1330	0	0	0	1	0

Según los resultados de la Tabla 3.9 las Cu/Zn NPs más efectivas fueron las obtenidas a pH 12 ya que a partir de una concentración de 10 mg/L se observó 100% de efectividad microbiciada, las Cu/Zn NPs obtenidas a pH 7 muestran resultados similares y las obtenidas a pH 4 muestran una efectividad menor pero mejor que las ZnNPs y CuNPs independientes (Carbone *et al.*, 2017). Los resultados de caracterización por TEM para las Cu/Zn NPs mostraron que no fue posible confirmar la formación de NPs para los pH 4 y 7 ya que no se observaron NPs definidas, solo se detectaron partículas a pH 12 las cuales si fue posible indexar y se determinó que su estructura es cúbica FCC para las independientes y monoclinica para las bimetálicas, su tamaño varía entre 2 y 5 nm y su composición es de un óxido metálico. No es posible determinar la variable de mayor influencia en la efectividad microbiciada debido a que no fue posible caracterizar las NPs a pH 4 y 7. Sin embargo, el comportamiento de las Cu/Zn NPs es similar al obtenido para las ZnNPs, solo que con una mayor efectividad. La Figura 3.43 describe de manera gráfica el comportamiento de las Cu/Zn NPs.

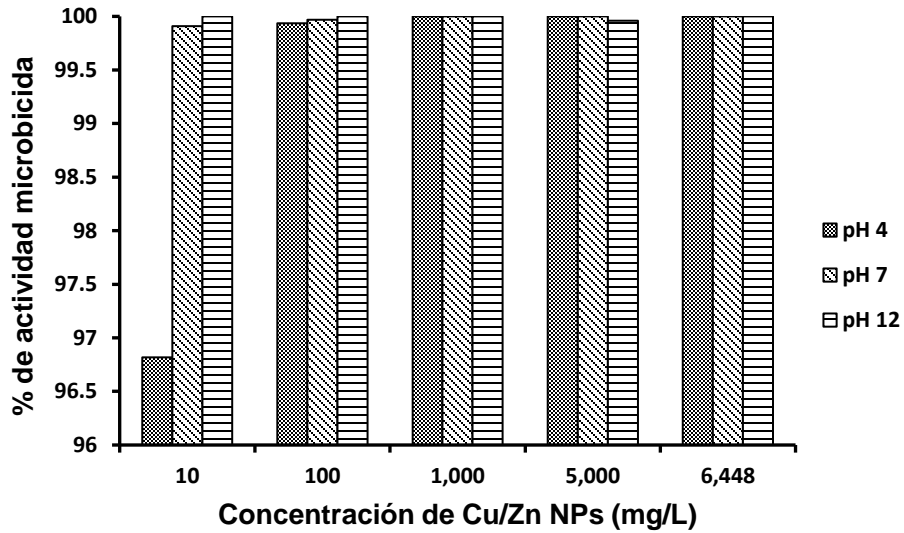


Figura 3.43 Efecto microbicida en función de la concentración de Cu/Zn NPs.

La indexación de las NPs tiene como objeto observar a que familia de planos y estructura cristalina corresponden las NPs sintetizadas por el método de bio-reducción, aun cuando no se detectó una influencia en la efectividad microbicida de las NPs; asociada a estas dos características, si puede servir como referencia para trabajos posteriores.

De acuerdo a lo reportado por Esparza (2015), propone que entre menor sea el tamaño de las ZnNPs y CuNPs, mayor efecto microbicida tendrán; en este trabajo no se comprobó esta propuesta, más bien se observó que la efectividad de las NPs aumenta cuando su tamaño es muy variado.

CONCLUSIONES

Las conclusiones de este trabajo de investigación son las siguientes:

El método de la bioreducción permitió obtener ZnNPs, CuNPs y Cu/ZnNPs utilizando los taninos del lirio acuático como agente reductor. El pico de plasmón correspondiente a cada NPs se detectó por espectroscopía UV-Vis a 300 nm para zinc y 800 nm para cobre, estos mismos picos se detectaron para las Cu/ZnNPs. La intensidad de los picos en cada grupo de NPs dependió del pH de síntesis siendo el más intenso a pH 12 para las ZnNPs y a pH 4 para CuNPs.

El estudio de morfología realizado por SEM mostró que las suspensiones de ZnNPs y CuNPs formaron películas con morfología irregular, mientras que la suspensión Cu/Zn mostró figuras geométricas definidas al formar la película de secado. El análisis EDS confirmó que la composición principal para las ZnNPs fue zinc, para las CuNPs fue cobre y para las bimetálicas se detectó la presencia de ambos metales como componentes principales. Cabe indicar que se identificaron algunas impurezas en bajas concentraciones, como el Cl, Na, N, K, Ca, P y C.

La caracterización de las NPs realizada por TEM mostró que el pH utilizado durante la síntesis no influyó en la estructura y composición de las ZnNPs, CuNPs y Cu/ZnNPs sintetizadas. La mayor influencia del pH se detectó en tamaño de las NPs pero fue independiente para cada tipo de metal. Para las ZnNPs la estructura cristalina detectada fue cúbica y hexagonal, la composición correspondió a óxidos de zinc, el grosor osciló entre 2 y 10 nm y solo en el pH 12 se detectaron NPs con tamaño dentro de todo este intervalo. Para las CuNPs solo se determinó una estructura cristalina cúbica FCC, su composición fue también de un óxido metálico, el grosor estuvo entre 2 y 10 nm y en los pH 4 y 7 se detectaron NPs de todos los tamaños mencionados, en el caso de las NPs bimetálicas solo se indexaron las partículas a pH 12 que correspondieron a estructuras cúbicas FCC para las NPs independientes y monoclinica para las bimetálicas Cu/Zn NPs.

El efecto microbicida de las NPs depende de la concentración inicial del inóculo utilizado y la concentración de la suspensión metálica con ZnNPs, CuNPs y Cu/ZnNPs como dosis de NPs aplicada.

Por otro lado el efecto microbicida de cada grupo de NPs fue independiente de la estructura y composición de las NPs, mientras que el tamaño sí influyó en la actividad bactericida de las NPs, siendo las más efectivas aquellas NPs cuyos tamaños abarcaban todo el rango de NPs determinado, así para las ZnNPs solo el pH 12 mostró todo el rango de NPs y por tanto esta suspensión mostró una efectividad microbicida del 100% a partir de una concentración de 10,000 mg/L. Para CuNPs, el pH 4 también mostró NPs de todos tamaños (2 a 10 nm) y su efectividad microbicida alcanzó el 100% de inhibición a partir de 100 mg/L.

La suspensión con NPs bimetálicas Cu/Zn fue la mejor mostrando su efectividad microbicida ya que a partir de 10 mg/L mostró un 100% de inhibición utilizando las NPs a pH 12.

En este trabajo las NPs de zinc y cobre obtenidas por el método de bio-reducción mostraron actividad microbicida frente a la cepa de *E. coli* ATCC 25922.

