

Universidad Autónoma de Baja California
Campus Ensenada
Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño



**“PRODUCCIÓN DE UN COMPÓSITO DE HIERRO
CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA APLICABLE
COMO AGENTE ANTIMICROBIANO
RECUPERABLE”**

PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO EN NANOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

Jesús Manuel Aguilar Torres

DIRECTORES:

Dra. Eunice Vargas Viveros

Dr. Gerardo Soto Herrera

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO. AGOSTO DE 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO

PRODUCCIÓN DE UN COMPÓSITO DE HIERRO CON NANOPARTÍCULAS
DE PLATA APLICABLE COMO AGENTE ANTIMICROBIANO RECUPERABLE

TESIS

PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL TÍTULO
DE

INGENIERO EN NANOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

JESUS MANUEL AGUILAR TORRES

Aprobada por:



Dra. Eunice Vargas Viveros
Director
(Presidente)



Dr. Gerardo Soto Herrera
Codirector
(Secretario)



Dra. Amelia Portillo López
Sinodal
(Vocal)



M. I. Guillermo Amaya Parra
Sinodal
(Vocal)



Dr. David Cervantes Vásquez
Sinodal
(Vocal)

AGRADECIMIENTOS

A la UABC por la formación académica e integral que me otorgó a lo largo del periodo universitario. También a la UNAM como institución hermana que me ha recibido para completar este trabajo de tesis.

A mi directora de tesis Dra. Eunice Vargas Viveros por orientarme en mi formación académica y apoyarme en la redacción de este documento.

A mi codirector de tesis Dr. Gerardo Soto Herrera por instruirme a lo largo de todo el trabajo que involucró esta tesis, apoyarme e inculcarme valores en mi formación como ingeniero.

Al comité de tesis conformado por la Dra. Eunice Vargas Viveros, el Dr. Gerardo Soto Herrera, la Dra. Amelia Portillo López, el M.I. Guillermo Amaya y el Dr. David Cervantes Vásquez por sus colaboraciones en la tesis.

A la Dra. Amelia Portillo López y la M.C. Sophia González Martínez por apoyarme y permitirme realizar las evaluaciones antimicrobianas en sus instalaciones.

Al M.C. David Domínguez, Ing. Israel Gradilla, Sr. Francisco Ruiz, M.C. Eloísa Aparicio y el Téc. Jaime Mendoza por el apoyo en las caracterizaciones de XPS, SEM, EDS, TEM y XRD.

Al Ing. Luis Alejandro Arce Saldaña por ayudarme en la parte de este trabajo.

Al grupo de trabajo de Fisicoquímica de Nanomateriales del CNyN-UNAM (Dr. Hugo Tiznado, Dr. Hugo Borbón, Dr. Javier López, M.C. David Domínguez) por instruirme en el campo científico e ingenieril estos últimos dos años.

A la coordinación de Ing. en Nanotecnología y al grupo de profesores de la UABC, FIAD (Dr. Franklin Muñoz, Dr. Jorge Mata, Dra. Eunice Vargas Viveros, M.I. Guillermo Amaya) por transmitir sus conocimientos como profesores.

A UABC-PTC-595 PRODEP-SEP, México y PAPIME-UNAM, PE101517 por haber financiado este proyecto.

DEDICATORIA

A Dios por guiarme en el buen camino y estar a mi lado.

A mis padres Jesús Manuel Aguilar Castillo y María de la Cruz Torres Cervantes por ser mis pilares en la vida; les agradezco el haberme educado y apoyado a lo largo de mi vida ya que sin ellos no podría estar aquí.

A mis hermanos(as) Zully Janeth Aguilar Torres, Laisa Priscila Aguilar Torres y Josué Uriel Aguilar Torres por haberme apoyado emocionalmente y haber tolerado cualquier implicación, buena o mala, que haya acontecido en sus vidas a causa de mi formación académica.

A mis tíos Gerardo Torres, Oswaldo Torres y Cruz Torres por haberme proporcionado empleo en periodo vacacional para solventar económicamente una parte de mis estudios.

A mi tía María Luisa y José (en paz descanse) por abrirme las puertas de su hogar al inicio de mi carrera profesional en Ensenada.

A mis familiares (paternos y maternos) y conocidos cercanos por creer en mí y haberme apoyado en los tiempos buenos, así como en los malos.

A mis amigos de San Felipe, por haber dejado experiencias gratas y formar parte de mi vida tanto en la adolescencia como en la actual.

A mis primos y familiares que están estudiando, y sin afán de elogiarme, se percaten de que con esfuerzo y dedicación se pueden alcanzar las metas que se propongan.

A Yosafat López, Adán Magaña y David Arce, por ser unos excelentes amigos.

A todos los amigos cercanos en Ensenada que estuvieron conmigo a lo largo de mi carrera universitaria, pero sobre todo a mis amigos y compañeros de grupo Guillermo Pereda, Eduardo Hernández, Axel Ortiz, Fernando Solorio, Omar Lomeli, Frida Aceves, Yesenia Martínez, Lizeth Alvares, Alicia Márquez, Gerdany Zúñiga, Alejandra Ruiz, Nayeli Reyes y Andrea Bernal, por formar parte de mi vida estos últimos 4 años.

RESUMEN

Se sintetizó un material compuesto formado por nanopartículas de plata (AgNPs), nanopartículas de Fe_3C y Fe_2O_3 , y una matriz de carbono, con propiedades magnéticas obtenidas o sintetizadas a partir de la técnica plasma de microondas. Las muestras fueron sintetizadas variando la cantidad de uno de los reactivos (nitrato de plata) y manteniendo constantes las proporciones de los otros. Se usaron dos métodos distintos de síntesis: el primero con la mezcla de todos los componentes simultáneamente; el segundo, mezclando el nitrato de plata posterior al tratamiento con plasma. Se realizaron técnicas de caracterización como microscopías electrónicas de barrido y transmisión (SEM y TEM) para conocer las propiedades morfológicas del compuesto, también se utilizaron las técnicas de Espectroscopia de rayos X por energía dispersiva (EDS) y Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS) para estimar la composición elemental y por último se determinó la estructura cristalina por Difracción de rayos X (XRD). Las micrografías de SEM y TEM revelaron un compuesto poroso y nanopartículas dentro de una matriz de carbono. Las caracterizaciones por EDS, XRD y XPS revelan que los elementos involucrados en el compuesto son exclusivamente Ag, Fe, C, O y N. Con ayuda de un campo magnético externo (imán de tierra rara) se verificó que existe atracción magnética para todas las muestras. Las nanopartículas de plata presentaron una estructura cristalina, además se identificó que el magnetismo proviene de los compuestos magnéticos de Fe, magnetita y cementita, según las cartas cristalográficas de XRD. Las evaluaciones antimicrobianas realizadas (Método de Kirby-Bauer y Densidad Óptica) demostraron una alta actividad inhibitoria al crecimiento microbiano en todas las muestras. Las características del compuesto lo hacen un material idóneo para el tratamiento de aguas residuales debido a su actividad antimicrobiana y porosidad, además de una fuerte respuesta a un campo magnético, lo cual podría ser aprovechado en separación magnética para recuperar las nanopartículas de plata.

Palabras clave: Compósito, Nanopartículas de plata, Plasma, Recuperación magnética, Evaluación antimicrobiana.

ABSTRACT

A composite material composed of silver nanoparticles (AgNPs), Fe₃C and Fe₂O₃ nanoparticles, and a carbon matrix, with magnetic properties or synthesized from the microwave plasma technique was synthesized. The samples were synthesized by varying the amount of one of the reagents (silver nitrate) and keeping the proportions of the others constant. Two different methods of synthesis were used: the first with the mixture of all the components simultaneously; the second, mixing the silver nitrate after the plasma treatment. Characterization techniques were performed such as scanning and transmission electron microscopy (SEM and TEM) to know the morphological properties of the composite, techniques and energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) and X-ray photoelectron spectroscopy were also used (XPS) to estimate the elemental composition and finally the crystal structure was determined by X-ray diffraction (XRD). The micrographs of SEM and TEM are disclosed in a porous composite and nanoparticles within a carbon matrix. The characteristics of EDS, XRD and XPS reveal that the elements involved in the composite are exclusively Ag, Fe, C, O and N. With the help of an external magnetic field it has been identified that there is a magnetic attraction for all samples. The silver nanoparticles have a crystalline structure, in addition to which it was identified that the magnetism comes from the magnetic compounds of Fe, magnetite and cementite, according to the XRD crystallographic charts. The antimicrobial evaluations carried out (Kirby-Bauer Method and Optical Density) showed a high inhibitory activity of microbial growth in all the samples. The characteristics of the composite make it an ideal material for the treatment of wastewater due to its antimicrobial activity and porosity, as well as a strong response to a magnetic field, which could be approved in the magnetic separation to recover the silver nanoparticles.

Key words: Composite, Silver nanoparticles, Plasma, Magnetic recovery, Antimicrobial evaluation.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIA	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
CAPITULO I	5
1 INTRODUCCIÓN	5
CAPITULO II	9
2 MARCO DE REFERENCIA	9
2.1. Nanotecnología	9
2.2 Propiedades de la Plata	13
2.3 Importancia de las AgNPs en temas de salud	15
2.4 Mecanismos de acción de las AgNPs sobre microorganismos	18
2.4.1 Adhesión de las AgNPs sobre la membrana celular	18
2.4.2 Introducción de las AgNPs a la célula y daño de las estructuras intracelulares y biomoléculas	19
2.4.3 Toxicidad celular inducida y estrés oxidativo	20
2.5 Técnicas de síntesis de AgNPs y recuperación de material	21
2.6 Síntesis por Plasma de Microondas	22
2.7 Aplicación en tratamiento de aguas residuales	24
2.8 Antecedentes en la síntesis de materiales con AgNPs y compuestos susceptibles a campos magnéticos.	24
CAPITULO III	26
3 HIPÓTESIS	26
4 OBJETIVOS	27
4.1 Objetivo general	27
4.1.1 Objetivos particulares	27
CAPITULO IV	28
5 METODOLOGÍA	28
5.1 Materiales y Equipo	28
5.2 Métodos	30

5.2.1	Síntesis de compósito	30
5.2.2	Evaluación antimicrobiana	32
5.2.2.1	Método de Kirby-Bauer	32
5.2.2.2	Densidad Óptica	33
CAPITULO V		36
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
6.1	Síntesis de compósitos	36
6.2	Caracterización de compósitos	37
6.2.1	Caracterización de morfología por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	37
6.2.2	Caracterización de la composición química por Espectroscopía de rayos X por energía dispersiva (EDS)	38
6.2.3	Caracterización de morfología por Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM)	39
6.2.4	Caracterización de las propiedades estructurales por medio de Difracción de rayos X (XRD)	41
6.2.5	Caracterización de composición química por Espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS)	42
6.3	Evaluaciones antimicrobianas	44
6.3.1	Método de Kirby-Bauer	44
6.3.2	Densidad Óptica	47
7	CONCLUSIONES	49
8	BIBLIOGRAFÍA	50
APENDICE A		56
Fichas cristalográficas		56
Grafito		56
Carburo de hierro		56
Plata		57

Lista de figuras

Fig. 1. Representación de los procesos de fabricación en nanotecnología. (Sanchez & Sobolev, 2010)	12
Fig. 2- Estructura FCC de la plata.	14
Fig. 3. Población infectada por microbios susceptibles a desarrollar resistencia antibiótica. La grafica incluye las siguientes infecciones: Tuberculosis, sífilis, tosferina, fiebre paratifoidea, fiebre tifoidea y meningitis. (OECD, WHO, FAO, & OIE, 2017).	16
Fig. 4. Distribución de artículos científicos por país (a); Cantidad de artículos científicos relacionados con AgNPs (de 1982 hasta enero de 2017) (b); Toneladas de AgNPs destinadas a diferentes sectores (c). (Syafiuddin et al., 2017).	17
Fig. 5. Principales efectos en microorganismos por parte de las AgNPs.	20
Fig. 6. Reactor de plasma por microondas.	29
Fig. 7. Tubo de cuarzo utilizado para la síntesis de compósitos.	30
Fig. 8. Pastillas de cada una de las muestras sintetizadas.	32
Fig. 9. Imágenes de los tubos a medir. Los incisos a), b) y c) contienen los materiales M0, M3 y M10 respectivamente. En el inciso d) se muestran los tubos con medio LB y bacteria.	35
Fig. 10. Imagen de los compósitos sintetizados.	36
Fig. 11. Atracción magnética entre compósito M3 con imanes de neodimio.	37
Fig. 12. Prueba magnética en medio acuoso (isopropanol).	37
Fig. 13. Imágenes de micrografías obtenidas por SEM. Las imágenes a), b), c) y d) representan las muestras M1, M6, M9 y M10, respectivamente.	38
Fig. 14. Espectros generados por EDS, a) M0 y b) M9.	39
Fig. 15. Micrografías de la muestra M6 obtenidas mediante TEM. Las imágenes a), b) y c) representan distintas zonas la misma muestra.	40
Fig. 16. Difractogramas de rayos X. Las imágenes con los incisos a), b), c) y d) corresponden a los difractogramas de las muestras M0, M2, M6 y M10 respectivamente.	42
Fig. 17. Espectros de XPS. Espectro correspondiente a la muestra M10, a); Análisis de alta resolución para cada una de las especies involucradas (O, C, Fe, Ag y N), b).	43

Fig. 18. Imágenes de las muestras M0-M10 en Agar como medio de cultivo sólido.

45

Lista de tablas

Tabla 1. Resumen de efectos de tamaño (nm).....	11
Tabla 2. Técnicas de síntesis de MNS.....	13
Tabla 3. Variedad de técnicas de síntesis para AgNPs.....	21
Tabla 4. Lista de los principales reactivos utilizados para la síntesis del compuesto y la evaluación antimicrobiana.	28
Tabla 5. Parámetros de síntesis de compuesto.	31
Tabla 6. Contenido en cada uno de los tubos.	34
Tabla 7. Resumen de tratamiento de datos.	43
Tabla 8. Tratamiento de datos sobre las áreas del compuesto y áreas de halos de inhibición para cada una de las muestras.....	46
Tabla 9. Valores de absorbancia para cada una de las pruebas medidas.....	47
Tabla 10. Resumen de tratamiento de datos. Se muestran los porcentajes de inhibición que tuvieron las muestras M0, M3 y M10 sobre la bacteria de <i>E. coli</i>	48

CAPÍTULO I

1 INTRODUCCIÓN

En el mundo existen aproximadamente 1 trillón (1×10^{12}) de microorganismos (bacterias, hongos, fagos, etc.) (Locey & Lennon, 2016) en donde cada uno de ellos cumple una función específica, que va desde la fijación de nitrógeno y ciclos biogeoquímicos hasta aquellos que pueden producir enfermedades en seres vivos como tuberculosis, salmonelosis, colitis hemorrágica, etc. (Montaño, 2010). Antes del siglo XX los médicos tenían poco tratamiento terapéutico sobre las enfermedades de los pacientes lo que dificultaba la recuperación de los mismos. Con la llegada de la sulfanilamida y la penicilina en los años 1936 y 1942 respectivamente, comenzó una expectativa de mejora de vida para la población y la tasa de mortalidad disminuyó. Sin embargo, todo este auge por los antibióticos creó una población despreocupada que dejó pasar por alto una de las cosas que mejor han podido realizar los microorganismos: generar resistencia (Spellberg, 2014). Los microorganismos pueden generar resistencia clínica (actividad antimicrobiana que se correlaciona con una alta probabilidad de fracaso terapéutico) o resistencia adquirida. Esta última se produce cuando ciertas bacterias obtienen genes que codifican un mecanismo o la transferencia de material genético de otras bacterias de la misma especie o de una diferente. Los genes de resistencia antimicrobiana se transportan en elementos genéticos móviles (plásmidos) o transposones. La transferencia puede ocurrir por varios métodos (MacGowan & Macnaughton, 2017). La resistencia antimicrobiana es una grave amenaza para la salud pública, esto implica costos de atención médica mayores, fallas en el tratamiento de pacientes y muertes. Tan sólo en Europa se han registrado 25,000 muertes a causa de bacterias resistentes y por ende, se estiman costos de salud y pérdidas en la productividad en al menos 1,500 millones de euros (European Centre for Disease Prevention and Control, 2015). Como consecuencia de esto, ha habido cierto abandono en el desarrollo de nuevos antibióticos por parte de las empresas (Spellberg, 2014), además de un descenso del 90% en las nuevas aprobaciones de antibióticos sistemáticos por parte de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los E.U. (FDA, por sus siglas en inglés) (Shlaes et al., 2013). Por lo tanto, es necesario atacar de otra manera a los microorganismos que presentan resistencia utilizando métodos fuera de lo convencional.

Muchas veces, cuando no se encuentra una solución apropiada para problemas de esta índole, echar un vistazo a la historia con la intención de percibir una solución sencilla puede ser una alternativa. Se conoce que en el año 1000 a.C. la plata (Ag) había sido utilizada como recipiente de agua que al ser expuesta a la luz podía volverse potable. Posteriormente, en el año 335 a.C. Alejandro el Grande había utilizado esta técnica para transportar agua en varias de sus expediciones (Russell et al., 1994). Para la edad contemporánea, la plata y sus compuestos han sido utilizados de diversas maneras, tales como el tratamiento de quemaduras, vendajes para heridas de diabéticos, catéteres recubiertos de plata y dispositivos médicos, amalgamas de plata dentales, entre otros (Silver, 2003). A fin de que la Ag tenga propiedades antimicrobianas, ésta debe estar en su forma ionizada (Ag^+) por lo tanto, compuestos como nitrato de plata (AgNO_3), acetato de plata (CH_3COOAg), sulfadiazina de plata ($\text{C}_{10}\text{H}_9\text{AgN}_4\text{O}_2\text{S}$), etc., pueden ser una buena fuente de iones de este metal. Algunos de los mecanismos de acción de Ag^+ se llevan a cabo interaccionando con los grupos tiol (como algunos aminoácidos), de esta manera se puede neutralizar la actividad de las bacterias; además, se ha propuesto que Ag^+ se enlaza a ciertos grupos funcionales de las enzimas. Por si fuera poco, estos iones también se adhieren a la pared celular y al DNA, causando daños letales para la célula (Russell et al., 1994). A pesar de que existen genes capaces de expresar ciertas macromoléculas que generen resistencia a la Ag (Silver, 2003), las propiedades bactericidas de este elemento pueden ser potenciadas por un campo de estudio que ha estado emergiendo en los últimos años: la nanotecnología.

La nanotecnología (un término acuñado por Richard P. Feynman durante su conferencia “There’s Plenty of Room at the Bottom” en 1959) (Feynman, 1960). Se puede definir como la comprensión, control y reestructuración de la materia en el orden de los nanómetros (menos de 100 nm), para crear materiales con propiedades y funciones totalmente nuevas, aunque esta definición puede variar dependiendo el país. Utilizando las dos estrategias de síntesis en nanotecnología (Top-Down y Bottom-Up) se pueden obtener diversas estructuras como nanopartículas (NPs), nanotubos, nanofibras, películas delgadas, entre otras (Sanchez & Sobolev, 2010). Así pues, es posible sintetizar nanopartículas de plata (AgNPs) y aprovechar sus propiedades ópticas, eléctricas y térmicas, destacando su propiedad antimicrobiana de amplio espectro (Natsuki et al., 2015). A pesar de que las AgNPs tienen un mecanismo de acción muy parecido a la Ag en su escala macro, las AgNPs presentan ciertas

ventajas. La Ag tiene una utilidad limitada como agente antimicrobiano y esto se debe a los efectos interferentes de las sales y al mecanismo de liberación de Ag^+ (posible insuficiencia de liberación continua de iones). En contraste, las AgNPs (debido a su tamaño) permiten tener mayor área de contacto con la pared celular (J. S. Kim et al., 2007) liberando de distinta manera los iones Ag^+ . Esta es una característica muy importante, ya que diferentes formas o tamaños de NP pueden llevar a la fácil liberación de iones, además de que se requiere una menor cantidad de plata para formar las AgNPs. Si bien las AgNPs muestran un futuro prometedor como agente antimicrobiano (y aplicaciones biomédicas), no hay que dejar de lado el potencial que tienen en otras áreas como electrónica (para productos con mejor rendimiento), textiles (ropa deportiva, interior y militar), productos fotovoltaicos, entre otros (Syafiuddin et al., 2017). Como consecuencia, la demanda de AgNPs ha crecido en los últimos años y se pronostica que siga en aumento.

Sin embargo, al tratar las AgNPs ya sea para algún proceso industrial o para fines de investigación, no siempre se tiene un control adecuado con el uso de las NPs y de alguna manera u otra terminan expuestas al medio ambiente. Debido a su área superficial y reactividad, una vez en el medio ambiente, las AgNPs pueden sufrir diferentes transformaciones como oxidación, aglomeración, sedimentación o reducción que modifican su comportamiento; teniendo como consecuencia posibles daños a la salud humana y al medio ambiente (León-Silva et al., 2016). Algunos de los métodos de recuperación de NPs (en medios acuosos) son centrifugación, filtración, evaporación del medio, etc.; pero estos métodos pueden ser complicados y costosos (Robertson et al., 2016). Un método novedoso es utilizar un material con propiedades magnéticas que esté adherido a las AgNPs y por medio de un campo externo recuperar lo que se considera ahora un *compósito*; así pues, el candidato propuesto para esta tarea son los compuestos de Fe, por ejemplo, el carburo de hierro (Fe_3C). El Fe_3C es un material ferromagnético con aplicaciones en fluidos magnéticos y medios de grabación magnéticos (Lao et al., 2012), pero lo más importante es que responde fácilmente a un campo magnético externo debido a su alto momento magnético.

A pesar de que existan diversos métodos de síntesis de partículas como condensación de vapor químico, descarga de arco, láser pirolítico, microemulsión, hidrotermal, Sol-Gel, etc.; el proceso suele ser complicado y costoso para la elaboración de NPs (Tavakoli et al., 2007), sin mencionar que entre más elementos tengan las NPs (en este caso un *compósito*) la

síntesis se dificulta aún más. Con el fin de ahorrar tiempo y esfuerzo, se propone un método acuñado con el nombre de “Síntesis por plasma de microondas” (Saldaña et al., 2018) en donde los reactivos necesarios para sintetizar el compuesto de Fe/C/AgNPs se colocan dentro de un tubo de cuarzo que es llevado a vacío (entre 100 y 50 mTorr) y posteriormente se le hace incidir una radiación de microondas. La mayor ventaja de esta técnica es el tiempo de síntesis, que puede ser aproximadamente de media hora (incluyendo la preparación del material, el tiempo para alcanzar el vacío deseado, el tiempo de síntesis y enfriamiento del tubo de cuarzo).

Un compuesto de Fe/C/AgNPs remedia los problemas planteados previamente al tener un material con las virtudes de ser bactericida y de fácil recuperación, sin mencionar que este material pudiera presentar características de adsorción similares al carbón activado (Arce-Saldaña et al., 2018), abriéndose así una gran cantidad de aplicaciones potenciales para este material. Una posible aplicación es en los procesos de tratamiento de aguas residuales, en los cuales se utiliza carbón activado para la absorción de metales pesados y compuestos clorados (Cl_2 , NaClO , ClO_2) para la desinfección biológica del agua. Sin embargo, al utilizar cloro como desinfectante se pueden crear subproductos (compuestos organoclorados) considerados nocivos desde el punto de vista sanitario. Al aplicar el compuesto de Fe/C/AgNPs en un método alternativo para el tratamiento de aguas se estarían aprovechando las características del mismo, es decir, adsorción y desinfección (sin mencionar la fácil recuperación del compuesto); mejorando así la calidad del proceso de tratamiento de aguas residuales en ciertas regiones, por ejemplo, Ensenada, Baja California.

El enfoque de este trabajo es obtener un material recuperable magnéticamente con propiedades antimicrobianas, por lo tanto, se realizará la síntesis de compósitos de Fe/C/AgNPs, la caracterización de sus propiedades y dos evaluaciones antimicrobianas para comprobar sus propiedades bactericidas.

CAPÍTULO II

2 MARCO DE REFERENCIA

2.1. Nanotecnología

Como se comentó en la sección de Introducción, la nanotecnología se define como la comprensión, control y reestructuración de la materia en el orden de los nanómetros para crear materiales con propiedades y funciones nuevas (Feynman, 1960). En la nanoescala algunas propiedades (físicas, químicas, biológicas, etc.) de los materiales pueden cambiar considerablemente con respecto a su escala macro. Este tipo de fenómenos ha llamado la atención de los investigadores en los últimos años debido a que abren una gran ventana de aplicaciones en distintas áreas. Por mencionar algunos ejemplos, las nanofibras se utilizan para el aislamiento y el refuerzo de materiales compuestos, nanoóxidos de zinc y titania se utilizan como bloqueadores solares para rayos UV, revestimiento para anteojos y ventanas, transportadores de fármacos para enfermedades específicas, entre otros (Vladimir et al., 2007). La nanotecnología es un complejo conjunto de conocimientos interdisciplinarios, involucrando disciplinas como Química, Física, Ciencia de materiales, Electrónica, Biología y entre otras.

La variedad de materiales nanoestructurados (MNS, también llamados nanomateriales) es muy amplia, y para poder desarrollar dichos materiales es necesario comprender los conceptos de Ciencia de los materiales e Ingeniería de los materiales. Éstas dos áreas de trabajo están muy relacionadas entre sí, no obstante, la Ciencia de los materiales investiga la relación entre la estructura y las propiedades de algún material; mientras que la Ingeniería de los materiales consiste en emplear los conocimientos existentes para diseñar la estructura de un material y alcanzar las propiedades deseadas. Como se puede ver, existe una clara diferencia entre Ciencia e Ingeniería, aunque para el desarrollo de materiales (o nanomateriales) es necesario un trabajo en conjunto.

La primera clasificación de los MNS la realizó Gleiter en 1995; sin embargo, fue actualizada por Pokropivny y Skorokhod en 2007 debido a que no se estaban considerando

estructuras como fullerenos y nanotubos (Tiwari et al., 2012). La clasificación se resume, en una forma muy simplificada, de la siguiente manera:

- **Estructuras 0D:** MNS en donde sus tres dimensiones espaciales se encuentran en el orden de los nanómetros. Por ejemplo, puntos cuánticos, partículas huecas, partículas núcleo-coraza, etc.
- **Estructuras 1D:** MNS en donde sólo una dimensión espacial se encuentra fuera del rango de los nanómetros. Por ejemplo: Nanotubos, nanofibras, nanocables, entre otros.
- **Estructuras 2D:** NMS en donde dos dimensiones espaciales se encuentran fuera del orden de los nanómetros. Como ejemplos se tienen las variedades de películas delgadas (nanodiscos, nanoislas, nanohojas, etc.).
- **Estructuras 3D:** Son materiales en el que sus tres dimensiones espaciales se encuentran fuera del orden de los nanómetros. Sin embargo, se consideran NMS si dentro de la matriz del material contienen estructuras OD, 1D o 2D. Ejemplos de estructuras 3D son estructuras dendríticas, nanobobinas, nanopilares, nanocompuestos, etc.

El cambio de las propiedades de lo NMS en comparación con su escala macro es debido a los *efectos de tamaño*. Estos efectos se presentan con la reducción del tamaño de un material en específico. Se llaman *efectos de tamaño intrínsecos* (I) a todos aquellos efectos que aparecen debidos a la reducción de tamaño del material y al aumento del área superficial (por ejemplo, las nanopartículas). Por otra parte, se encuentran los *efectos de tamaño extrínsecos* (E) los cuales se detectan cuando algún material se encuentra bajo el estímulo de un campo electromagnético o acústico, radiación o efectos térmicos. En general, los efectos de tamaño pueden tener una naturaleza tanto clásica como cuántica, por lo que en consecuencia pueden clasificarse como efectos de tamaño clásico (C) y tamaño cuántico (Q). Por lo tanto, se tiene la siguiente variedad de efectos: IC, IQ, EC, y EQ (Pokropivny et al., 2008). En la Tabla 1 se enlistan algunos de los efectos que ocurren en la escala nano.

Tabla 1. Resumen de efectos de tamaño (nm).

Propiedad	Influencia de la reducción de tamaño en las propiedades de las NPs.	Tipo
Estructural	Disminución o aumento de parámetros de red	IC
	Transformaciones de estructura	IC
Mecánica	Aumento de la dureza	IC
	Aumento de la resistencia al desgaste	IC
Térmica	Disminución del punto de fusión	IC
	Disminución de la temperatura de transición de fase	IC
Termodinámica	Aumento de la capacidad calorífica	IC
	Aumento de la expansión térmica	IC
Cinética	Aumento del coeficiente de difusión	IC
Eléctrica	Aumento de la conductividad en metales	IQ
Magnética	Disminución de la temperatura de Curie	IQ
	Aumento de la temperatura máxima de magnetoresistencia	EQ
Óptica	Difracción e interferencia	EC
	Aumento de la absorción en el rango ultravioleta	IQ
Química	Aumento de la actividad catalítica	IC
	Aumento de la velocidad de interacciones fisicoquímicas	IC

Como ya se sabe, las propiedades en la tabla anterior son debidas a la disminución de tamaño de los materiales, por lo tanto, el proceso de obtener un material con tamaño reducido es de vital importancia. Todos los MNS se basan en dos procesos de fabricación: “top-down” (descendente) y “bottom-up” (Ascendente).

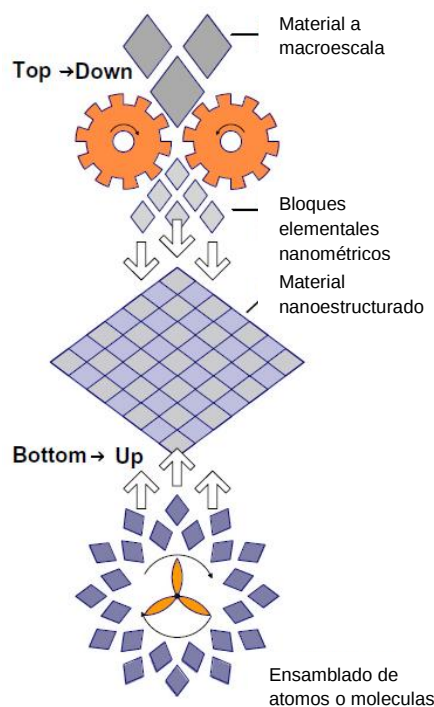


Fig. 1. Representación de los procesos de fabricación en nanotecnología. (Sanchez & Sobolev, 2010)

La Fig. 1 representa de forma ilustrada los procesos top-down y bottom-up. El proceso top-down está centrado en la reducción de tamaño de un material de grandes dimensiones hasta alcanzar objetos en el régimen del tamaño de los nanómetros. Este proceso es propuesto por Feynman en 1959. En el proceso bottom-up se hace todo lo contrario ya que se comienza a partir de átomos y moléculas para reorganizarlas y ensamblarlas a nanoestructuras más grandes. Se puede decir que en el proceso bottom-up se requiere una compresión profunda de las fuerzas de atracción ya que no siempre se pueden tener átomos y moléculas unidas (Daraio & Jin, 2012).