REFERENCIAS

- Abdelmonem, A. M., y Amin, R. M. (2014). Rapid green synthesis of metal nanoparticles using pomegranate polyphenols, *4531*, 57–65. Retrieved from <http://http://gssrr.org/index.php?journal=JournalOfBasicAndApplied>
- Ahmad, A., Senapati, S., Khan, M. I., Kumar, R., y Sastry, M. (2005). Extra-/Intracellular biosynthesis of gold nanoparticles by an *alkalotolerant fungus, trichothecium sp.* *Journal of Biomedical Nanotechnology*, *1*(1), 47–53. <http://doi.org/10.1166/jbn.2005.012>
- Aiken III, J. D., y Finke, R. G. (1999). A review of modern transition-metal nanoclusters: their synthesis, characterization, and applications in catalysis. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, *145*, 1–44. [https://doi.org/10.1016/S1381-1169\(99\)00098-9](https://doi.org/10.1016/S1381-1169(99)00098-9)
- Alba, J. J., Ortega, J. L., Álvarez, G., Cervantes, M., Ruiz, E., Urtiz, N., y Martínez, A. (2013). Riesgos microbiológicos en agua de bebida: una revisión clínica. *Química Viva*, *12*(3), 215–233. Retrieved from <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/>
- Ankamwar, B., Chaudhary, M., y Sastry, M. (2005). Gold nanotriangles biologically synthesized using *tamarind* leaf extract and potential application in vapor sensing. *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic and Nano-Metal Chemistry*, *35*, 19–26. <http://doi.org/10.1081/SIM-200047527>
- Antoniammal, P., y Arivuoli, D. (2012). Size and shape dependence on melting temperature of gallium nitride nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*, *2012*, 1–11. <http://doi.org/10.1155/2012/415797>
- Ascencio, J. A. (2000). Simulación de procesos de agregación de nanopartículas y su análisis mediante microscopía electrónica de alta resolución. Tesis doctoral. Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM).
- Ascencio, J. A., Gutiérrez-Wing, C., Espinosa, M. E., Marín, M., Tehuacanero, S., Zorrilla, C., y José-Yacamán, M. (1998). Structure determination of small particles by HREM imaging: theory and experiment. *Surface Science*, *396*,

349–368. [https://doi.org/10.1016/S0039-6028\(97\)00689-4](https://doi.org/10.1016/S0039-6028(97)00689-4)

Ascencio, J. A., Mejia, Y., Liu, H. B., Angeles, C., y Canizal, G. (2003). Bioreduction synthesis of Eu-Au nanoparticles. *Langmuir*, 19, 5882–5886. <http://doi.org/10.1021/la0340495>

Atehortua, E., y Gartner, C. (2013). Preliminary studies of *Eichhornia crassipes* dry biomass for lead and chromium removal from waters. *Revista Colombiana de Materiales*, 4, 81–92. Retrieved from <http://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/materiales/article/view/15084>

Bajpai, S. K., Jadaun, M., y Tiwari, S. (2016). Synthesis, characterization and antimicrobial applications of zinc oxide nanoparticles loaded *gum acacia*/poly (SA) hydrogels. *Carbohydrate Polymers*, 153, 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.07.019>

Ball, P. (2005). Engineers devise invisibility shield. <http://doi.org/10.1038/news050228-1>

Banala, R. R., Nagati, V. B., y Karnati, P. R. (2015). Green synthesis and characterization of *carica papaya* leaf extract coated silver nanoparticles through X-ray diffraction, electron microscopy and evaluation of bactericidal properties. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(5), 637–644. <http://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.01.007>

Barrett, S. C. H. (1989). Waterweed invasions. *Scientific American*, 260, 90–97.

Betancourt-Galindo, R., Reyes, P. Y., Puente, B. A., Avila, C. A., Rodríguez, O. S., Cadenas, G., Lira, R. H., y García, L. A. (2013). Synthesis of copper nanoparticles by thermal decomposition and their antimicrobial properties. *Journal of Nanomaterials*, 1–6. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1155/2014/980545>

Bonda, M., Perrin, V., Vileno, B., Runne, H., Kretlow, A., Luthi-Carter, R., y Jeney, S. (2012). Synchrotron infrared micro-spectroscopy detects the evolution of Huntington's disease neuropathology and suggests unique correlates of dysfunction in white versus grey brain matter. *Anal. Chem.*, 83(20), 7712–

7720. <http://doi.org/10.1021/ac201102p>.Synchrotron

Boyd, D. y Yao, Z. (2012). Application of modern transmission electron microscopy (TEM) techniques to the study of phase transformations in steels. *Phase Transformations in Steels*, 2, 507–531. <http://doi.org/10.1533/9780857096111.4.507>

Buendía, S. (2009). *Síntesis de nanopartículas de hierro con propiedades magnéticas obtenidas vía precursores organometálicos*. 1-154. Tesis de grado. Instituto Politécnico Nacional.

Canal, I. (2016). Obtención y caracterización de partículas coloidales a partir de proteínas vegetales hidrofóbicas ricas en prolina., 1–50. Tesis de grado. Universidad de Oviedo.

Canizal, G., Ascencio, J. A., y José-Yacamán, M. (2001). Multiple twinned gold nanorods grown by bio-reduction techniques. *Journal of Nanoparticle Research*, 3, 475–481. <http://doi.org/10.1023/A:1012578821566>

Cao, G. (2004). *Nanostructures and nanomaterials: Synthesis, Properties, and Applications*. Londres: Imperial College Press.

Carbone, M., Briancesco, R., y Bonadonna, L. (2017). Antimicrobial power of Cu/Zn mixed oxide nanoparticles to *Escherichia coli*. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 7, 97–102. <http://doi.org/10.1016/j.enmm.2017.01.005>

Carja, G., Nakajima, A., Dranca, S., Dranca, C., y Okada, K. (2010). TiO₂/ZnLDH as a self-assembled nanocomposite with photoresponsive properties. *J. Phys. Chem. C*, 114, 14722–14728. <http://doi.org/10.1021/jp103210m>

Carr, G. L., y Williams, G. P. (1997). Infrared microspectroscopy with synchrotron radiation. *SPIE Conf. Proc*, 3153, 1–8. <http://doi.org/10.1117/12.290262>

Celis, Y. A. (2012). *Escherichia coli* uropatogénica resistente a múltiples antibióticos: un problema de salud pública. *Revista de La Facultad Nacional de Salud Pública*, 30(1), 74 –77.

Chakra, C. S., Rao, K. V., y Pavani, T. (2016). Antimicrobial activity of pure Cu

- nanoparticles synthesized by surfactant varied chemical reduction method. *Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management*, 6, 88–94. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2016.06.004>
- Chandran, S. P., Chaudhary, M., Pasricha, R., Ahmad, A., y Sastry, M. (2006). Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using *Aloe vera* plant extract. *Biotechnol.Prog.*, 22, 577–583. <http://doi.org/10.1021/bp0501423>
- Cheng, X., Yu, X., Xing, Z., y Wan, J. (2012). Energy procedia enhanced photocatalytic activity of nitrogen doped TiO₂ anatase nanoparticle under simulated sunlight irradiation. *Energy Procedia*, 16, 598–605. <http://doi.org/10.1016/j.egypro.2012.01.096>
- Coburn, D. L., y Dignan, P. D. (2012). *The wonders of colloidal silver: Nature's super antibiotic*. Moonfeather Press.
- Colagar, A. H., Chaichi, M. J., y Khadjvand, T. (2011). Fourier transform infrared microspectroscopy as a diagnostic tool for distinguishing between normal and malignant human gastric tissue. *J. Biosci.*, 36(4), 669–677. <http://doi.org/10.1007/s12038-011-9090-5>
- Cunningham, S. D., y Ow, D. W. (1996). Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiol*, 110, 715–719. <http://doi.org/10.1104/pp.110.3.715>
- De la Rosa-Gómez, I., Olgúin, M. T., y Alcántara, D. (2008). Antibacterial behavior of silver modified clinoptilolite heulandite rich tuff on coliform microorganisms from wastewater in a column system. *Journal of Environmental Management*, 88, 853–863. <http://doi.org/10.1016/j.jenvman.2007.04.005>
- Del Aguila, C. A., y Oroche, M. (2016). Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de la hoja de *manihot esculenta crantz* (yuca), mediante los métodos de macrodilución y difusión en disco frente a *pseudomonas aeruginosa* y *escherichia coli.*, 1-123. Tesis. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana.
- Devi, L. S. y Joshi, S. R. (2015). Ultrastructures of silver nanoparticles biosynthesized using *endophytic fungi*. *Journal of Microscopy and*

Ultrastructure, 3(1), 29–37. <http://doi.org/10.1016/j.jmau.2014.10.004>

Dhand, V., Soumya, L., Bharadwaj, S., Chakra, S., Bhatt, D., y Sreedhar, B. (2016). Green synthesis of silver nanoparticles using *Coffea arabica* seed extract and its antibacterial activity. *Materials Science and Engineering C*, 58, 36–43. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2015.08.018>

Didonna, A., Vaccari, L., Bek, A., y Legname, G. (2011). Infrared microspectroscopy: A multiple-screening platform for investigating single-cell Biochemical perturbations upon prion infection. *ACS Chem. Neurosci.*, 2, 160–174. <http://doi.org/10.1021/cn1000952>

Domínguez, S. (2011). Síntesis de nanopartículas metálicas y zeolitas para catálisis y separación de gases. 1-162. *Tesis doctoral. Universidad de Alicante.*

Dong, C., Zhang, X. y Cai, H. (2014). Green synthesis of monodisperse silver nanoparticles using hydroxy propyl methyl cellulose. *Journal of Alloys and Compounds*, 583, 267–271. <http://doi.org/10.1016/j.jallcom.2013.08.207>

Drexler, E. (1987). *Engines of creation: The coming era of nanotechnology* (Anchor Lib). New York.