Dentro de los dos procesos de fabricación mencionados existen una gran variedad de técnicas de síntesis, que si bien, pueden ser llevadas a cabo por métodos químicos o físicos. La Tabla 2 muestra algunas de las técnicas de síntesis con una breve descripción, así como su respectivo método de síntesis (Tiwari et al., 2012).

Tabla 2. Técnicas de síntesis de MNS.

Técnica	Método	Descripción
Evaporación térmica	Físico	Calentamiento hasta la evaporación del material a depositar. Se lleva a cabo en una cámara de vacío en donde se condensa el vapor sobre un sustrato frío.
Pulverización catódica	Físico	Involucra la eyección de átomos o cúmulos de material al someterlos a un haz acelerado y enfocado de un gas inerte.
Rocío pirolítico	Físico	Proceso de solución en el cual una solución precursora es descompuesta al ser rociada y viajar en un medio a altas temperaturas, o dicho rocío entrar en contacto con un sustrato caliente.
Ablación láser pulsada	Físico	Un material es evaporado usando un láser pulsado en una cámara llena con una cantidad conocida de un gas reactivo. El material evaporado interacciona con el gas y se deposita en un sustrato.
Depósito electroquímico	Químico	Proceso que utiliza corriente eléctrica para depositar una capa compuesta de material deseado sobre un sustrato.
Sol-gel	Químico	Fabricación de materiales a partir de una solución química (sol) que actúa como precursor de una red (gel) integrada de partículas discretas o polímeros en red.
CVD	Químico	Proceso químico en el cual moléculas gaseosas se transforman en un material sólido sobre la superficie de un sustrato.

El siguiente apartado se enfocará en la importancia de la plata y el uso potencial que tienen las nanopartículas de plata como agente antimicrobiano, la cual requiere del uso de bases nanotecnológicas para su producción.

2.2 Propiedades de la Plata

En el apartado anterior se plasmaron los conceptos base de la nanotecnología para vislumbrar el potencial que esta disciplina tiene con la modificación de las propiedades de los materiales. Si bien existe una gama de MNS que crece día con día, este apartado estará centrado en un elemento de gran interés para esta tesis: la plata.

La plata es uno de los metales procesados desde épocas muy antiguas por la humanidad. Los montones de escoria hallados en Asia Menor e islas del mar Egeo, indican que el metal comenzó a separarse del plomo al menos cuatro milenios antes de nuestra era. Desde entonces la plata ha sido valorada por su belleza decorativa y es conocido como metal precioso. A este elemento también se le considera uno de los metales más nobles, es decir, menos reactivos químicamente entre los elementos de transición (Encyclopedia Britannica, 2018). Con símbolo químico Ag, en su estado cristalino natural posee una estructura Cúbica Centrada en las Caras (FCC por sus siglas en inglés). Entre sus principales propiedades está ser extremadamente maleable y dúctil. Fig. 2.

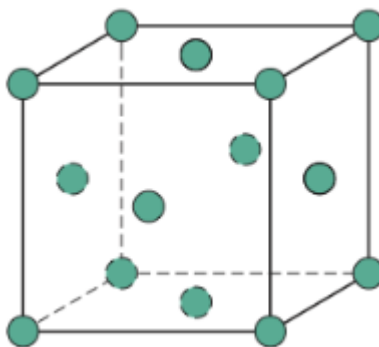


Fig. 2- Estructura FCC de la plata.

La estabilidad de la plata (y propiedades mencionadas previamente) son atribuidas a la configuración electrónica $[Kr]4d^{10}5s^1$. En el grupo 11, la Ag tiene la primera energía de ionización baja (731.0 kJ/mol, orbital 5s), pero su segunda y tercera energía de ionización son más altas (2070 kJ/mol y 3361 kJ/mol respectivamente), demostrando la estabilidad de los orbitales 4d. A pesar de que la Ag no reacciona con el aire, este elemento puede reaccionar con el azufre y sus compuestos (Por ejemplo, H_2SO_4), y por oxidantes fuertes como el permanganato de potasio ($KMnO_4$) (Kr, 1997). Además, de las propiedades térmicas y eléctricas de la plata, las de mayor interés en este texto son las biológicas. Como ya se mencionó, la plata metálica es muy estable, pero compuestos como acetato de plata (CH_3COOAg) y nitrato de plata (NO_3Ag) tienden a liberar Ag^+ . Estos iones desestabilizan la membrana celular de algunos microorganismos (como *E. coli*) produciendo la muerte del mismo (Russell et al., 1994). Sin embargo, la mayoría de los compuestos de Ag tienen una

utilidad limitada como agente antimicrobiano y esto se debe a los efectos interferentes de las sales y al mecanismo de liberación de Ag^+ (posible insuficiencia de liberación continua de iones). En contraste, las AgNPs, debido a su tamaño, permiten tener mayor área de contacto con la pared celular (Kim et al., 2007; Sriram et al., 2012) liberando de distinta manera los iones Ag^+ .

Las AgNPs poseen propiedades ópticas, eléctricas y térmicas muy interesantes. Por mencionar alguna de éstas propiedades, se conoce que las AgNPs absorben radiación electromagnética entre los 380 y 450 nm (dependiendo el tamaño y forma de las NPs) mediante el fenómeno de resonancia de plasmón de superficie localizada (Syafiuddin et al., 2017). Por otra parte, la actividad biológica de las AgNPs depende de una variedad de factores; el área superficial, distribución de tamaños, morfología de partícula, recubrimiento, aglomeración, velocidad de disolución, reactividad de partículas en disolución, velocidad de liberación de iones e incluso el tipo de célula utilizada para observar la actividad antimicrobiana son factores que determinan la eficiencia de las AgNPs (Carlson et al., 2008); todas estas características han despertado el interés científico en torno a las AgNPs debido a la gran variedad de aplicaciones, sobre todo en temas de salud e higiene.

2.3 Importancia de las AgNPs en temas de salud

Las AgNPs presentan una oportunidad como antibiótico contra ciertos microorganismos patógenos, por ejemplo, *E.coli*, sobre todos contra microorganismos que poseen resistencia antibiótica. La gravedad de la resistencia antibiótica en microorganismos es realmente seria y se considera un desafío en la economía y salud mundial. Millones de personas de diversos países como Rusia, Sudáfrica, México, Francia, entre otros (ver Fig. 3) son infectadas por microbios susceptibles al desarrollo de resistencia. Los microbios resistentes duplican la probabilidad de desarrollar una complicación y triplican el riesgo de muerte en comparación con los microbios no resistentes. Por mencionar alguna cifra contundente, alrededor de 23,000 personas mueren cada año en Estados Unidos debido a la resistencia antibiótica.(OECD, WHO, FAO, & OIE, 2017).

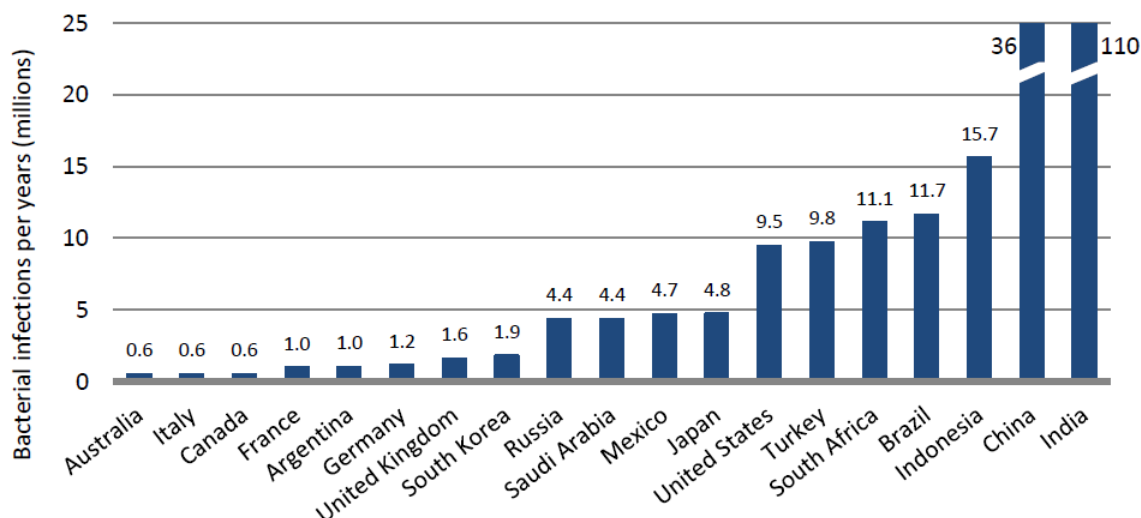


Fig. 3. Población infectada por microbios susceptibles a desarrollar resistencia antibiótica. La grafica incluye las siguientes infecciones: Tuberculosis, sífilis, tosferina, fiebre paratifoidea, fiebre tifoidea y meningitis. (OECD, WHO, FAO, & OIE, 2017).

Los problemas económicos asociados al tratamiento para los pacientes infectados por bacterias resistentes resultan ser más costosos a lo usual. Por ejemplo, en promedio, un paciente hospitalizado con una infección resistente a antibióticos tiene un costo adicional de entre 10,000 a 40,000 dólares (Cecchini, Langer, & Slawomirski, 2015). Éste tipo de problemas de salud tienen un impacto negativo en la economía global debido al aumento de la mortalidad, prolongación de las enfermedades y la reducción de la eficiencia laboral. En los países de altos ingresos (como Estados Unidos), la pérdida de productividad para alguien que padece una infección resistente se estima en 38,000 dólares debido al tiempo fuera del trabajo (Cecchini et al., 2015).

Países pertenecientes al grupo G-20 pueden jugar un papel importante para combatir los problemas ocasionados por la resistencia microbiana (OECD et al., 2017). Una de las principales acciones por parte de los países involucrados es comprometerse a apoyar el desarrollo de nuevos antibióticos impulsando el desarrollo científico, algo que se ve reflejado en la gráfica de la Fig. 4 a). Como ya se mencionó previamente, las AgNPs presentan actividad antimicrobiana y el interés científico por este nanomaterial se ve reflejado en el número de documentos publicados por año (Fig. 4 (b)). Aunque no todos los documentos publicados sean con fines biológicos, la cantidad de AgNPs destinadas al cuidado de la salud son mayores que en otras áreas de aplicación (Fig. 4 c)) (Syafiuddin et al., 2017).

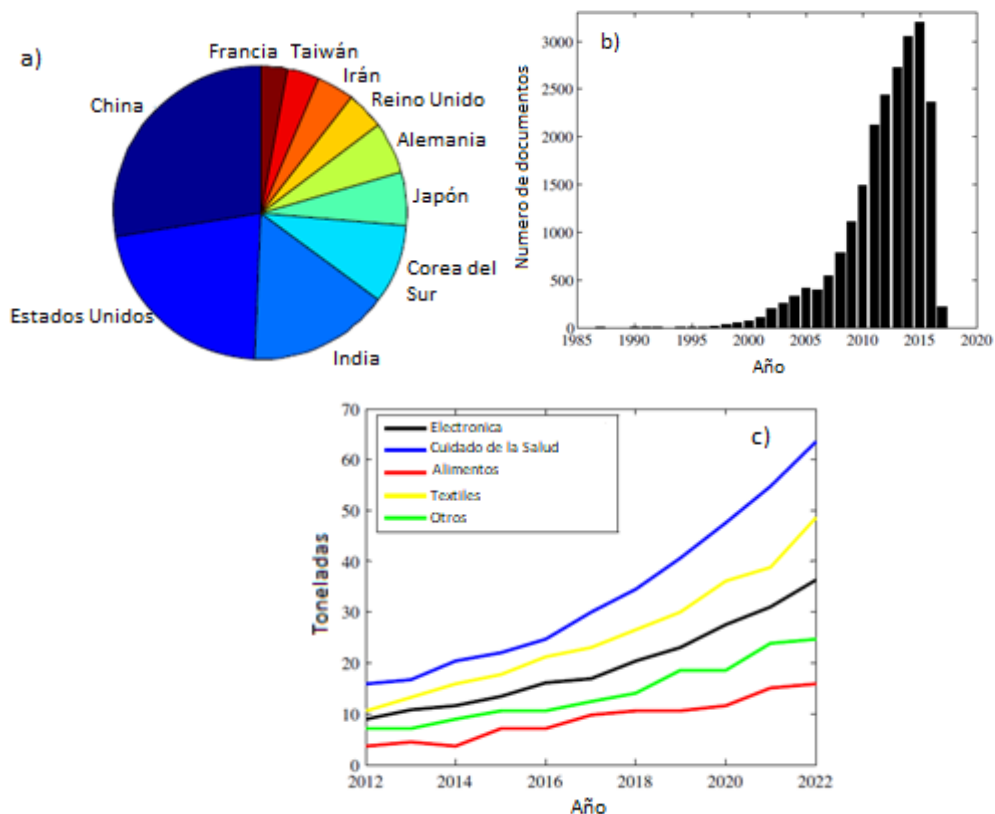


Fig. 4. Distribución de artículos científicos por país (a); Cantidad de artículos científicos relacionados con AgNPs (de 1982 hasta enero de 2017) (b); Toneladas de AgNPs destinadas a diferentes sectores (c). (Syafiuddin et al., 2017).

El principal interés de las AgNPs en el sector salud es debido al mecanismo de acción de la plata sobre los microorganismos (ver sección “Mecanismo de acción sobre microorganismos”), especialmente en microorganismos multi-resistentes (MMR). Por mencionar un ejemplo, se han realizado diversas pruebas de inhibición utilizando AgNPs a microorganismos como *Staphylococcus aureus* con resistencia a oxacilina, *Enterococcus* spp con resistencia a vancomicina, *A. baumannii* con resistencia a carbapenem y polimixina B y *P.aeruginosa* con resistencia a carbapenem. En los microorganismos antes mencionados se mostró un excelente efecto inhibitorio por el uso de AgNPs en ellas (Cavassin et al., 2015).

2.4 Mecanismos de acción de las AgNPs sobre microorganismos

La actividad antimicrobiana ha sido evaluada por una diversidad de investigadores utilizando MMR y microorganismos no resistentes (Rai et al., 2012) (incluyendo Gram-positiva y Gram-negativa), aunque, a pesar de esto, la acción antimicrobiana aún no está comprendida del todo. Sin embargo, utilizando AgNPs, se han propuesto 3 mecanismos de acción fundamentales. Los cuales son:

- Adhesión de las AgNPs sobre la membrana celular
- Introducción de las AgNPs a la célula y daño de las estructuras intracelulares (mitocondria, vacuolas, ribosomas) y biomoléculas (proteínas, lípidos y ADN).
- Toxicidad celular inducida y estrés oxidativo

A continuación, se presenta de forma general, cada uno de los mecanismos de acción; además, en la Fig. 5 se muestran los principales efectos en los microorganismos.

2.4.1 Adhesión de las AgNPs sobre la membrana celular

En este mecanismo propuesto, la carga positiva de las AgNPs es crucial para la adhesión (Abbaszadegan et al., 2014). La carga positiva promueve la atracción electrostática entre las AgNPs y la membrana celular cargada negativamente; como consecuencia, las AgNPs interaccionan con las proteínas de la membrana celular que contienen azufre, causando cambios irreversibles en dicha membrana (Ghosh et al., 2012). Éstos cambios afectan la integridad de la bicapa lipídica y la permeabilidad de la membrana, lo cual afecta la actividad regulatoria de transporte en la membrana (Schreurs & Rosenberg, 1982) propiciando el decremento de contenido celular, proteínas, azúcares y en ocasiones ATP (Li et al., 2013). Las alteraciones mencionadas pueden desestabilizar el correcto funcionamiento de la célula.

También hay que considerar el espesor y composición de la pared celular si es que se desea saber la eficiencia de las AgNPs. Las bacterias Gram-negativa (como *E. coli*) son más propensas a las AgNPs que las bacterias Gram-positiva (como *S. aureus*). Esto debido a un componente clave en la membrana celular, el peptidoglicano. En las bacterias Gram-

positiva, la pared celular está compuesta por una capa de peptidoglicano (30 nm de espesor) cargada negativamente y la cantidad de peptidoglicano es considerablemente mayor en Gram-positiva que en Gram-negativa (3-4 nm de espesor) (Rai et al., 2012). La gran cantidad de peptidoglicano en Gram-positiva deja los iones Ag^+ pegados a la pared celular, previniendo la acción de dichos iones y haciendo a la célula más resistente. Estas diferencias en espesor y estructura podrían explicar porque las células Gram-positivas son más resistentes que las Gram-negativa.

2.4.2 Introducción de las AgNPs a la célula y daño de las estructuras intracelulares y biomoléculas

Existe otro caso en donde las AgNPs podrían introducirse en la célula y afectar la funcionalidad vital de la misma. Cuando esto ocurre, las AgNPs interactúan con las estructuras celulares y ciertas biomoléculas como proteínas, lípidos y DNA. La interacción de las nanopartículas con los ribosomas conduce a la desnaturalización causando la inhibición de la traducción y la síntesis de proteínas (Dakal et al. 2016, Morones et al. 2005). También se ha demostrado que los iones Ag^+ pueden interactuar con los grupos funcionales de las proteínas y enzimas. Dichos iones alteran la estructura 3D de las proteínas e interfieren con los enlaces disulfuro bloqueando los sitios activos de unión causando defectos en el microorganismo (Lok et al., 2006). Otro efecto de las nanopartículas es el bloqueo del metabolismo de azúcar. Se ha demostrado que la inhibición del metabolismo de azúcar es debido a la inactivación de la enzima fosfomanosa- isomerasa consecuencia de la interacción con las AgNPs (Bhattacharya & Mukherjee, 2008). Además, la interacción de las NPs con el DNA provoca la desnaturalización, daños y mutaciones en la biomolécula (Radzig et al., 2013). Se ha determinado que los iones Ag^+ forman complejos con los ácidos nucleicos, preferentemente con los nucleósidos. Estos iones se intercalan entre la purina y piridina interrumpiendo los enlaces de hidrógeno y por consecuencia se altera la estructura de doble hélice (Klueh, Wagner, Kelly, Johnson, & Bryers, 2000). Esta intercalación también puede bloquear la transcripción de genes en el microorganismo (Morones et al., 2005), además de condensar el ADN relajado y dar como resultado la pérdida de habilidad de replicación (Dakal et al., 2016).

2.4.3 Toxicidad celular inducida y estrés oxidativo

Además de los mecanismos ya mencionados, los iones Ag^+ pueden causar estrés oxidativo celular. Las AgNPs tienen la habilidad de generar especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies con radicales libres, tales como peróxido de hidrógeno H_2O_2 , anión superóxido O_2^- , radicales libres ($OH^\bullet$), ácido hipocloroso (HClO) y oxígeno molecular (S. H. Kim, Lee, Ryu, Choi, & Lee, 2011). Las AgNPs aumentan la cantidad de ROS en el microorganismo durante la fosforilación oxidativa (Thannickal & Fanburg, 2000) y como consecuencia se aumenta el estrés oxidativo (Pellieux, Dewilde, & Pierlot, 2000). Los iones Ag^+ pueden bloquear la respiración mitocondrial al adherirse a la membrana celular, causando una disfunción en la cadena respiratoria de transporte de electrones (Belluco et al., 2016). Una cantidad excesiva de radicales libres causa un daño directo a la membrana mitocondrial causando necrosis y eventualmente la muerte celular. El aumento de los niveles de ROS también promueve efectos de genotoxicidad, como mutaciones y oxidación del DNA (Xie, Mason, Pierce, & Sr, 2011). Se considera al radical hidroxil ($OH^\bullet$) como uno de los radicales más potentes debido a que reacciona fácilmente con el DNA (Valavanidis & Vlachogianni, 2009)

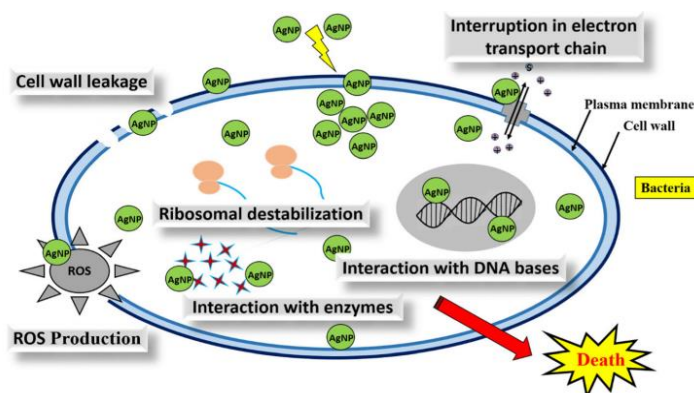


Fig. 5. Principales efectos en microorganismos por parte de las AgNPs.

(Valavanidis & Vlachogianni, 2009)

2.5 Técnicas de síntesis de AgNPs y recuperación de material

Existe una variedad de técnicas de síntesis para AgNPs. En la Tabla 3 se enlistan algunas de las técnicas existentes. Cada uno de los enfoques (físico, químico y biológico) presenta sus respectivas ventajas e inconvenientes. En dicha tabla se exponen ciertas consideraciones que pueden ser importantes al momento de escoger entre una técnica u otra. Se debe hacer énfasis en que la elección de determinada técnica depende de las características deseadas del material a sintetizar, así como la disponibilidad de material y equipo.

Tabla 3. Variedad de técnicas de síntesis para AgNPs.

Técnicas de síntesis para AgNPs		
Enfoque	Técnica	Consideraciones
Físico	Ablación láser	No se requieren de reactivos químicos en soluciones. Sin embargo, los costos primarios para la inversión de equipo son considerables, sobre todo la fuente del láser. (Natsuki et al., 2015)
	Evaporación-condensación	Se pueden obtener NPs de una variedad de tamaños, aunque los hornos utilizados ocupan bastante espacio, un gran consumo de energía y se requieren decenas de minutos para alcanzar la estabilidad térmica (Natsuki et al., 2015)
	Descomposición térmica	NPs con tamaño controlado, aunque la síntesis puede llevar horas. (Syafiuddin et al., 2017)
Químico	Reducción química	La variedad de formas y tamaños de NPs depende los reactivos, agentes reductores, así como otros parámetros. Las NPs se encuentran en medio acuoso (Natsuki et al., 2015).
	Micro emulsión	Técnica similar a “Reducción química”. De igual manera, las NPs se encuentran en medio acuoso (Guajardo Pacheco, 2013)
Biológico	Extractos de plantas	Los extractos de plantas pueden trabajar como agentes reductores. Síntesis en medio acuoso (Syafiuddin et al., 2017).
	Hongos como agentes reductores	Implementación de hongos y biomasa como agentes reductores. Síntesis en medio acuoso (Syafiuddin et al., 2017).
	Microorganismos como agentes reductores	Implementación de diversos microorganismos como agentes reductores. Síntesis en medio acuoso (Syafiuddin et al., 2017)

En las técnicas mencionadas anteriormente si se consideraran ciertos parámetros adecuados, se logra una síntesis exitosa; sin embargo, al final del proceso muchas veces resulta complicado recuperar el material sintetizado del medio en el que se encuentra. En la mayoría de los métodos de síntesis las NPs obtenidas se encuentran dispersas en un medio acuoso. Algunos métodos convencionales de extracción son evaporar el medio acuoso o centrifugar, pero por lo regular este tipo de métodos suelen ser tardados y existe la posibilidad de generar la aglomeración de las NPs. También existe la posibilidad que las NPs terminen expuestas al medio ambiente sin protección alguna, provocando la oxidación de ellas. Las pueden encontrarse en suspensión, agregadas o aglomeradas, o reaccionar con diferentes especies presentes en el sistema acuoso (Scenihhr, 2013). Además, pueden liberarse en el medio ambiente a través de corrientes de aguas residuales y ser retenidas en lodos de aguas residuales (Kaegi et al., 2013). En E.U. y Europa estos lodos a menudo son utilizados como fertilizantes para los suelos agrícolas, y, por ende, las AgNPs son expuestas a organismos en el suelo y el agua (McGillicuddy et al., 2017). La alta reactividad del ion Ag^+ permite asociarse con ligandos o iones (como sulfuro o cloruro) presentes en el medio ambiente (Luoma, 2008) y una prolongada exposición de AgNPs en el ecosistema puede tener efectos tóxicos y dañinos sobre los seres vivos debido a los efectos oxidativos (genotoxicidad y citotoxicidad) (León-Silva et al., 2016).

Como se puede ver, existe una necesidad para agilizar el proceso en la recuperación de AgNPs, así como un cuidado en el manejo de estas partículas. En un trabajo previo, Mandel y Hutter han demostrado una rápida separación magnética en fase acuosa entre NPs de óxido de hierro y un imán de mano (Mandel & Hutter, 2012). Por lo tanto, crear un compósito en el que se encuentren inmersos AgNPs y un material que responda a un campo magnético externo (como hierro) es una alternativa para minimizar las complicaciones mencionadas previamente ya que se reduce el tiempo de recuperación y se tiene mayor control sobre las nanopartículas.

2.6 Síntesis por Plasma de Microondas

En esta sección se presenta de una manera rápida los procesos que dan lugar a la generación de un plasma por microondas y el potencial que tiene el plasma para realizar síntesis de nanomateriales.

Se considera un plasma como un gas ionizado con igual número de cargas eléctricas, positivas y negativas. Este estado de la materia puede ser alcanzado cuando una gran parte de las partículas en un sistema alcanzan la energía suficiente para que sea posible la ionización de sus átomos o moléculas constituyentes y, por ende, liberar electrones (Tabarés, et al, n.d.). A pesar de la dificultad de clasificar los plasmas existentes, se puede decir que el plasma utilizado en la síntesis de este trabajo es un “Plasma frío” ya que se inicia a bajas presiones y las temperaturas alcanzadas son próximas a la temperatura ambiente, a diferencia de los plasmas calientes y térmicos (que pueden alcanzar temperaturas de 10^8 K y 10^4 K, respectivamente) (Tabarés et al., n.d.). Ya que en los gases a baja presión existen cargas libres debido a la radiación cósmica, el plasma frío puede ser iniciado incidiendo sobre una muestra de gas a baja presión alguna forma de energía ionizante, típicamente por medio de un arco eléctrico de corriente continua, campo eléctrico DC o AC (radio frecuencia o microondas). Como consecuencia, los electrones libres se aceleran y obtienen energía cinética de manera eficiente desde el campo electromagnético. Esta energía se intercambia fácilmente a través de colisiones elásticas con otras especies neutras, ionizándolas (considerando la energía umbral) y liberando electrones acelerados que producen más ionizaciones (Tabarés et al., n.d.; Tanarro, et al, 2011). Una amplia variedad de procesos físicos puede suceder cuando un electrón colisiona con un átomo o molécula, como ionizaciones, excitaciones, etc. Por ejemplo, si se genera un plasma frío a partir de un gas como el aire, una de las especies generadas en el medio es el radical hidroxilo. Este radical es muy reactivo y fuertemente oxidante que puede atraer un átomo de hidrógeno de una gama de compuestos orgánicos para generar más radicales (Whitehead, 2016). Así como el radical hidroxilo se genera, debido a los procesos físicos mencionados, una gran variedad de especies surge en el plasma, produciendo una alta reactividad de los gases constituyentes del plasma. Esta reactividad puede aprovecharse para introducir muestras en el sistema susceptibles a ser descompuestas y atomizadas por el plasma dado que absorben la energía generada por la recombinación de moléculas y átomos en el plasma (Tabarés et al., n.d.; Tanarro et al., 2011). En particular, las sales y algunos compuestos orgánicos son muy propensos a ser descompuestos por el plasma, los cuales pueden ser aprovechados como precursores para producir nuevos compuestos. En resumen, el plasma frío tiene un gran potencial para la generación de nuevos materiales, y este trabajo en especial, explota dicha característica para producir un compuesto bactericida

recuperable partiendo de una sal que contiene plata (nitrato de plata) y un metalorgánico como aporte de hierro (ferroceno).

2.7 Aplicación en tratamiento de aguas residuales

Una aplicación en la cual es posible aprovechar las características principales del compuesto (actividad antimicrobiana y respuesta a un campo magnético) es implementado en tratamiento de aguas residuales, sobre todo en la etapa terciaria, que es donde se desinfectan las aguas y se adsorben los metales pesados. Habitualmente, para la desinfección se utilizan compuestos clorados como dióxido de cloro y cloramidas; sin embargo, estos compuestos pueden reaccionar con otros ingredientes en el agua y crear productos dañinos para la salud (Bishoge et al., 2018). Remplazar los compuestos clorados por AgNPs es una alternativa para la etapa de desinfección gracias a la actividad de estas nanopartículas sobre los microorganismos. Por otra parte, las nanopartículas de óxido de hierro tienen la capacidad de adsorber metales pesados (debido a su alta área superficial), como por ejemplo, el Telurio (Bishoge et al., 2018; Lu et al., 2016). Además, la separación magnética facilita la recuperación del material evitando procesos de separación que pueden llegar a ser sofisticados, como membranas y centrifugación. Como se puede ver, el compuesto que se desea sintetizar en esta tesis puede ser fácilmente aplicable en tratamiento de aguas residuales. Sin embargo, para fines de este trabajo, los objetivos están delimitados a evaluar la actividad antimicrobiana; un trabajo posterior será necesario para determinar la eficiencia del compuesto en tratamiento de aguas residuales.