Elumalai, K., y Velmurugan, S. (2015). Green synthesis, characterization and antimicrobial activities of zinc oxide nanoparticles from the leaf extract of *Azadirachta indica* (L.). *Applied Surface Science*, 345, 329–336. <http://doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.03.176>

Esparza, E. L. (2015). *Actividad antimicrobiana de nanopartículas de cobre y óxido de zinc contra hongos y bacterias fitopatógenas*. 1-64. Tesis de grado. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Esparza-González, S. C., Sánchez-Valdés, S., Ramírez-Barrón, S. N., Loera-Arias, M. J., Bernal, J., Meléndez-Ortiz, H. I., y Betancourt-Galindo, R. (2016). Effects of different surface modifying agents on the cytotoxic and antimicrobial properties of ZnO nanoparticles. *Toxicology in Vitro*, 37, 134–141. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2016.09.020>

- Faraday, M. (1857). The bakerian lecture: Experimental relations of gold (and other metals) to light. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, 147, 145–181. Retrieved from <http://rstl.royalsocietypublishing.org/>
- Faure, M., Gerardin, F., André, J.-C., Pons, M.-N., y Zahraa, O. (2011). Study of photocatalytic damages induced on *E. coli* by different photocatalytic supports (various types and TiO₂ configurations). *Journal of Photochemistry & Photobiology, A: Chemistry*, 222, 323–329. <http://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2011.07.003>
- FCEA, Fondo para la Comunicación y la Educación Ambiental, A. C. (2006). *El agua en México: lo que todas y todos debemos saber*. (1a ed.). México.
- Flores, C. (2014). Nanopartículas de plata con potenciales aplicaciones en materiales implantables: síntesis, caracterización fisicoquímica y actividad bactericida, 1–233. Tesis doctoral. Universidad Nacional de la Plata.
- Gardea-Torresdey, J. L., Gomez, E., Peralta-Videa, J. R., Parsons, J. G., Troiani, H., y José-Yacamán, M. (2003). Alfalfa sprouts: A natural source for the synthesis of silver nanoparticles. *Langmuir*, 19(4), 1357–1361. <http://doi.org/10.1021/la020835i>
- Gardea-Torresdey, J. L., Parsons, J. G., Gomez, E., Peralta-Videa, J., Troiani, H. E., Santiago, P., y Yacamán, M. J. (2002). Formation and growth of Au nanoparticles inside live alfalfa plants. *Nano Letters*, 2(4), 397–401. <http://doi.org/10.1021/nl015673+>
- Gardea-Torresdey, J. L., Tiemann, K. J., Gamez, G., Dokken, K., Tehuacanero, S., y Yacamán, M. J. (1999). Gold nanoparticles obtained by bio-precipitation from gold (III) solutions. *Journal of Nanoparticle Research*, 1, 397–404. <http://doi.org/10.1023/A:1010008915465>
- Gardea-Torresdey, J. L., Tiemann, K. J., Gonzalez, J. H., Henning, J. A., y Townsend, M. S. (1996). Ability of silica-immobilized *Medicago sativa* (alfalfa) to remove copper ions from solution. *Journal of Hazardous Materials*, 48, 181–190. [https://doi.org/10.1016/0304-3894\(95\)00155-7](https://doi.org/10.1016/0304-3894(95)00155-7)

- Garty, J. (2001). Biomonitoring atmospheric heavy metals with lichens: Theory and application. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 20(4), 309–371. [http://doi.org/10.1016/S0735-2689\(01\)80040-X](http://doi.org/10.1016/S0735-2689(01)80040-X)
- Gazi, E., Dwyer, J., Lockyer, N. P., Miyan, J., Gardner, P., Hart, C., y Clarke, N. W. (2005). Fixation protocols for subcellular imaging by synchrotron-based fourier transform infrared microspectroscopy. *Biopolymers*, 77, 18–30. <http://doi.org/10.1002/bip.20167>
- Ghidan, A. Y., Al-Antary, T. M., y Awwad, A. M. (2016). Green synthesis of copper oxide nanoparticles using *Punica granatum* peels extract: Effect on green peach Aphid. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 6, 95–98. <http://doi.org/10.1016/j.enmm.2016.08.002>
- Global Healing Center. (2017). Cómo la plata coloidal combate los organismos nocivos. Retrieved July 6, 2017, from <https://www.globalhealingcenter.net>
- Gómez-Gallego, D. M., Urcuqui-Inchima, S., y Hernández, J. C. (2016). Efecto inmunomodulador de nanopartículas usadas en nanomedicina. *Revista Iatreia*, 29(4), 445–457. <http://doi.org/10.17533/udea.iatreia.v29n4a06.445>
- Gopal, B. (1987). *Water hyacinth. Aquatic plant studies*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers.
- Gordon, A. S., Howell, L. D., y Harwood, V. (1994). Responses of diverse heterotrophic bacteria to elevated copper concentrations. *Can. J. Microbiol*, 40, 408–411. <https://doi.org/10.1139/m94-067>
- Gutiérrez-Wing, C., Santiago, P., Ascencio, J. A., Camacho, A., y José-Yacamán, M. (2000). Self-assembling of gold nanoparticles in one, two, and three dimensions. *Appl. Phys. A*, 71, 237–243. <http://doi.org/10.1007/s003390000522>
- Henderson, M. A. (2011). A surface science perspective on TiO₂ photocatalysis. *Surface Science Reports*, 66, 185–297. <http://doi.org/10.1016/j.surfrep.2011.01.001>
- Hernández, J. (2008). *Caracterización electroquímica de nanopartículas de oro :*

Relación entre la forma tridimensional de la partícula y su orientación superficial. 1-234. Tesis doctoral. Universidad de Alicante.

Hirai, H., Nakao, Y., Toshima, N., y Adachi, K. (1976). Colloidal rhodium in polyvinyl alcohol as hydrogenation catalyst of olefins. *Chemistry Letters*, 905–910. <http://doi.org/10.1246/cl.1976.905>

Huy, T. Q., Nguyen, V. Q. y Le, A.-T. (2013). Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 4(3), 033001. <http://doi.org/10.1088/2043-6262/4/3/033001>

ICDD. (2017). The International Centre for Diffraction Data. Retrieved September 21, 2017, from <http://www.icdd.com/index.htm>

Ijaz, F., Shahid, S., Khan, S. A., y Ahmad, W. (2017). Green synthesis of copper oxide nanoparticles using *Abutilon indicum* leaf extract: Antimicrobial, antioxidant and photocatalytic dye degradation activities, 16(April), 743–753. <http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v16i4.2>

Inoue, Y., Hoshino, M., Takahashi, H., Noguchi, T., Murata, T., Kanzaki, Y., y Sasatsu, M. (2002). Bactericidal activity of Ag–zeolite mediated by reactive oxygen species under aerated conditions. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 92, 37–42. [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(02\)00489-0](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(02)00489-0)

Islam, N. U., Jalil, K., Shahid, M., Muhammad, N., y Rauf, A. (2015). *Pistacia integerrima* gall extract mediated green synthesis of gold nanoparticles and their biological activities. *Arabian Journal of Chemistry*, 1–10. <http://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.02.014>

Jayandran, M., Haneefa, M. M., y Balasubramanian, V. (2016). Green synthesis, characterization and antimicrobial activity studies of curcuminaniline biofunctionalized copper oxide nanoparticles. *Indian Journal of Science and Technology*, 9(3), 1–9. <http://doi.org/10.17485/ijst/2016/v9i3/80523>

Juskenas, R., Avizinis, D., Kalinauskas, P., Selskis, A., Giraitis, R., Pakstas, V., y Kondrotas, R. (2012). XRD, SEM and photoelectrochemical characterization of

- ZnSe electrodeposited on Cu and Cu-Sn substrates. *Electrochimica Acta*, 70, 118–123. <http://doi.org/10.1016/j.electacta.2012.03.103>
- Khalil, A., Gondal, M. A., y Dastageer, M. A. (2011). Augmented photocatalytic activity of palladium incorporated ZnO nanoparticles in the disinfection of *Escherichia coli* microorganism from water. *Applied Catalysis A: General*, 402(1-2), 162–167. <http://doi.org/10.1016/j.apcata.2011.05.041>
- Kiruba, D., Nehru, K. y Sivakumar, M. (2012). Rapid biosynthesis of silver nanoparticles using *eichornia crassipes* and its antibacterial activity. *Current Nanoscience*, 8(1), 1–5. <http://doi.org/10.2174/1573413711208010125>
- Kowalska, J., Gajda, M., Kwiatek, W. M., Franczyk-Zarów, M., Kostogrys, R. B., Chlopicki, S., y Dumas, P. (2012). Chemical composition of atherosclerotic plaques of apoE/LDLR-Double knockout mice by synchrotron radiation FTIR microspectroscopy. *Acta Physica Polonica A*, 121(2), 555–560. <http://doi.org/10.12693/APhysPolA.121.555>
- Krishnamachari, P., Hashaikeh, R. y Tiner, M. (2011). Modified cellulose morphologies and its composites; SEM and TEM analysis. *Micron*, 42(8), 751–761. <http://doi.org/10.1016/j.micron.2011.05.001>
- Kruk, T., Szczepanowicz, K., Stefańska, J., Socha, R. P., y Warszylski, P. (2015). Synthesis and antimicrobial activity of monodisperse copper nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 128, 17–22. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.02.009>
- Lee, S. C., Yu, H., Yu, J., y Ao, C. H. (2006). Fabrication, characterization and photocatalytic activity of preferentially oriented TiO₂ films. *Journal of Crystal Growth*, 295, 60–68. <http://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2006.05.086>
- Lee, Y. S. (2008). *Self-assembly and nanotechnology: a force balance approach*. (Primera Ed). New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Li, F., Shen, K., Long, X., Wen, J., Xie, X., Zeng, X., y Zhong, R. (2016). Preparation and characterization of biochars from *Eichornia crassipes* for cadmium removal in aqueous solutions. *PLOS ONE*, 11(2), 7–9.

<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0148132>

- Liu, C., Chen, Z., Miao, Z., Chen, F., Gu, C., Huang, M., y Zhao, X. (2012). Properties and preparation of porous carbon material supported with modified TiO₂. *Procedia Engineering*, 27, 557–563. <http://doi.org/10.1016/j.proeng.2011.12.487>
- López, J., Vilchis, A. R., Sánchez, V., y Avalos, M. (2013). Obtención y caracterización de nanopartículas de plata soportadas en fibra de algodón. *Superficies Y Vacío*, 26(3), 73–78.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J., Fernández, M.G. y Pérez, M. S. (2003). *Biología de los microorganismos*. (P. H. Pearson, Ed.) (10th ed.).
- Mahajan, L. H., y Mhaske, S. T. (2012). Composite microspheres of poly (o-anisidine)/ TiO₂. *Materials Letters*, 68, 183–186. <http://doi.org/10.1016/j.matlet.2011.10.025>
- Makarov, V. V., Love, A. J., Sinitsyna, O. V., Makarova, S. S., Yaminsky, I. V., Taliansky, M. E., y Kalinina, N. O. (2014). Green nanotechnologies: Synthesis of metal nanoparticles using plants. *Acta Naturae*, 6(20), 35–44. <http://doi.org/10.1039/c1gc15386b>
- Mangas-Ramírez, E., y Elías-Gutiérrez, M. (2004). Effect of mechanical removal of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) on the water quality and biological communities in a Mexican reservoir. *Aquatic Ecosystem Health & Management*, 7(1), 161–168. <http://doi.org/10.1080/14634980490281597>
- Márquez, O., y Ortega, M. (2017). Percepción social del servicio de agua potable en el municipio de Xalapa, Veracruz. *Revista Mexicana de Opinión Pública*, 12(23), 41–59. <http://doi.org/10.22201/fcpys.24484911e.2017.23.58515>
- Matthäus, C., Bird, B., Miljkovi, M., Chernenko, T., Romeo, M., y Diem, M. (2008). Infrared and raman microscopy in cell biology. *Methods Cell Biol.*, 89, 275–308. [http://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)00610-9](http://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)00610-9).Infrared
- Mejárez, M., y Bülow, L. (2001). Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals. *Trends in*

- Biotechnology*, 19(2), 67–73. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(00\)01534-1](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(00)01534-1)
- Miller, L. M., y Dumas, P. (2010). From structure to cellular mechanism with infrared microspectroscopy. *Current Opinion in Structural Biology*, 20, 649–656. <http://doi.org/10.1016/j.sbi.2010.07.007>
- Mitra, A. y Bhaumik, A. (2007). Nanoscale silver cluster embedded in artificial heterogeneous matrix consisting of protein and sodium polyacrylate. *Materials Letters*, 61(3), 659–662. <http://doi.org/10.1016/j.matlet.2006.05.039>
- Moaty, S. A. A., Farghali, A. A., y Khaled, R. (2016). Preparation, characterization and antimicrobial applications of Zn-Fe LDH against MRSA. *Materials Science and Engineering C*, 68, 184–193. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.05.110>
- Moradi, S., Aberoomand-Azar, P., Raeis-Farshid, S., Abedini-Khorrami a, S., y Hadi, M. (2012). The effect of different molar ratios of ZnO on characterization and photocatalytic activity of TiO₂/ZnO nanocomposite. *Journal of Saudi Chemical Society*, 2–7. <http://doi.org/10.1016/j.jscs.2012.08.002>
- Morales-Luckie, R. A., Sanchez-Mendieta, V., Arenas-Alatorre, J. A., López-Castañares, R., Perez-Mazariego, J. L., Marquina-Fabrega, V., y Wayne, R. (2008). One-step aqueous synthesis of stoichiometric Fe–Cu nanoalloy. *Materials Letters Journal*, 62, 4195–4197. <http://doi.org/10.1016/j.matlet.2008.06.039>
- Mukherjee, P., Ahmad, A., Mandal, D., Senapati, S., Sainkar, S. R., Khan, M. I., y Sastry, M. (2001). Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their immobilization in the mycelial matrix: A novel biological approach to nanoparticle synthesis. *Nano Letters*, 1(10), 515–519. <http://doi.org/10.1021/nl0155274>
- Mukherjee, P., Senapati, S., Mandal, D., Ahmad, A., Khan, M. S., Kumar, R., y Sastry, M. (2002). Extracellular synthesis of solid nanoparticles by the fungus fusarium oxysporum. *Chem. Bio. Chem.*, 3(5), 461–463. [http://doi.org/10.1002/1439-7633\(20020503\)3:5<461::AID-CBIC461>3.0.CO;2-X](http://doi.org/10.1002/1439-7633(20020503)3:5<461::AID-CBIC461>3.0.CO;2-X)