2.8 Antecedentes en la síntesis de materiales con AgNPs y compuestos susceptibles a campos magnéticos.

Sharman y colaboradores realizaron una síntesis de NPs núcleo-coraza de óxido de hierro como núcleo y con incrustaciones de plata, sintetizadas por descomposición térmica de

acetato de plata, en presencia de micro esferas de óxido de hierro. Ellos utilizaron difeniléter a 200 °C (Sharma & Jeevanandam, 2013). Utilizado un método distinto, se sintetizaron NPs core-shell de óxido de hierro@plata por reducción acuosa bajo condiciones ambientales combinando dos soluciones precursoras en distintas proporciones (Carroll et al., 2010). Por otro lado, se sintetizaron nanocompuestos de Ag@Fe₃O₄ utilizando la técnica de reducción química *in situ* de iones de plata por maltosa en presencia de una fase magnética particular y moléculas de poliacrilato que sirven como espaciadores entre el óxido de hierro y las nanopartículas de plata (Prucek et al., 2011). Amanda y compañeros sintetizaron un compuesto de Ag@Co con propiedades magnéticas y bactericidas en donde reportan una alta actividad bactericida en fuentes reales de agua (agua de grifo clorada, agua no clorada de fuente natural y agua de río) (Alonso et al., 2012). En un trabajo previo del grupo de investigación del Dr. Gerardo Soto se sintetizaron materiales nanocompuesto magnéticos, donde la parte magnética es atribuida a la presencia de nanopartículas de Fe₃C, las cuales se encuentran incrustadas en una matriz de carbono. La fase dispersa tiene características similares al carbono activado y fue utilizado para extracción de DNA [11]. Gracias a este último trabajo se observó el potencial de esta técnica de síntesis y se decidió funcionalizar este nanocompuesto con NPs de plata y aprovechar sus propiedades bactericidas en la inhibición de crecimiento bacteriano.

CAPITULO III

3 HIPÓTESIS

El material núcleo-coraza compuesto de Fe_3C @carbono puede ser dopado con nanopartículas de plata utilizando la técnica de “Plasma por microondas” y aplicarse como agente antimicrobiano.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Sintetizar el compuesto $Fe_3C@$ carbono/AgNPs utilizando la técnica de plasma por microondas y evaluar la actividad antimicrobiana.

4.1.1 Objetivos particulares

1. Sintetizar materiales tipo compuesto variando la cantidad del precursor de plata.
2. Caracterizar los compósitos mediante:
 - a) Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) para conocer sus propiedades morfológicas.
 - b) Espectroscopia de rayos X por energía dispersiva (EDS) y Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS) para estimar la composición elemental.
 - c) Difracción de rayos X (XRD) para determinar la cristalinidad del material.
3. Realizar la evaluación antimicrobiana sobre cepas de *E coli* utilizando los métodos de Kirby-Bauer y Densidad Óptica para determinar la efectividad de los materiales para propósito bactericida.

CAPÍTULO IV

5 METODOLOGÍA

La metodología se divide en 2 etapas. La primera etapa consiste en la “Síntesis del compuesto” por la técnica de plasma de microondas y las caracterizaciones correspondientes mencionadas previamente. La segunda etapa está enfocada en la “Evaluación antimicrobiana”. Para lo anterior, en este capítulo se presentan los materiales y equipos utilizados (Tabla 4). En la Fig. 6 se muestra el reactor donde se realizó la síntesis.

5.1 Materiales y Equipo

Tabla 4. Lista de los principales reactivos utilizados para la síntesis del compuesto y la evaluación antimicrobiana.

Etapas	Materiales	Equipo
Síntesis del compuesto	Nitrato de plata (Mallinckrodt Chemical Works)	Reactor de plasma por microondas (Ver Fig. 6)
	Polietilenglicol PEG-8,000 (Alfa Aesar)	
	Ferroceno(Sigma Aldrich)	
Evaluación antimicrobiana	Agar LB	Prensa hidráulica
	Caldo LB	Campana de flujo laminar (Bio Sefty Cabinet)
	<i>E.coli</i> DH5 α	Shaker Incubator (mcr)
		Espectrómetro

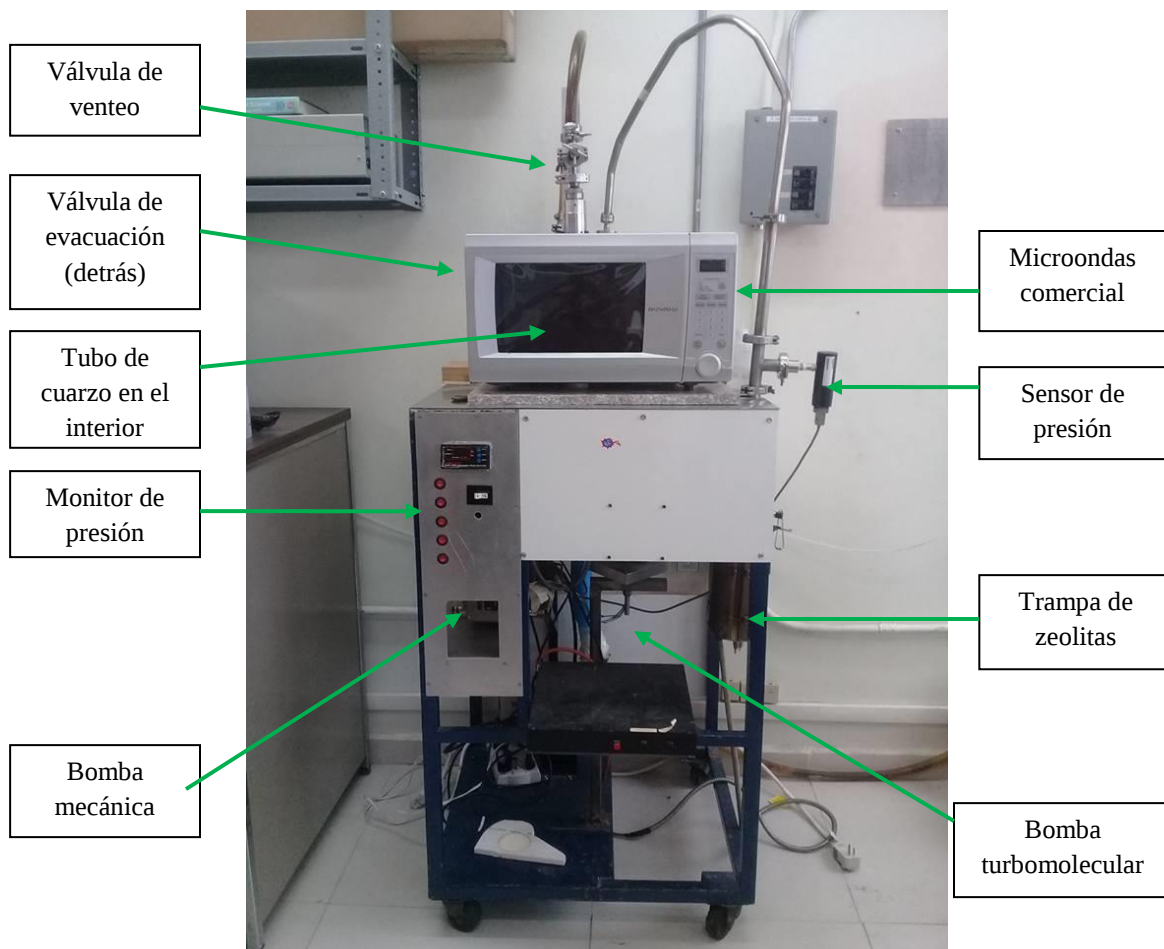


Fig. 6. Reactor de plasma por microondas.

5.2 Métodos

5.2.1 Síntesis de compósito

Para utilizar el reactor de plasma por microondas se empleó el siguiente protocolo.

1. Se colocan los reactivos previamente pesados y mezclados dentro del tubo de cuarzo (Fig. 7).
2. Se conecta el tubo de cuarzo a la línea de vacío.
3. Se enciende la bomba mecánica y se aguarda hasta alcanzar una presión de 100 mTorr.
4. Se enciende la bomba turbomolecular y esperar a alcanzar la presión base (~55 mTorr).
5. Se enciende el microondas por un determinado tiempo, según los parámetros dados posteriormente. En esta etapa se genera el plasma dentro del tubo de cuarzo y por consecuencia se realiza la síntesis.
6. Después de la síntesis se ventea el sistema (cerrar la válvula de evacuación y abrir lentamente la válvula de venteo). Esperar unos minutos a que se enfríe el tubo de cuarzo.
7. Desconectar el tubo de cuarzo de la línea de vacío para recuperar el material sintetizado.
8. En caso de no utilizar el equipo para otra síntesis, apagar la bomba turbomolecular y después la bomba mecánica.



Fig. 7. Tubo de cuarzo utilizado para la síntesis de compósitos.

Para la síntesis del compósito, se propusieron 2 métodos diferentes para determinar si existía una diferencia en cuanto a la composición química, morfología o actividad antimicrobiana. Los parámetros de síntesis se muestran en la Tabla 5. A continuación, se describen los métodos empleados.

- **Método 1:** Siguiendo el protocolo ya mencionado, se colocó el ferroceno y PEG 8000 en el tubo de cuarzo y se realizó la síntesis. Posteriormente, se desconectó el tubo de cuarzo de la línea de vacío para agregar el nitrato de plata; se realizó nuevamente la síntesis. Las muestras sintetizadas por este método fueron M1, M3, M5, M7, M9.
- **Método 2:** Se agregaron los tres reactivos (ferroceno, PEG 8000 y nitrato de plata) al mismo tiempo en el tubo de cuarzo y se realizó la síntesis siguiendo el protocolo. Las muestras sintetizadas por este método se denotan por las etiquetas: M2, M4, M6, M8, M10.

Los reactivos se pesaron en balanza digital. Es importante mencionar el uso del equipo de seguridad correspondiente (bata de laboratorio, guantes de nitrilo, cubre bocas, etc.) durante la manipulación de reactivos, así como en la síntesis y recuperación del compósito dada la probable toxicidad de los materiales empleados.

Tabla 5. Parámetros de síntesis de compósito.

Muestra	Tiempo	Presión	Ferroceno	Polietilenglicol	Nitrato de plata
M0	5 min	55 mTorr	1000 mg	1000 mg	0 mg
M1	5 min	50 mTorr	1000 mg	1000 mg	100 mg
M2	5 min	56 mTorr	1000 mg	1000 mg	100 mg
M3	5 min	55 mTorr	1000 mg	1000 mg	325 mg
M4	5 min	55 mTorr	1000 mg	1000 mg	325 mg
M5	5 min	55 mTorr	1000 mg	1000 mg	550 mg
M6	5 min	55 mTorr	1000 mg	1000 mg	550 mg
M7	5 min	55 mTorr	1000 mg	1000 mg	775 mg
M8	5 min	56 mTorr	1000 mg	1000 mg	775 mg
M9	5 min	56 mTorr	1000 mg	1000 mg	1000 mg
M10	5 min	55 mTorr	1000 mg	1000 mg	1000 mg

Después de las síntesis, se llevó a cabo la caracterización de las muestras por SEM, TEM, EDS, XRD y XPS para conocer la morfología y composición química.

5.2.2 Evaluación antimicrobiana

Para comprobar la actividad antimicrobiana se realizaron dos evaluaciones para el compósito. La primera fue utilizando el método de Kirby-Bauer y la segunda fue por densidad óptica.

5.2.2.1 Método de Kirby-Bauer

Este método es empleado para determinar la sensibilidad de un agente microbiano frente a un antibiótico. Consiste en preparar un medio de cultivo sólido, en donde se dispersa un agente microbiano y un antibiótico. El antibiótico se encuentra inmerso en un disco absorbente, o bien, puede estar en forma de pastilla. En este caso, el agente microbiano será *E. coli* y el compósito cumplirá la función de antibiótico. Utilizando una prensa hidráulica, se hicieron pastillas de cada una de las muestras de compósito con un área de aproximadamente 0.25 cm² y se colocaron dentro de cajas individuales (Ver Fig. 8). Estas pastillas cumplirán la función de antibiótico.



Fig. 8. Pastillas de cada una de las muestras sintetizadas.

Para preparar el preinóculo, la bacteria *E. coli* (DH5 α), se cultivó en caldo LB en un matraz erlenmeyer (250 mL) por 24 h a 37°C. Adicionalmente se prepararon cajas de Petri con agar LB, de acuerdo a las instrucciones de la casa comercial

Antes de la siembra de la bacteria en las cajas Petri, las pastillas de compósito se colocaron dentro de la campana de flujo laminar y esterilizaron con luz UV durante 5 min para eliminar cualquier posible contaminación biológica. Una vez realizado esto, las cajas de petri se introdujeron en la campana. Las cajas de Petri con agar LB fueron inoculadas con el preinóculo antes mencionado. Para ello se humedece un hisopo de algodón estéril y se sembró homogéneamente la bacteria sobre la superficie del agar. Posteriormente y con mucho cuidado se colocaron sobre el agar las pastillas de compósito, distribuidas en las 6 cajas de Petri. Las pastillas se hicieron por duplicado.

5.2.2.2 Densidad Óptica

Esta técnica consiste básicamente en un haz de luz con cierta longitud de onda que atraviesa una celda transparente; como consecuencia, se mide la cantidad de luz que logro atravesar la celda. Para fines biológicos, se coloca un medio de cultivo con bacteria para determinar el crecimiento bacteriano en función de la cantidad de luz medida por el espectrómetro. Para ésta evaluación, se utilizó una longitud de onda de 600 nm. Para la medición de turbidez se utilizaron las muestras M0, M3 y M10. A diferencia de la evaluación anterior, esta se llevó a cabo en un medio líquido. La Tabla 6 muestra la cantidad de pruebas utilizadas para esta evaluación. Cada una de las pruebas fueron rotuladas de la siguiente manera: M0, M3 y M10 significando el compósito utilizado; los números (1 y 2) hacen referencia al duplicado; y por último N=sin bacteria, mientras que B=con bacteria. A todas las pruebas se les agregó 2 ml de medio LB. A las pruebas correspondientes se les agregó 20 mg de compósito (M0, M3 o M10) y 50 μ L de preinóculo.

Tabla 6. Contenido en cada uno de los tubos.

Pruebas	Medio LB	Bacteria (<i>E.coli</i> DH5 α)	Compósito
M0-1N	X		X
M0-2N	X		X
M0-1B	X	X	X
M0-2B	X	X	X
M3-1N	X		X
M3-2N	X		X
M3-1B	X	X	X
M3-2B	X	X	X
M10-1N	X		X
M10-2N	X		X
M10-1B	X	X	X
M10-2B	X	X	X
1B	X	X	
2B	X	X	

En la Fig. 9 se pueden observar las pruebas en donde se encuentra el material correspondiente en cada una de ellas. Después, todas las pruebas se colocaron en una gradilla y esta última se introdujo en una incubadora con agitador y se cultivó por 24 h a 37 °C. La solución de la prueba M0-1N sirvió como blanco para la prueba M0-1B, el tubo M0-2N para M0-2B y así sucesivamente en ese orden. Las pruebas 1B y 2B sirvieron como referencia. Pasadas las 24 horas, se sacó la gradilla de la incubadora y se esperaron unos minutos para que se precipitara el compósito; también se utilizó un imán para precipitar las partículas más pequeñas. Posteriormente, se tomó 1 mL de cada prueba y se colocaron en celdas para el espectrómetro. Siguiendo el orden ya mencionado, se realizaron las mediciones y la captura de datos.