- Murcia-López, S., Hidalgo, M. C., y Navío, J. A. (2012). Photocatalytic activity of single and mixed nanosheet-like Bi₂WO₆ and TiO₂ for Rhodamine B degradation under sunlike and visible illumination. *Applied Catalysis A: General*, 423-424, 34–41. <http://doi.org/10.1016/j.apcata.2012.02.016>
- Naika, H. R., Lingaraju, K., Manjunath, K., Kumar, D., Nagaraju, G., Suresh, D., y Nagabhushana, H. (2015). Green synthesis of CuO nanoparticles using *Gloriosa superba L.* extract and their antibacterial activity. *Journal of Taibah University for Science*, 9(1), 7–12. <http://doi.org/10.1016/j.jtusci.2014.04.006>
- Nair, P. M., y Chung, M. I. (2017). Regulation of morphological, molecular and nutrient status in *Arabidopsis thaliana* seedlings in response to ZnO nanoparticles and Zn ion exposure. *Science of the Total Environment*, 575, 187–198. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.017>
- Narayana, K. V., Venugopal, A., Rao, K. S. R., Masthan, S. K., Rao, V. V., y Rao, P. K. (1998). Ammoxidation of 3-picoline over V₂O₅/TiO₂ (anatase) system. II. Characterisation of the catalysts by DTA, SEM, FTIR, ESR and oxygen and ammonia chemisorption. *Applied Catalysis A: General*, 167, 11–22. [https://doi.org/10.1016/S0926-860X\(97\)00289-5](https://doi.org/10.1016/S0926-860X(97)00289-5)
- Negrón, M. (2009). *Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica* (2a ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.
- NMX-AA-014-1980. (1980). Cuerpos receptores: Muestreo. México: Diario Oficial de la Federación.
- NOM-001-SEMARNAT- 1996. (1996). Límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Diario Oficial de la Federación.
- NOM-092-SSA1-1994. (1994). Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. México: Diario Oficial de la Federación.
- Oh, W.-C., Zhang, F.-J., y Chen, M.-L. (2010). Synthesis and characterization of V–C₆₀/TiO₂ photocatalysts designed for degradation of methylene blue. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 16, 299–304.

<http://doi.org/10.1016/j.jiec.2009.09.065>

OMS. (2011). Organización Mundial de la Salud. Retrieved April 13, 2016, from <http://www.who.int/es/>

Padalia, H., Moteriya, P., y Chanda, S. (2015). Green synthesis of silver nanoparticles from marigold flower and its synergistic antimicrobial potential. *Arabian Journal of Chemistry*, 8(5), 732–741. <http://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.11.015>

Pal, S., Tak, Y. K., y Song, J. M. (2007). Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 73(6), 1712–1720. <http://doi.org/10.1128/AEM.02218-06>

Palacio, M., Villabrille, P. I., Romanelli, G. P., Vázquez, P. G., y Cáceres, C. V. (2012). Preparation, characterization and use of V₂O₅-TiO₂ mixed xerogels as catalysts for sustainable oxidation with hydrogen peroxide of 2, 3, 6-trimethylphenol. *Applied Catalysis A, General*, 417-418, 273–280. <http://doi.org/10.1016/j.apcata.2011.12.049>

Paredes, F., y Roca, J. J. (2004). Infecciones gastrointestinales: tipos, diagnóstico y tratamiento. *Ámbito Farmacéutico: Microbiología*, 23(5), 100–106. Retrieved from <http://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-infecciones-gastrointestinales-13061801>

Paul, B., Bhuyan, B., Purkayastha, D. D., y Dhar, S. S. (2015). Green synthesis of silver nanoparticles using dried biomass of *Diplazium esculentum* (retz.) sw. and studies of their photocatalytic and anticoagulative activities. *Journal of Molecular Liquids*, 212, 813–817. <http://doi.org/10.1016/j.molliq.2015.10.032>

Pérez, A. G. (2007). *Química II: Un enfoque constructivista*. (1ra edició). México: Parson Educación.

Philip, D. (2009). Biosynthesis of Au, Ag and Au-Ag nanoparticles using edible mushroom extract. *Spectrochimica Acta-Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 73(2), 374–381. <http://doi.org/10.1016/j.saa.2009.02.037>

- Pierce, B. A. (2010). *Genética—un enfoque conceptual*. (3a ed.). España: Editorial Médica Panamericana.
- Pinto, A. P., Mota, A. M., De Varennes, A., y Pinto, F. C. (2004). Influence of organic matter on the uptake of cadmium, zinc, copper and iron by sorghum plants. *Science of the Total Environment*, 326, 239–247. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.01.004>
- Poole, C. P., y Owens, F. J. (2007). *Introducción a la nanotecnología*. (Reverté, Ed.) (Primera Ed.). España.
- Prats, G. (2005). *Microbiología clínica* (1ra ed.). Madrid: Panamericana.
- Prusty, A. K., y Parida, P. (2014). Green synthesis of silver nanoparticle using *Eichhornia crassipes* and study of in-vitro antimicrobial activity. *Scholars Academic Journal of Pharmacy*, 3(6), 504–509. Retrieved from <http://www.saspublisher.com>
- Quaranta, D., Krans, T., Santo, C. E., Elowsky, C. G., Domaille, D. W., Chang, C. J., y Grass, G. (2011). Mechanisms of contact-mediated killing of yeast cells on dry metallic copper surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(2), 416–426. <http://doi.org/10.1128/AEM.01704-10>
- Ramesh, M., Anbuvarannan, M., y Viruthagiri, G. (2015). Green synthesis of ZnO nanoparticles using *Solanum nigrum* leaf extract and their antibacterial activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 136, 864–870. <http://doi.org/10.1016/j.saa.2014.09.105>
- Ramírez-Castillo, F. Y., Loera-Muro, A., Jacques, M., Garneau, P., Avelar-González, F. J., Harel, J., y Guerrero-Barrera, A. L. (2015). Waterborne pathogens: detection methods and challenges. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 4(2), 307–34. <http://doi.org/10.3390/pathogens4020307>
- Ramos, I., Esteban, E., Lucena, J. J., y Gárate, A. (2002). Cadmium uptake and subcellular distribution in plants of *Lactuca sp.* Cd-Mn interaction. *Plant Science*, 162, 761–767. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00017-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00017-1)

- Rivera-Garza, M., Olgúin, M. T., García-Sosa, I., Alcántara, D., y Rodríguez-Fuentes, G. (2000). Silver supported on natural Mexican zeolite as an antibacterial material. *Microporous and Mesoporous Materials*, 39, 431–444. [https://doi.org/10.1016/S1387-1811\(00\)00217-1](https://doi.org/10.1016/S1387-1811(00)00217-1)
- Robinson, N. J., Tommey, A. M., Kuske, C., y Jackson, P. J. (1993). Plant metallothioneins. *Biochem. J.*, 295, 1–10. <http://doi.org/10.1042/bj2950001>
- Rodríguez, A., Avila-Pérez, P., y Barcelo-Quintal, I. D. (1998). Bioaccumulation of chemical elements by water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) found in “Jose Antonio Alzate” dam samples in the State of Mexico, Mexico. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 238(1-2), 91–95. <http://doi.org/10.1007/BF02385360>
- Rodríguez-Montelongo, L., De Cruz-Rodríguez, L. C., Farias, R. N., y Massa, E. M. (1993). Membrane-associated redox cycling of copper mediates hydroperoxide toxicity in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1144(1), 77–84. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(93\)90033-C](https://doi.org/10.1016/0005-2728(93)90033-C)
- Romih, T., Hocevar, S. B., Kononenko, V., y Drobne, D. (2017). The application of bismuth film electrode for measuring Zn(II) under less acidic conditions in the presence of cell culture medium and ZnO nanoparticles. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 238, 1277–1282. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.09.090>
- Rosano-Ortega, G., Schabes-Retchkiman, P., Zorrilla, C., Liu, H. B., Canizal, G., Avila-Pérez, P., y Ascencio, J. A. (2006). Synthesis and characterization of Mn quantum dots by bioreduction with water hyacinth. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 6(2), 1–5. <http://doi.org/10.1166/jnn.2006.061>
- Rosegrant, M., Cai, X., Cline, S., y Nakagawa, N. (2002). The role of rainfed agriculture in the future of global food production. Washington, D. C.
- Ruiz-Garbajosa, P., y Cantón, R. (2016). Epidemiología de los bacilos gramnegativos multirresistentes. *Rev. Esp. Quimioter.*, 29(1), 21–25.
- Sangchay, W., Sikong, L., y Kooptarnond, K. (2012). Comparison of photocatalytic

- reaction of commercial P25 and synthetic TiO₂-AgCl nanoparticles. *Procedia Engineering*, 32, 590–596. <http://doi.org/10.1016/j.proeng.2012.01.1313>
- Saravanan, A., Kumar, P. S., Devi, G. K., y Arumugam, T. (2016). Synthesis and characterization of metallic nanoparticles impregnated onto activated carbon using leaf extract of *Mukia maderasapatna*: Evaluation of antimicrobial activities. *Microbial Pathogenesis*, 97, 198–203. <http://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.06.019>
- Sastry, M., Ahmad, A., Khan, M. I., y Kumar, R. (2003). Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete. *Current Science*, 85(2).
- Sawai, J., Kawada, E., Kanou, F., Igarashi, H., Hashimoto, A., Kokugan, T., y Shimizu, M. (1996). Detection of active oxygen generated from ceramic powders having antibacterial activity. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 29(4), 627–633. <http://doi.org/10.1252/jcej.29.627>
- Sawai, J., Shoji, S., Igarashi, H., Hashimoto, A., Kokugan, T., Shimizu, M., y Kojima, H. (1998). Hydrogen peroxide as an antibacterial factor in zinc oxide powder slurry. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 86(5), 521–522. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(98\)80165-7](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(98)80165-7)
- Schmid, G., Pfeila, R., Boesea, R., Bandermannb, F., Meyerb, S., Calkc, G. H. M., y Van der Veldend, J. W. A. (1981). Au₅₅[P(C₆H₅)₃]₁₂Cl₆—ein Goldcluster ungewöhnlicher Größe. *Chem. Ber.*, 114, 3634–3642. <http://doi.org/10.1002/cber.19811141116>
- Shankar, S. S., Ahmad, A., Pasricha, R., y Sastry, M. (2003). Bioreduction of chloroaurate ions by geranium leaves and its endophytic fungus yields gold nanoparticles of different shapes. *J. Mater. Chem.*, 13, 1822–1826. <http://doi.org/10.1039/b303808b>
- Shankar, S. S., Rai, A., Ahmad, A., y Sastry, M. (2004). Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Au core–Ag shell nanoparticles using Neem (*Azadirachta indica*) leaf broth. *Journal of Colloid and Interface Science*, 275, 496–502. <http://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.03.003>

- Sharma, D., Rajput, J., Kaith, B. S., Kaur, M., y Sharma, S. (2010). Synthesis of ZnO nanoparticles and study of their antibacterial and antifungal properties. *Thin Solid Films*, 519, 1224–1229. <http://doi.org/10.1016/j.tsf.2010.08.073>
- Shifu, C., Wei, Z., Wei, L., y Sujuan, Z. (2008). Preparation, characterization and activity evaluation of p-n junction photocatalyst p-ZnO/n-TiO₂. *Applied Surface Science*, 255, 2478–2484. <http://doi.org/10.1016/j.apsusc.2008.07.115>
- Silva, A., Martínez-Gallegos, S., Rosano-Ortega, G., Schabes-Retchkiman, P., Vega-Lebrún, C., y Albiter, V. (2017). Nanotoxicity for *E. coli* and characterization of silver quantum dots produced by biosynthesis with *Eichhornia crassipes*. *Nanostruct*, 7(1), 1–12. <http://doi.org/10.22052/jns.2017.01.001>
- Slistan-Grijalva, A., Herrera, R., Rivas, J. F., Avalos, M., Castillan, F. F. y Posada, A. (2008). Synthesis of silver nanoparticles in a polyvinylpyrrolidone (PVP) paste, and their optical properties in a film and in ethylene glycol. *Materials Research Bulletin*, 43(1), 90–96. <http://doi.org/10.1016/j.materresbull.2007.02.013>
- Soomro, R. A., Tufail, S., Sherazi, S. T. H., Sirajuddin, Memon, N., Shah, M. R., y Shah, A. (2014). Synthesis of air stable copper nanoparticles and their use in catalysis, 5(4), 191–198. <http://doi.org/10.5185/amlett.2013.8541>
- Stoimenov, P. K., Klinger, R. L., Marchin, G. L., y Klabunde, K. J. (2002). Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents. *Langmuir*, 18(17), 6679–6686. <http://doi.org/10.1021/la0202374>
- Sugimoto, T. (2001). *Monodispersed particles* (Elsevier S). Japon.
- The Royal Society. (2004). Nanoscience and nanotechnologies : opportunities and uncertainties. *Nanoscience and Nanotechnologies*. Plymouth, UK: Latimer Trend Ltd.
- Thombre, R., Chitnis, A., Kadam, V., Bogawat, Y., Colaco, R., y Kale, A. (2014). A facile method for synthesis of biostabilized silver nanoparticles using *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (water hyacinth). *Indian Journal of*

- Biotechnology*, 13(3), 337–341. Retrieved from <http://hdl.handle.net/123456789/29613>
- Tondi, G., y Petutschnigg, A. (2015). Middle infrared (ATR FT-MIR) characterization of industrial tannin extracts. *Industrial Crops and Products*, 65, 422–428. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.11.005>
- Trindade, T., O'Brien, P., y Pickett, N. L. (2001). Nanocrystalline semiconductors: Synthesis, properties, and perspectives. *Chem. Mater.*, 13, 3843–3858. <http://doi.org/10.1021/cm000843p>
- Ubonchonlakate, K., Sikong, L., y Saito, F. (2012). Photocatalytic disinfection of *P.aeruginosa* bacterial Ag-doped TiO₂ film. *Procedia Engineering*, 32, 656–662. <http://doi.org/10.1016/j.proeng.2012.01.1323>
- Vanathi, P., Rajiv, P., y Sivaraj, R. (2016). Synthesis and characterization of *Eichhornia* mediated copper oxide nanoparticles and assessing their antifungal activity against plant pathogens. *Bulletin of Materials Science*, 39(5), 1165–1170. <http://doi.org/10.1007/s12034-016-1276-x>
- Vassilev, A., Berova, M., y Zlatev, Z. (1998). Influence of cadmium on growth, chlorophyll content, and water relations in young barley plants. *Biologia Plantarum*, 41(4), 601–606. <http://doi.org/10.1023/A:1001856819797>
- Velev, O. D., y Kaler, E. W. (2000). Structured porous materials via colloidal crystal templating: From inorganic oxides to metals. *Advanced Materials*, 12(7), 531–534. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4095\(200004\)12:7<531::AIDADMA531>3.0.CO;2-S](http://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4095(200004)12:7<531::AIDADMA531>3.0.CO;2-S)
- Vilà, A., Comerma, A., Trenado, J., Arbat, A., Gascon, D., Garrido, L., y Diéguez, A. (2010). SEM/FIB for characterization of nanosized imagers. *Procedia Engineering*, 5, 697–700. <http://doi.org/10.1016/j.proeng.2010.09.205>
- Villafuerte-Robles, L. (2009). Nanotecnología farmacéutica. *Razón Y Palabra*, 14(68), 1–20. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=199520297009>