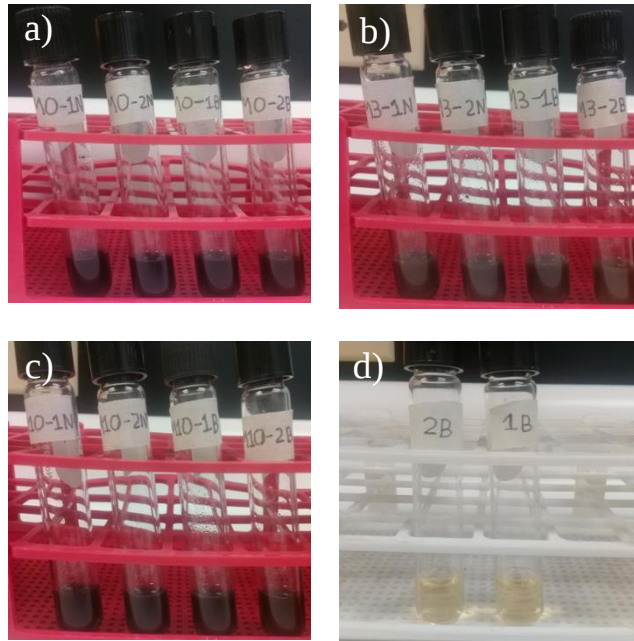


Fig. 9. Imágenes de los tubos a medir. Los incisos a), b) y c) contienen los materiales M0, M3 y M10 respectivamente. En el inciso d) se muestran los tubos con medio LB y bacteria.

CAPÍTULO V

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Síntesis de compósitos

Siguiendo cada una de las metodologías planteadas previamente, se obtuvieron compósitos con una consistencia de polvo granulado. Para recuperar el material del tubo de cuarzo se raspó el mismo con la ayuda de una varilla de aluminio. En la Fig.10 se observa una imagen de los compósitos obtenidos. Cada una de las 11 muestras fueron guardadas en viales y rotuladas de M0 (muestra en la cual no se utilizó AgNO_3) a M10 (muestra con la máxima cantidad de AgNO_3); donde M1, M3, M5, M7 y M9 corresponden al “método 1” y M2, M4, M6, M8 y M10 corresponden al “método 2” (ver Tabla 5).

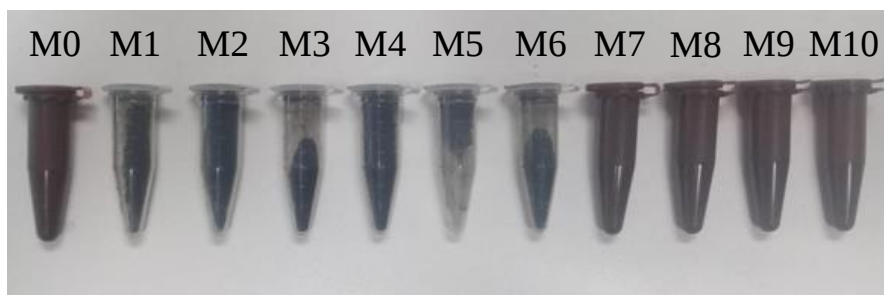


Fig. 10. Imagen de los compósitos sintetizados.

Para comprobar que se obtuvo un material magnético se realizó una prueba utilizando imanes de neodimio para atraer el compósito (M3) por la pared del vial (Fig.11). Nótese que el compósito se magnetiza lo suficiente como para mantenerse suspendido. Todas las muestras presentaron una respuesta similar al imán utilizado. Una segunda prueba se realizó colocando aproximadamente 25 microgramos de compósito (M3) en un frasco de vidrio con isopropanol (Fig.12). Del lado izquierdo de la Fig. 12 se observa el contenedor al tiempo 0. Después de 1 minuto se puede apreciar cómo se precipita el compuesto con ayuda de los imanes (lado derecho).



Fig. 11. Atracción magnética entre compuesto M3 con imanes de neodimio.



Fig. 12. Prueba magnética en medio acuoso (isopropanol).

6.2 Caracterización de compósitos

6.2.1 Caracterización de morfología por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Para obtener una primera aproximación a la morfología del compuesto, se empleó la Microscopía Electrónica de Barrido, para obtener imágenes de las muestras en estudio. En la Fig. 13 se muestran cuatro muestras de compuesto sintetizadas por ambos métodos (M0, M1, M6, M9 y M10). Las muestras M1 y M9 corresponden al método 1 de síntesis, mientras que las muestras M6 y M10 corresponden al método 2. En dicha imágenes se observa homogeneidad en todas las muestras de los materiales sintetizados, observada con una escala de 6 micrómetros de amplificación. A pesar de que la cantidad de AgNO_3 , o método implementado para la síntesis estuvo variando, las imágenes de SEM permiten observar un material granuloso con una alta porosidad en las cuatro muestras. Por lo tanto, se puede apreciar que habrá una superficie porosa en el material sin importar la ruta de síntesis.

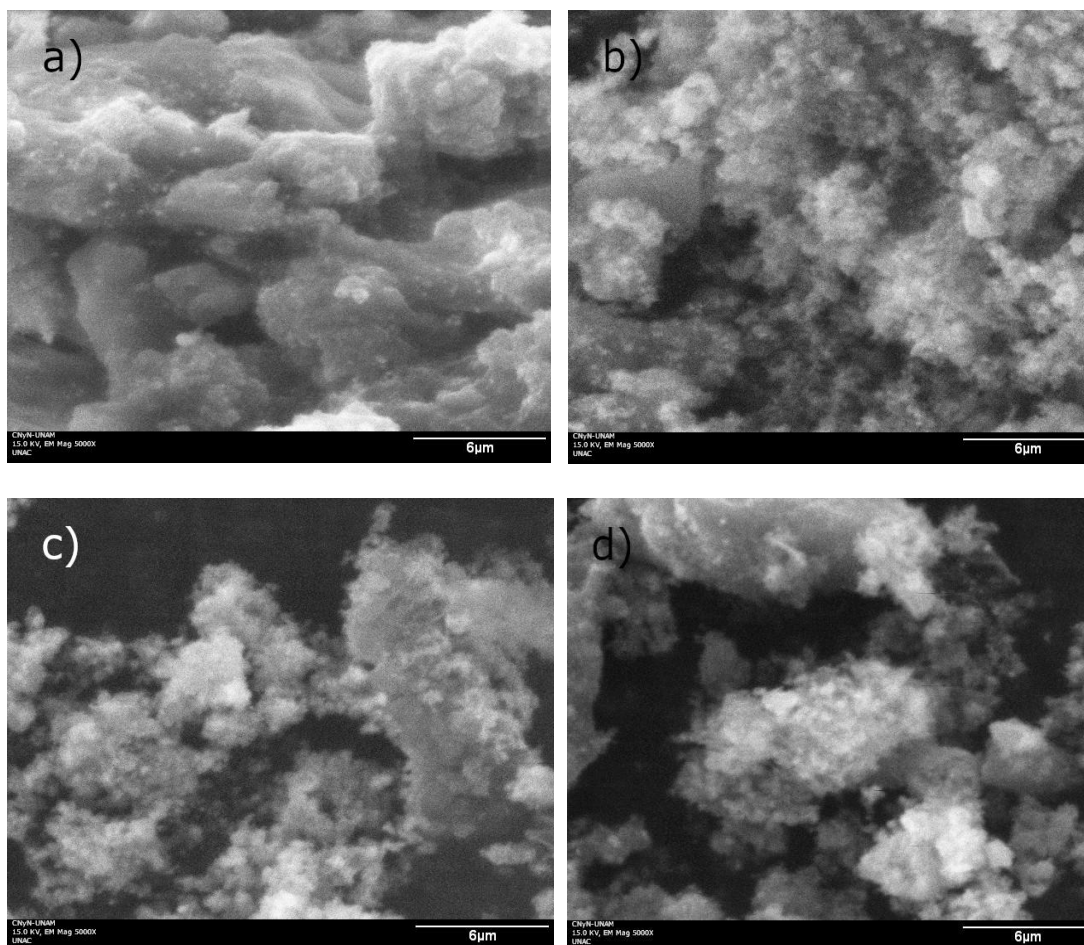


Fig. 13. Imágenes de micrografías obtenidas por SEM. Las imágenes a), b), c) y d) representan las muestras M1, M6, M9 y M10, respectivamente.

6.2.2 Caracterización de la composición química por Espectroscopía de rayos X por energía dispersiva (EDS)

En la caracterización por EDS se generaron espectros para la muestra M0 y M9 con el fin de tener una primera aproximación de la composición química. En la Fig.14 a) se observan las transiciones $K\alpha$ características para los elementos C, O y Fe. En cambio, para la Fig.14 b), además de los picos ya mencionados, se observa la señal proveniente de la Ag. Estos espectros proporcionan datos de que el compósito contiene los elementos deseados y dan pie a caracterizaciones de mayor precisión.

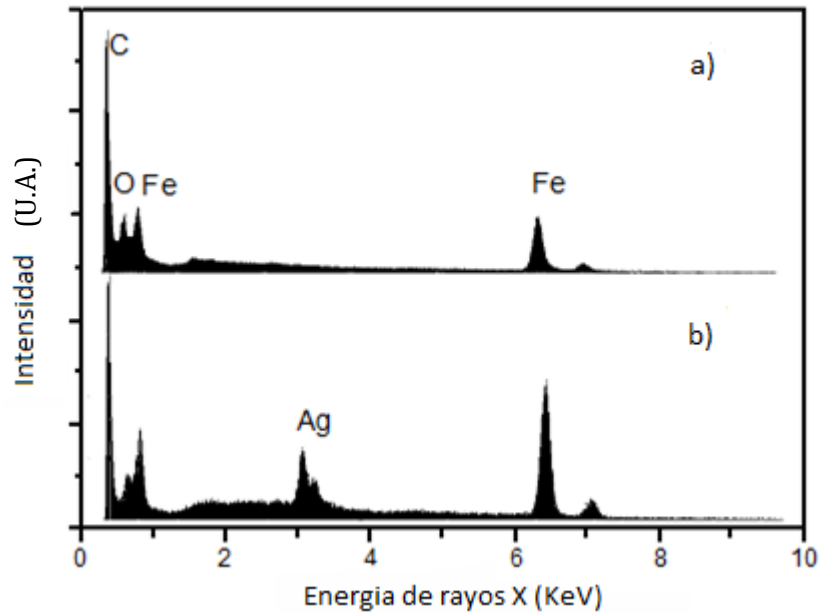


Fig. 14. Espectros generados por EDS, a) M0 y b) M9.

6.2.3 Caracterización de morfología por Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM)

Para conocer con más detalle la morfología de los materiales sintetizados en este trabajo, la muestra M6 se caracterizó por medio de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM). Como resultados, en la Fig. 15 se observan imágenes de la muestra M6. En cada una de las imágenes se puede apreciar una matriz de carbono que envuelve a las NPs. Dicha muestra fue seleccionada de forma arbitraria para determinar su morfología. En el inciso a) se observa una imagen amplia (100 nm) en donde se observa un claro contraste de los típicos tonos grises, además, se hace un acercamiento de la misma zona (10 nm) en donde se observa una NP de aproximadamente 5 nm adherida a la matriz de carbono. En la imagen del inciso b) se pueden observar NPs dentro de las capas de grafito. Por otra parte, en la imagen del inciso c) se observa una NP en la cual se logran apreciar sus planos cristalinos.

Por lo pronto, las secciones oscuras pueden representar el carburo de hierro, así como las AgNPs, mientras que las secciones tenues representan la matriz de carbono (grafito). Las imágenes de TEM permiten determinar un compuesto en donde las NPs se mantienen

encerradas por las capas de grafito; aparentemente, el grafito tiene la función de “soporte” para el carburo de hierro y la plata.

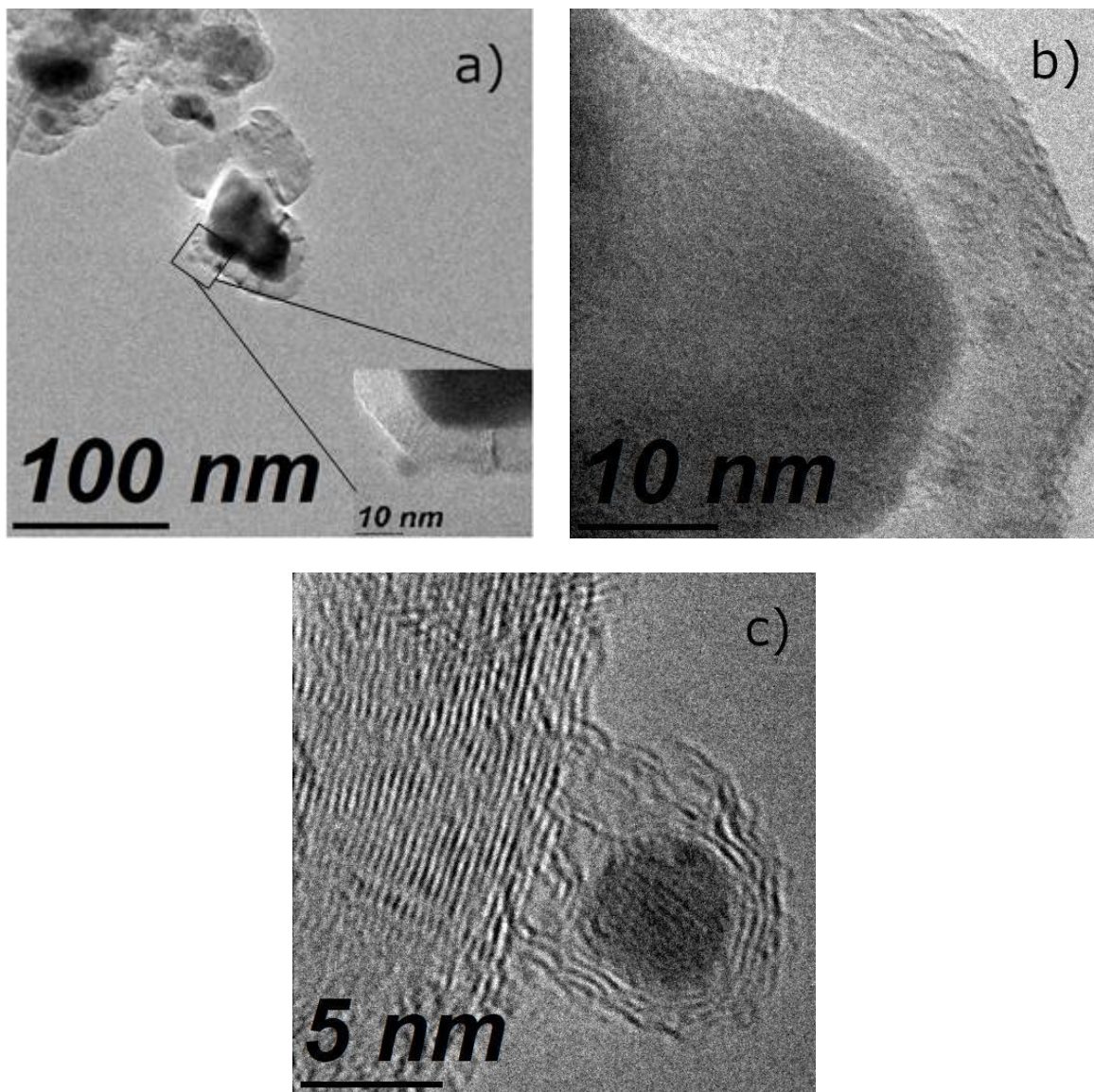


Fig. 15. Micrografías de la muestra M6 obtenidas mediante TEM. Las imágenes a), b) y c) representan distintas zonas la misma muestra.