- Wang, P., Zhou, T., Wang, R., y Lim, T.-T. (2011). Carbon-sensitized and nitrogen-doped TiO₂ for photocatalytic degradation of sulfanilamide under visible-light irradiation. *Water Research*, 45, 5015–5026. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2011.07.002>
- Wang, T.-J., y Lin, W.-S. (2006). Electro-optically modulated localized surface plasmon resonance biosensors with gold nanoparticles. *Applied Physics Letters*, 89, 1–3. <http://doi.org/10.1063/1.2369635>
- Williams, D. B., y Carter, C. B. (2009). *Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science* (Segunda ed). Springer US. <http://doi.org/10.1007/978-0-387-76501-3>
- Wing, C. E. (2005). Las nanopartículas: pequeñas estructuras con gran potencial ¿Por qué el interés en estos materiales? ¿Qué aplicaciones tienen? *Contacto Nuclear*, 24–29. Retrieved from <http://www.inin.gob.mx/publicaciones/documentospdf/39 NANOPARTICULAS.pdf>
- Yacamán, M. J., Ascencio, J. A., Liu, H. B., y Gardea-Torresdey, J. (2001). Structure shape and stability of nanometric sized particles. *Journal of Vacuum Science & Technology B*, 19(4), 1091–1103. <http://doi.org/10.1116/1.1387089>
- Yasin, S., Liu, L. y Yao, J. (2013). Biosynthesis of silver nanoparticles by bamboo leaves extract and their antimicrobial activity. *Journal of Fiber Bioengineering and Informatics*, 1(March), 77–84. <http://doi.org/10.3993/jfbi03201307>
- Yoon, K. Y., Hoon, J., Park, J. H. y Hwang, J. (2007). Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles. *Science of the Total Environment*, 373(2-3), 572–575. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.11.007>
- Zanella, R. (2012). Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño. *Mundo Nano*, 5(1), 69–81. <http://dx.doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2012.1.45167>
- Zaranyika, M. F., y Ndapwadza, T. (1995). Uptake of Ni, Zn, Fe, Co, Cr, Pb, Cu and Cd by water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) in mukuvisi and manyame

rivers, Zimbabwe. *J. Environ. Sci. Health. A*, 30(1), 157–169. <http://dx.doi.org/10.1080/10934529509376193>

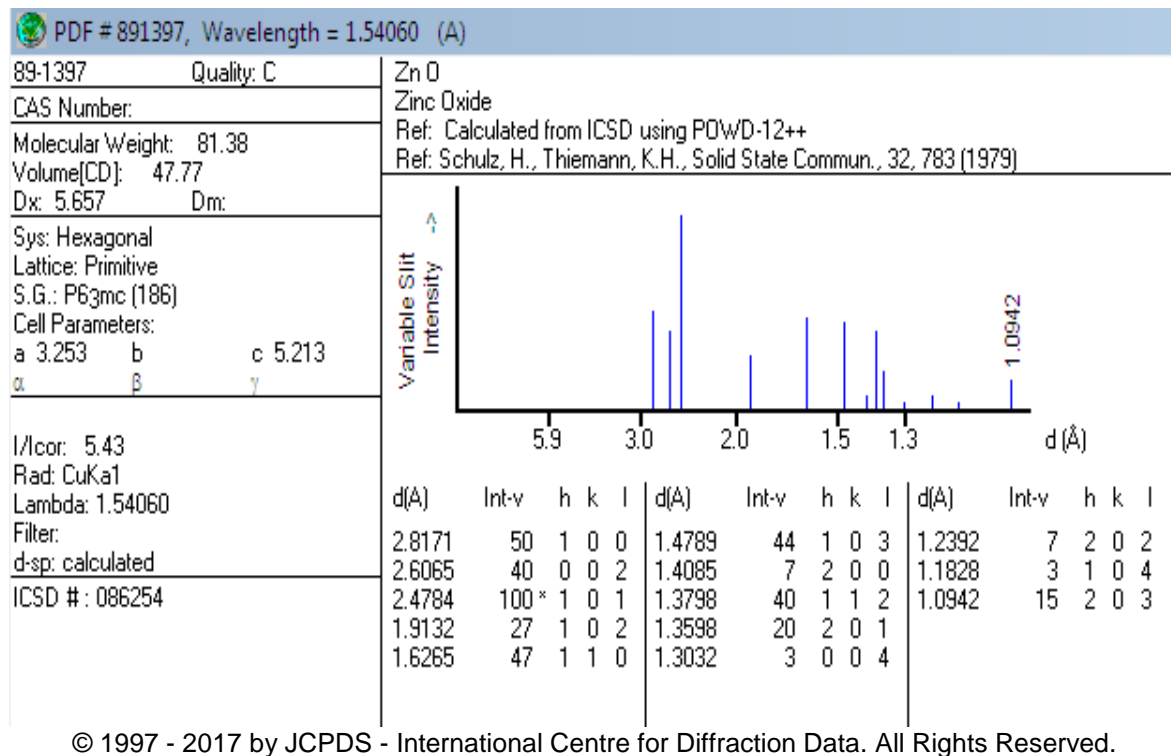
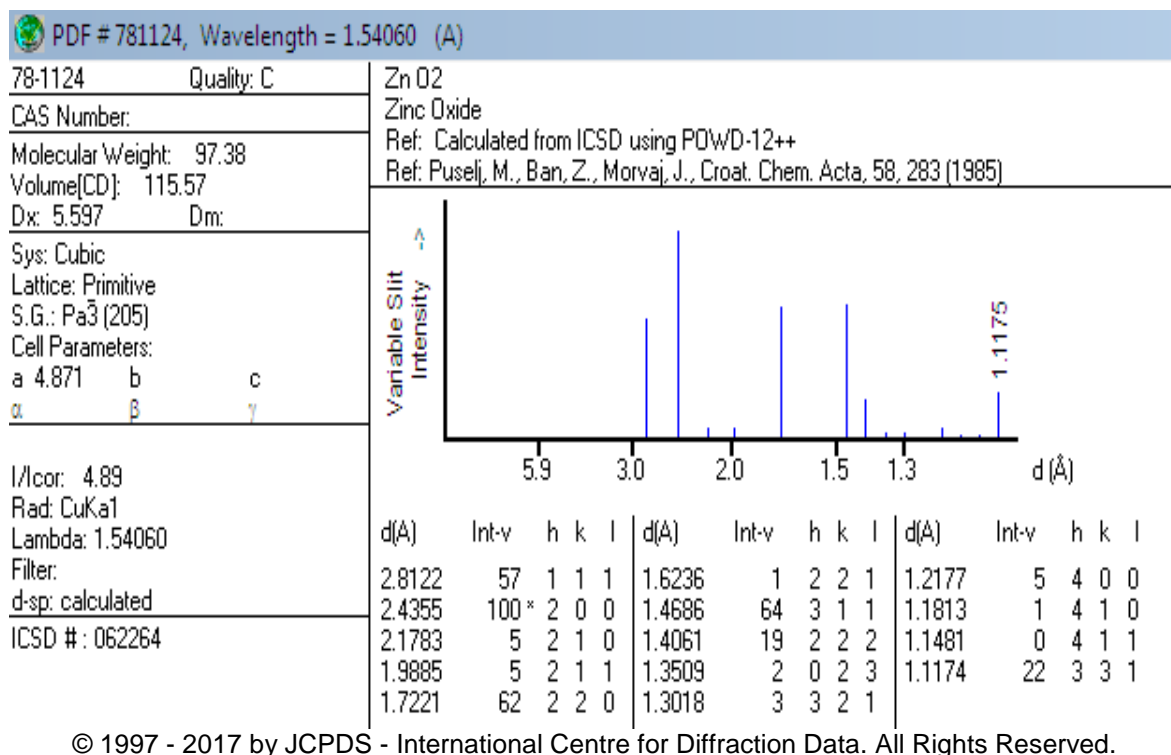
Zhao, Y., Jiang, Y. y Fang, Y. (2006). Spectroscopy property of Ag nanoparticles. *Spectrochimica Acta-Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 65(5), 1003–1006. <http://doi.org/10.1016/j.saa.2006.01.010>

Zhou, J., Cheng, Y., y Yu, J. (2011). Preparation and characterization of visible-light-driven plasmonic photocatalyst Ag/AgCl/TiO₂ nanocomposite thin films. *Journal of Photochemistry & Photobiology, A: Chemistry*, 223, 82–87. <http://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2011.07.016>