6.2.4 Caracterización de las propiedades estructurales por medio de Difracción de rayos X (XRD)

Es difícil distinguir que NPs corresponden a compuestos de carburo y cuales a la plata, sin embargo, con la ayuda de los difractogramas de XRD es posible determinar la cristalinidad de los compuestos o elementos involucrados en el compuesto y así poder ubicar las NPs en las imágenes de TEM mostradas previamente

Las muestras M0, M2, M6 y M10 se sometieron a la caracterización por difracción de rayos X (Fig.16). En el difractograma de la muestra M0 (inciso a)) se muestra el plano cristalino (0 0 2) correspondiente al grafito y el plano cristalino (0 3 1) correspondiente al Fe_3C . Sin embargo, este mismo difractograma refleja que el Fe_3C es un material que tiene una baja simetría, debido a la cantidad de picos que tiene este sistema cristalino. La cementita, es decir, el Fe_3C pertenece a un sistema ortorrómbico, grupo espacial Pnma (62), con parámetros de red $a = 0.5078$ nm, $b = 0.6733$ nm, $c = 0.4519$ nm, $\alpha=\beta=\gamma=90$. Se utilizaron las fichas ICSD 01-075-1621 y ICSD 00-034-0001 para identificar los planos cristalinos para el grafito y el Fe_3C respectivamente. En el difractograma de la muestra M2 (en donde se utilizaron 100 mg de AgNO_3 como reactivo) aparecen los planos cristalinos característicos de la plata. Para los difractogramas M6 y M10 se utilizaron 550 mg y 1 g de AgNO_3 respectivamente y también se pueden observar los planos característicos de la Ag. Se puede observar que los planos de Fe_3C han sido opacados casi en su totalidad debido a la Ag; además, los picos de Ag se muestran muy definidos y con alta intensidad, lo que significa que el metal noble se encuentra en su fase cristalina FCC, basado en ICSD 00-004-0783. En la Ag, para los ángulos 38.19° , 44.41° , 64.53° y 77.4° los índices de Miller correspondientes son (1 1 1), (2 0 0), (2 2 0) y (3 1 1), respectivamente. En base a los resultados de XRD, se puede decir que la NP observada en la Fig. 15 c) es de la Ag.

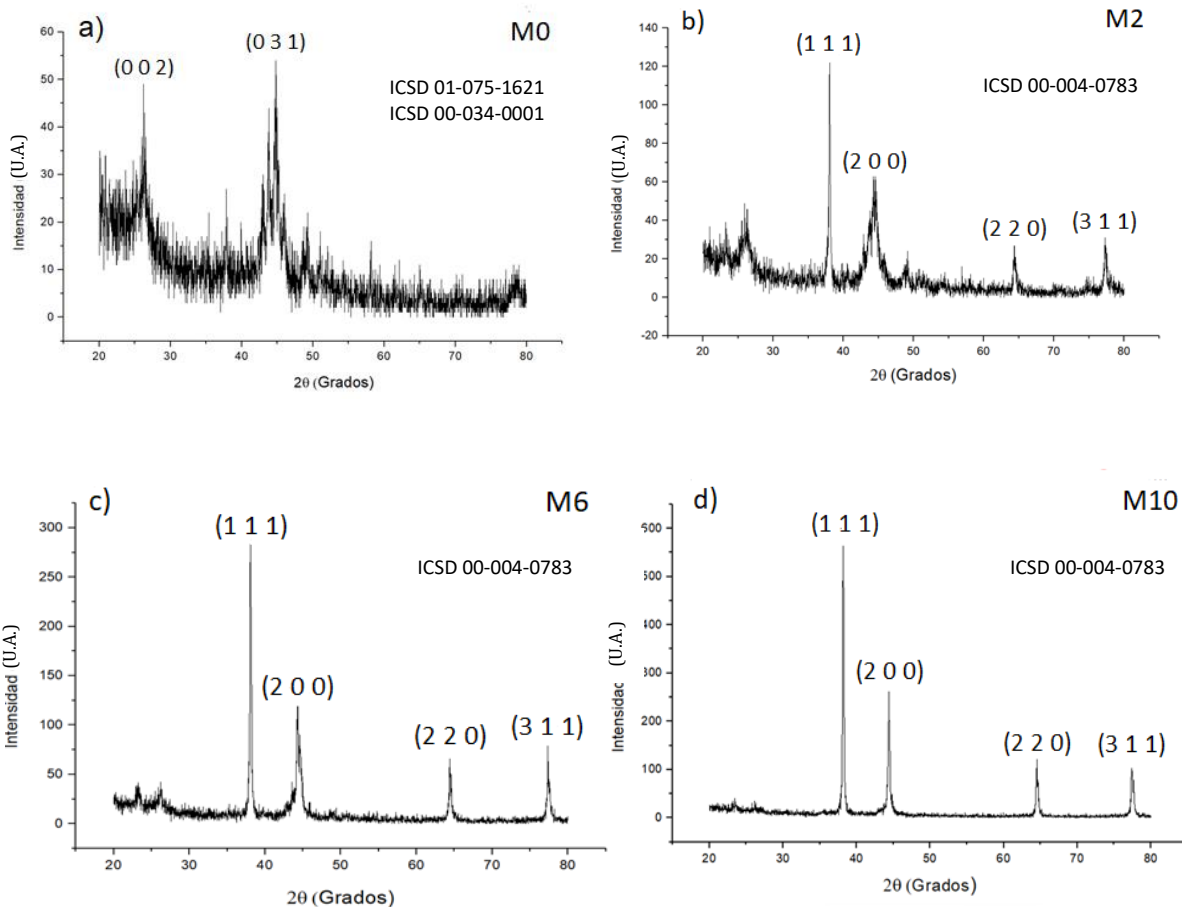


Fig. 16. Difractogramas de rayos X. Las imágenes con los incisos a), b), c) y d) corresponden a los difractogramas de las muestras M0, M2, M6 y M10 respectivamente.

6.2.5 Caracterización de composición química por Espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS)

Para determinar la composición química del compuesto, se analizó la muestra M10. En la Fig. 17 a) se muestra un espectro de XPS para dicha muestra. Se pueden identificar picos característicos de electrones Auger para el O y el Fe. También se pueden observar energías de enlace para los elementos O, N, C, Fe y Ag. Para determinar cuantitativamente la contribución de cada especie en el compuesto (contribución superficial), se realizaron análisis de alta resolución. La Fig. 17 b) muestra un resumen de los ajustes gaussianos para la muestra M10; además, se consideró un factor de sensibilidad estándar para cada elemento involucrado. En la Tabla 7 se muestra el porcentaje de elementos involucrados en el compuesto, en el cual,

el enlace doble de C tiene la mayor contribución en la superficie. Otros compuestos de carbono como Fe-C y C-O también se encuentran presentes en la muestra. La transición de Fe-2p se divide en 2 componentes importantes: el pico a 710.4 eV puede ser debido a Fe_2O_3 , mientras que el pico a 707.6 eV corresponde a Fe_3C . La transición N-1s (399.7 eV) significa que el nitrógeno está formando un nitruro de metal, como FeN_x . El valor de energía para Ag-3d, 368.2 eV, denota que la plata se encuentra en un estado no oxidado, Ag^0 .

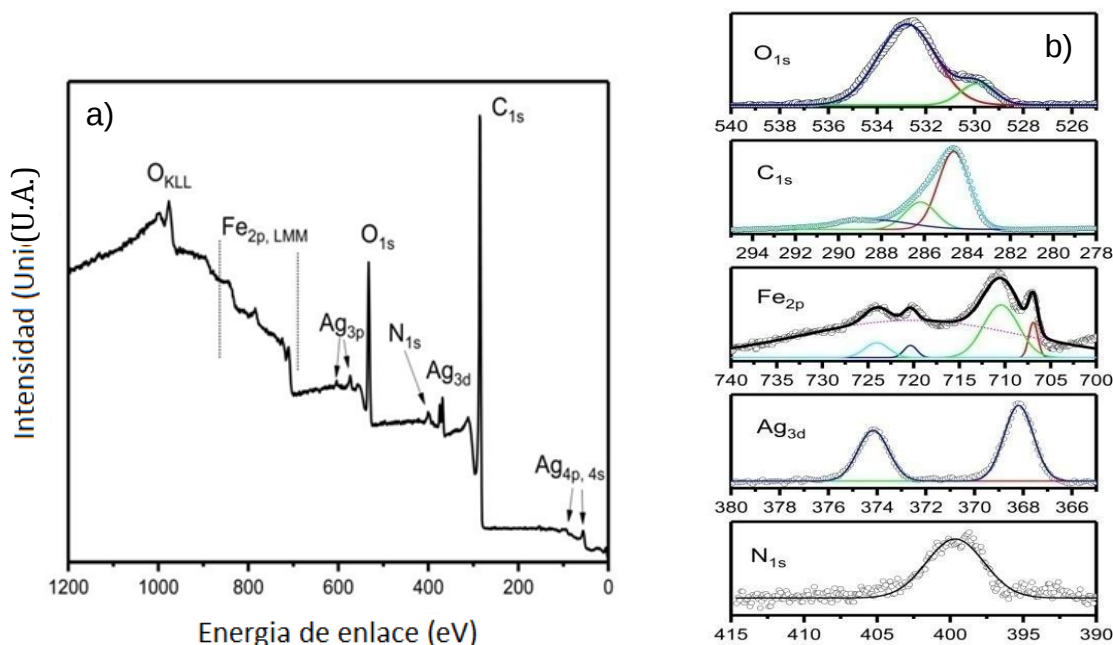


Fig. 17. Espectros de XPS. Espectro correspondiente a la muestra M10, a); Análisis de alta resolución para cada una de las especies involucradas (O, C, Fe, Ag y N), b).

Tabla 7. Resumen de tratamiento de datos.

Señal		Posición (eV)	FWHM	Área	Factor de sensibilidad	% atómico	Asignado a
O-1s		532.8	2.36062	16872	0.711	14.0	O-C
		529.9	1.64837	2639		2.2	Fe_2O_3
Fe	$2p_{3/2}$	707.6	0.97872	831	2.686	0.2	Fe-C
	$2p_{1/2}$	720.4	1.44758	425		--	
Fe	$2p_{3/2}$	710.4	3.88248	4926	2.686	1.1	Fe_2O_3
	$2p_{1/2}$	724.0	2.65807	952		--	
Ag	$3d_{5/2}$	368.2	1.20743	3603	5.198	0.4	Ag metálico
	$3d_{3/2}$	374.2	1.26102	2523		--	
C-1s		284.6	1.45349	28721	0.286	59.3	C=C
		286.2	1.45428	10099		20.8	C-O
		288.5	3.55289	8753		--	$\pi-\pi^*$
N-1s		399.7	3.94548	1556	0.477	2.0	Nitruro

6.3 Evaluaciones antimicrobianas

6.3.1 Método de Kirby-Bauer

En la Fig. 18. se muestran los medios de cultivo en donde se les incorporaron pastillas del compuesto Fe/C/AgNPs con un área de aprox. 0.25 cm^2 . Las muestras M1-M10 se colocaron por duplicado en las cajas de petri usando como marca la notación “1a” y 1b” hasta “10a” y 10b”. Como control, se utilizó la muestra M0; y de igual manera se incorporaron 2 pastillas de aprox. 0.25 cm^2 en una de las cajas (Fig. 18 a)). Como se puede observar en las imágenes de la Fig. 18, algunos halos de inhibición son más grandes que otros; pero esto no significa precisamente que existiera mayor efecto inhibitorio. Algunas de las pastillas se dispersaron más que otras en el medio a pesar de que el compuesto fue prensado con la misma fuerza (10 toneladas) con la finalidad de que estuviese el material compacto. Por lo tanto, para medir el área de los halos de inhibición fue necesario sumar el área inicial de la pastilla más el área del material dispersado.

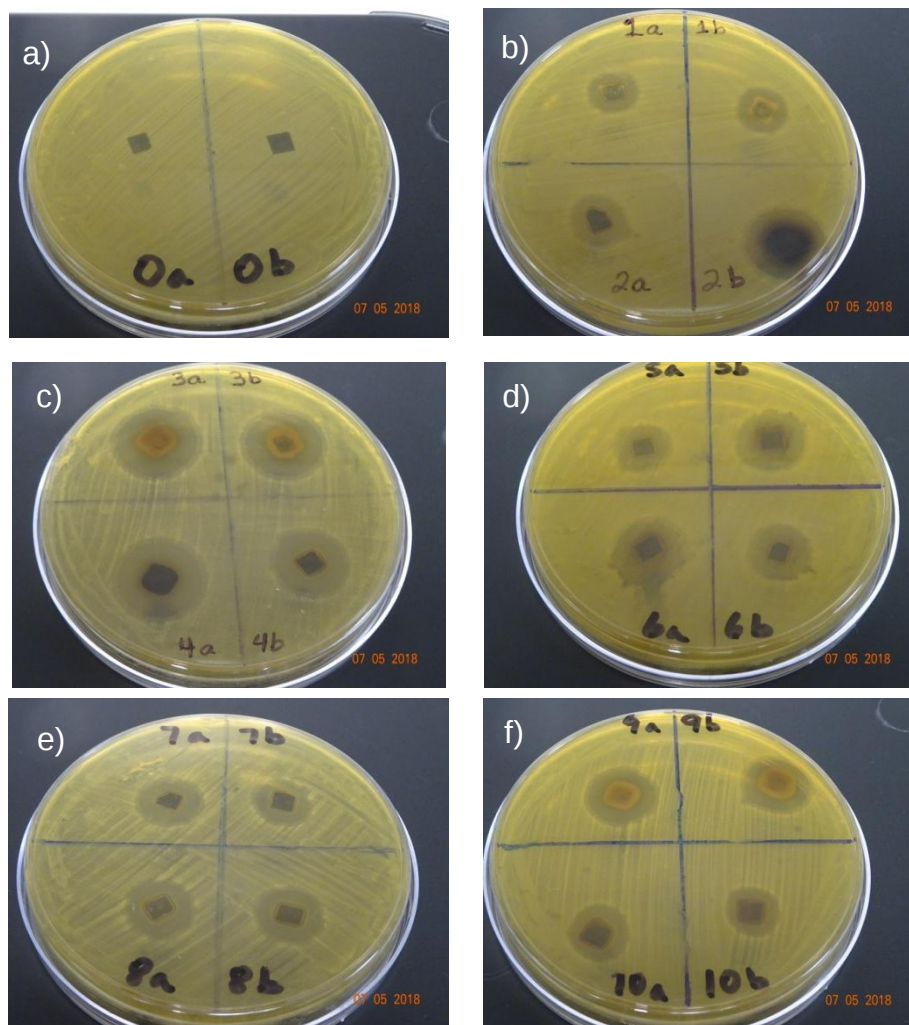


Fig. 18. Imágenes de las muestras M0-M10 en Agar como medio de cultivo sólido.