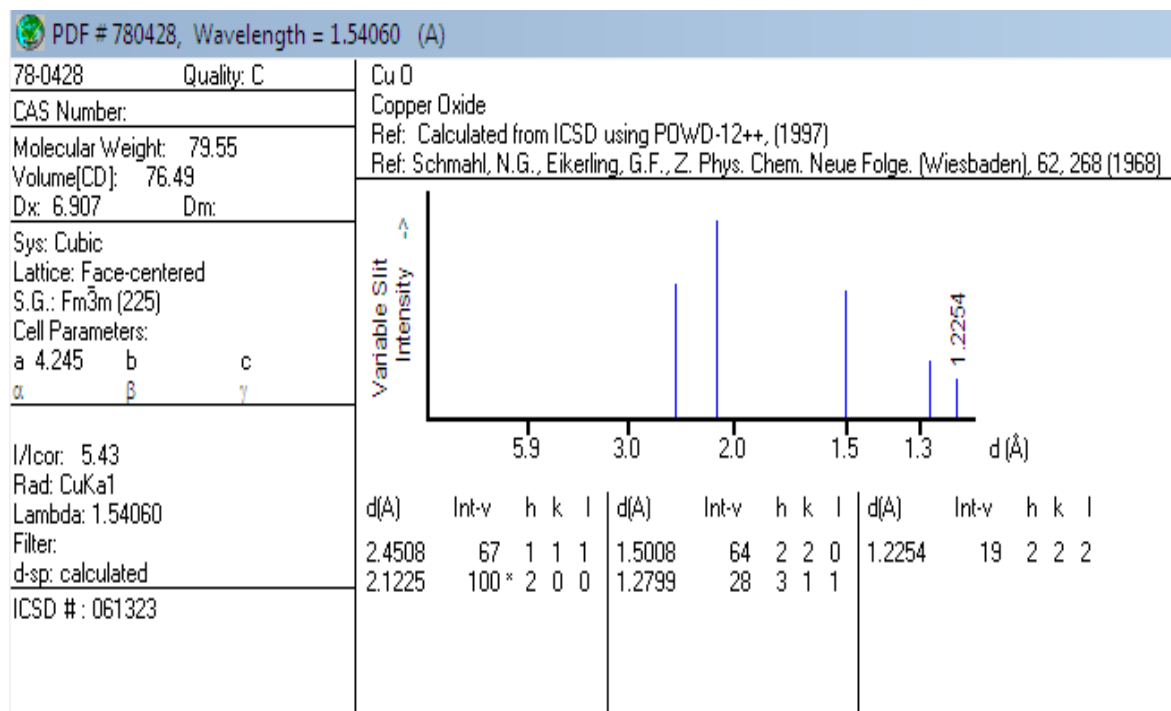
Zyoud, A., Dwikat, M., Al-Shakhshir, S., Ateeq, S., Shteivi, J., ZuBi, A., y Hilal, H. S. (2016). Natural dye-sensitized ZnO nanoparticles as photocatalysts in complete degradation of *E. coli* bacteria and their organic content. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 328, 207–216. <http://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2016.05.020>

ANEXOS

ANEXO 1 Tablas cristalográficas utilizadas para la indexación de las ZnNPs.

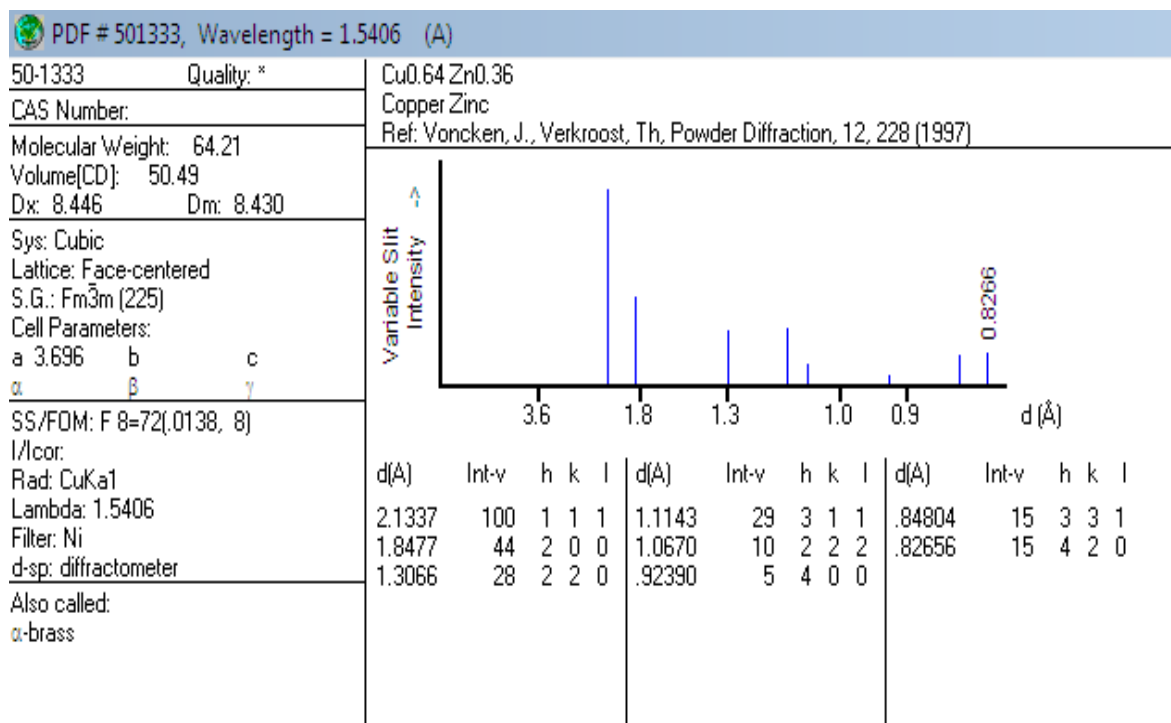


ANEXO 2 Tabla cristalográfica utilizada para la indexación de las CuNPs.



© 1997 - 2017 by JCPDS - International Centre for Diffraction Data. All Rights Reserved.

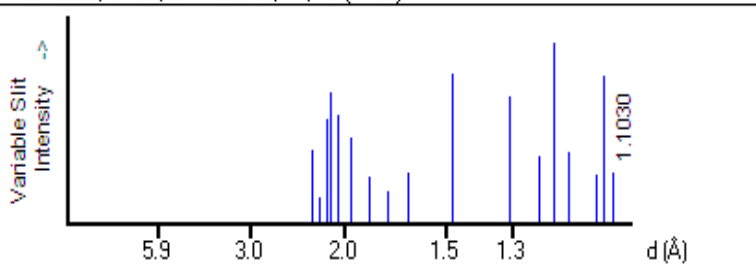
ANEXO 3 Tablas cristalográficas utilizadas para la indexación de las Cu/ZnNPs.



© 1997 - 2017 by JCPDS - International Centre for Diffraction Data. All Rights Reserved.

08-0349 Quality: D
 CAS Number:
 Molecular Weight: 128.93
 Volume[CD]: 25.54
 Dx: Dm:
 Sys: Monoclinic
 S.G.:
 Cell Parameters:
 a 3.31 b 2.61 c 2.96
 α β 87.0 γ
 SS/FOM: F13=3(0.142, 27)
 I/lor:
 Rad: CuK α
 Lambda: 1.542
 Filter: Ni
 d-sp: other

Cu Zn
 Copper Zinc
 Ref: Bassi, Strom, Z. Metallkd., 47, 16 (1956)



d(Å)	Int-v	h	k	l	d(Å)	Int-v	h	k	l	d(Å)	Int-v	h	k	l
2.2600	40	1	0	1	1.8500	25				1.2100	100	1	2	0
2.2050	14				1.7500	17				1.1800	38	$\bar{1}$	1	2
2.1450	56	$\bar{1}$	0	1	1.6600	27	$\bar{1}$	1	1	1.1300	27	1	2	1
2.1050	72				1.4800	82	0	0	2	1.1170	81	$\bar{1}$	2	1
2.0600	59	$\bar{1}$	1	0	1.3100	69	0	2	0	1.1030	27	3	0	0
1.9650	46	0	1	1	1.2430	37	$\bar{2}$	1	1					