Uno de los halos de inhibición más grande se le atribuye a la muestra M2(b), sin embargo, el área expuesta sobre el cultivo fue más grande de todas; por lo tanto, aún es necesario hacer una comparación entre el área del halo de inhibición y del compuesto. En la Tabla 8 se enlistan las áreas del compuesto y los halos de inhibición para sus respectivas muestras. Con ayuda de un vernier, se midió el diámetro del compuesto (considerando el área dispersada) y se determinó el área del mismo. De la misma manera, se midió el diámetro de cada uno de los halos para calcular el área inhibida. Como era de esperarse, la muestra M0 no presentó ninguna actividad antimicrobiana. Al hacer la diferencia de áreas, sorpresivamente se encuentra que la muestra M3 es la que mayor efecto tuvo sobre el cultivo de *E. coli* a pesar de que no es la muestra en donde se utilizó mayor cantidad de AgNO_3 . Haciendo un promedio

entre la diferencia de áreas de los duplicados M3(a) y M3(b) se obtiene un área de 2.266 cm². Realizando el mismo procedimiento para los duplicados M4(a) y M4(b) se obtiene una diferencia de áreas de 2.077 cm². Para estas 2 muestras, el efecto inhibitorio es muy similar. Las muestras M1 y M10 tuvieron el menor efecto inhibitorio y cabe resaltar que la cantidad de AgNO₃ utilizada para la síntesis de estas 2 muestras fue muy diferente (100 mg y 1 g respectivamente).

Tabla 8. Tratamiento de datos sobre las áreas del compósito y áreas de halos de inhibición para cada una de las muestras.

Muestra	Área del compósito (Área pastilla +área dispersada. (cm ²))	Área del halo de inhibición (cm ²)	Diferencia de áreas: Área del material – Área del halo. (cm ²)
M0(a)	0.25	Ninguno	
M0(b)	0.25	Ninguno	
M1(a)	0.331	1.13	0.800
M1(b)	0.372	1.26	0.894
M2(a)	0.340	1.227	0.887
M2(b)	1.166	2.865	1.699
M3(a)	0.774	3.3	2.526
M3(b)	0.828	2.835	2.007
M4(a)	0.518	2.865	2.346
M4(b)	0.330	2.138	1.808
M5(a)	0.416	1.431	1.015
M5(b)	0.664	2.32	1.659
M6(a)	0.518	2.087	1.568
M6(b)	0.378	1.651	1. 273
M7(a)	0.318	1.674	1.356
M7(b)	0.336	1.15	0.813
M8(a)	0.328	1.431	1.103
M8(b)	0.326	1.389	1.062
M9(a)	0.655	2.488	1.833
M9(b)	0.864	2.351	1.486
M10(a)	0.397	1.348	0.951
M10(b)	0.396	1.227	0.830

6.3.2 Densidad Óptica

Después de haber medido todas las pruebas que se muestran en la Fig. 10, se obtuvieron valores de absorbancia. Debido a que se hicieron duplicados para los medios de cultivo que contienen las muestras M0, M3 y M10, los valores de absorbancia obtenidos fueron promediados. De la misma manera para las pruebas con medio de cultivo sin compuesto (1B y 2B). En la Tabla 9 se muestran los valores de absorbancia para cada uno de las pruebas medidas.

Tabla 9. Valores de absorbancia para cada una de las pruebas medidas.

Pruebas	Absorbancia
M0-1N	0
M0-1B	0.132
M0-2N	0
M0-2B	0.202
M3-1N	0
M3-1B	0.237
M3-2N	0
M3-2B	0.194
M10-1N	0
M10-1B	0.036
M10-2N	0
M10-2B	0.014
1B	0.933
2B	1.008

Para determinar el porcentaje de inhibición, en la Tabla 10 se hace un tratamiento de datos. El porcentaje de inhibición se calculó de la siguiente manera. El promedio de las pruebas 1B y 2B representa el 100% de la absorbancia ya que es un medio sin compuesto en donde la bacteria *E. coli* creció. Se tomó como referencia el 100% para calcular el porcentaje de absorbancia de los promedios del duplicado. Por último, se calculó el porcentaje de inhibición, que es la diferencia entre el porcentaje de absorbancia y 100%.

Tabla 10. Resumen de tratamiento de datos. Se muestran los porcentajes de inhibición que tuvieron las muestras M0, M3 y M10 sobre la bacteria de *E. coli*.

Muestra utilizada	Promedio de duplicados	Absorbancia (%)	Inhibición (%)
M0	0.167	17.2	82.7
M3	0.2155	22.2	77.7
M10	0.025	2.5	97.4
Sin muestra (B)	0.9705	100	0

Las 3 muestras utilizadas (M0, M3 y M10) presentan un alto porcentaje de inhibición, sobre todo la muestra M10 que alcanzó un 97.4%. Con base a los datos obtenidos por las dos evaluaciones implementadas, se pueden hacer un par de observaciones. Los datos obtenidos por el método de Kirby-Bauer demuestran que la bacteria *E. coli* presenta una alta sensibilidad para la muestra M3, en comparación con el resto de las muestras. De la misma manera, se puede observar que la muestra M10 (al igual que la muestra M1) presentan los halos de inhibición más pequeños. Debido a esto, para la evaluación de Densidad óptica se utilizaron intencionalmente las muestras M3 y M10 para obtener datos cualitativos. Los resultados exponen que la prueba con la muestra M10 tiene mayor porcentaje de inhibición e incluso, el compósito sin plata presenta inhibición de crecimiento bacteriano. Una posible explicación para esta controversia podría ser el coeficiente de difusión del compósito en el agar. Para el método de Kirby-Bauer, la muestra M0 no presenta difusión en el agar (eso explica que no se presente halo alguno), por lo tanto, se puede decir que las nanopartículas de plata son las que se difunden en el medio. Es posible que la inhibición por parte de las pruebas M0-1B y M0-2B sea debido a la matriz de carbono presente en el compósito. Como se mencionó en secciones pasadas, la inhibición por parte de las AgNPs depende de una variedad de factores como tamaño de nanopartícula, grado de ionización, pH del medio, entre otros; por lo que estos factores pudieron jugar un papel importante en ambas evaluaciones antimicrobianas. Sin embargo, no es objetivo de este trabajo explicar el mecanismo de acción del compósito, sino lograr un material antibacteriano recuperable magnéticamente.

7 CONCLUSIONES

Se logró sintetizar un material compuesto de Fe/C/AgNPs (que también contiene N y O) y que responde fácilmente a un campo magnético externo. Las imágenes SEM y TEM demuestran la morfología porosa del material, además de nanopartículas bien definidas inmersas en una matriz de carbono. Esto es de gran utilidad ya que se evita la aglomeración de partículas y se mantienen las propiedades las AgNPs. Las técnicas de caracterización como EDS, XRD y XPS proporcionaron una primera aproximación a la composición química, así como la cristalinidad de la plata y la estructura amorfa de las especies de hierro involucradas; además, de los distintos estados electrónicos para los elementos presentes en el compuesto. Las evaluaciones biológicas (Kirby-Bauer y Turbidez) empleadas demuestran una buena actividad antimicrobiana mostrando especial interés en las muestras M3 (por su alta difusión en agar) y M10, donde esta última presenta un 97% de inhibición en medio acuoso. La alta actividad antimicrobiana, gran área superficial de compuesto (en base a trabajos previos), propiedades magnéticas y, sobre todo, el corto tiempo de síntesis hacen del compuesto un material controlable y recuperable (en cuanto a cuidado ambiental y reutilización), versátil en aplicaciones y con potencial de escalamiento debido a la sencillez de la técnica. Los resultados obtenidos dejan al material sintetizado como un candidato para incorporarlo en el proceso de tratamientos de aguas residuales, especialmente en el tratamiento terciario, donde se requiere una adsorción de metales pesados y una desinfección del agua reduciendo el número de organismos vivos antes de descargarla en el ambiente.

A pesar de las virtudes del material sintetizado en este trabajo, es necesario hacer distintas evaluaciones aún, como determinación de concentración mínima inhibitoria, rendimiento del compuesto como antimicrobiano, pruebas en aguas de fuentes reales, entre otros. Por lo tanto, la continuación de este trabajo es de vital importancia para crear más conocimiento sobre las propiedades del material y poder incorporarlo a la sociedad como producto nanotecnológico en un futuro cercano.

8 BIBLIOGRAFÍA

- Abbaszadegan, A., Ghahramani, Y., Gholami, A., Hemmateenejad, B., Dorostkar, S., Nabavizadeh, M., & Sharghi, H. (2014). The Effect of Charge at the Surface of Silver Nanoparticles on Antimicrobial Activity against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria: A Preliminary Study. *Journal of Nanomaterials*, 2015, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2015/720654>
- Alonso, A., Muñoz-Berbel, X., Vigués, N., MacAnás, J., Muñoz, M., Mas, J., & Muraviev, D. N. (2012). Characterization of fibrous polymer silver/cobalt nanocomposite with enhanced bactericide activity. *Langmuir*, 28(1), 783–790. <https://doi.org/10.1021/la203239d>
- Arce-Saldaña, L. A., Espinoza-Mosso, E., Castro-Rodríguez, B., Portillo-López, A., Muñoz-Muñoz, F., Dominguez, D., ... Soto, G. (2018). Plasma synthesis of carbon powder with embedded Fe₃C nanoparticles for magnetic separation of biomolecules. *Advanced Powder Technology*, 29(4), 1035–1041. <https://doi.org/10.1016/j.appt.2018.01.022>
- Belluco, S., Losasso, C., Patuzzi, I., Rigo, L., Conficoni, D., Gallocchio, F., ... Ricci, A. (2016). Silver As Antibacterial toward *Listeria monocytogenes*, 7(March), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00307>
- Bhattacharya, R., & Mukherjee, P. (2008). Biological properties of “naked” metal nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.03.013>
- Bishoge, O. K., Zhang, L., Suntu, S. L., Jin, H., Zewde, A. A., & Qi, Z. (2018). Remediation of water and wastewater by using engineered nanomaterials: A review. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 4529, 1–18. <https://doi.org/10.1080/10934529.2018.1424991>
- Carlson, C., Hussain, S. M., Schrand, A. M., Braydich-Stolle, L. K., Hess, K. L., Jones, R. L., & Schlager, J. J. (2008). Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size dependent generation of reactive oxygen species. *J Phys Chem B*, 112, 13608–13619. <https://doi.org/10.1021/jp712087m>
- Carroll, K. J., Hudgins, D. M., Spurgeon, S., Kemner, K. M., Mishra, B., Boyanov, M. I., ... States, U. (2010). One-Pot Aqueous Synthesis of Fe and Ag Core / Shell Nanoparticles, (10), 6291–6296. <https://doi.org/10.1021/cm101996u>
- Cavassin, E. D., de Figueiredo, L. F. P., Otoch, J. P., Seckler, M. M., de Oliveira, R. A., Franco, F. F., ... Costa, S. F. (2015). Comparison of methods to detect the in vitro activity of silver nanoparticles (AgNP) against multidrug resistant bacteria. *Journal of Nanobiotechnology*, 13(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12951-015-0120-6>
- Cecchini, M., Langer, J., & Slawomirski, L. (2015). Resistance in G7 countries and beyond: economic issues, policies, (September). Retrieved from https://imperiallondon-my.sharepoint.com/personal/ecastros_ic_ac_uk/Documents/Imperial

- Dakal, T. C., Kumar, A., Majumdar, R. S., & Yadav, V. (2016). Mechanistic basis of antimicrobial actions of silver nanoparticles. *Frontiers in Microbiology*, 7(NOV), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01831>
- Daraio, C., & Jin, S. (2012). Synthesis and Patterning Methods for Nanostructures Useful for Biological Applications, 27–45. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-31296-5>
- Encyclopedia Britannica, 2018. Silver CHEMICAL ELEMENT. <https://www.britannica.com/science/silver>
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2015). *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)*. Retrieved from <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2013.pdf>
- Feynman, R. P. (1960). There's Plenty of Room at the Bottom. *Engineering and Science*, 23(December), 22–36. <https://doi.org/10.1109/84.128057>
- Ghosh, S., Patil, S., Ahire, M., Kitture, R., Kale, S., Pardesi, K., ... Chopade, B. A. (2012). Synthesis of silver nanoparticles using *Dioscorea bulbifera* tuber extract and evaluation of its synergistic potential in combination with antimicrobial agents. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 483–496. <https://doi.org/10.2147/IJN.S24793>
- Guajardo Pacheco, J. M. (2013). *Síntesis de nanopartículas de cobre mediante novedosa ruta química*.
- I, A. R. G., Ii, F. J. G., Tabarés, F. L., & Tanarro, I. (n.d.). Física de Plasmas Plasmas fríos moleculares . *Química de*, 53–58.
- Kaegi, R., Voegelin, A., Ort, C., Sinnet, B., Thalmann, B., Krismer, J., ... Mueller, E. (2013). Fate and transformation of silver nanoparticles in urban wastewater systems. *Water Research*, 47(12), 3866–3877. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.11.060>
- Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J. H., Park, S. J., Lee, H. J., ... Cho, M. H. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 3(1), 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2006.12.001>
- Kim, S. H., Lee, H. S., Ryu, D. S., Choi, S. J., & Lee, D. S. (2011). Antibacterial activity of silver-nanoparticles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(1), 77–85. <https://doi.org/10.5897/AJMR2016.7908>
- Klueh, U., Wagner, V., Kelly, S., Johnson, A., & Bryers, J. D. (2000). Efficacy of silver-coated fabric to prevent bacterial colonization and subsequent device-based biofilm formation. *Journal of Biomedical Materials Research*, 53(6), 621–631. [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(2000\)53:6<621::AID-JBM2>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/1097-4636(2000)53:6<621::AID-JBM2>3.0.CO;2-Q)

- Kr, A. (1997). Copper, Silver and Gold. *Chemistry of the Elements*, 1173–1200. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7506-3365-9.50034-1>
- Lao, X., Yan, X., Xie, J., & Li, Y. L. (2012). Fabrication of Iron Carbide and Nitride Ceramics with Controlled Magnetic Properties by the Non-Oxide Sol-Gel Process. *Key Engineering Materials*, 512–515, 1429–1433. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.512-515.1429>
- León-Silva, S., Fernández-Luqueño, F., & López-Valdez, F. (2016). Silver Nanoparticles (AgNP) in the Environment: a Review of Potential Risks on Human and Environmental Health. *Water, Air, & Soil Pollution*, 227(9), 306. <https://doi.org/10.1007/s11270-016-3022-9>
- Li, J., Rong, K., Zhao, H., Li, F., Lu, Z., & Chen, R. (2013). Highly selective antibacterial activities of silver nanoparticles against *Bacillus subtilis*. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 13(10), 6806–6813. <https://doi.org/10.1166/jnn.2013.7781>
- Locey, K. J., & Lennon, J. T. (2016). Scaling laws predict global microbial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(21), 5970–5975. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521291113>
- Lok, C.-N., Ho, C.-M., Chen, R., He, Q.-Y., Yu, W.-Y., Sun, H., ... Che, C.-M. (2006). Proteomic Analysis of the Mode of Antibacterial Action of Silver Nanoparticles. *Journal of Proteome Research*, 5(4), 916–924. <https://doi.org/10.1021/pr0504079>
- Lu, H., Wang, J., Stoller, M., Wang, T., Bao, Y., & Hao, H. (2016). An Overview of Nanomaterials for Water and Wastewater Treatment. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/4964828>
- Luoma, S. N. (2008). Silver nanotechnologies and the environment: Old problems or new challenges? *Project on Emerging Nanotechnologies*, Woodrow Wilson Centre, Washington, DC, USA, (September), 72. Retrieved from <https://www.nanotechproject.org/news/archive/silver/>
- MacGowan, A., & Macnaughton, E. (2017). Antibiotic resistance. *Medicine (United Kingdom)*, 45(10), 622–628. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.07.006>
- Mandel, K., & Hutter, F. (2012). The magnetic nanoparticle separation problem. *Nano Today*. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2012.05.001>
- McGillicuddy, E., Murray, I., Kavanagh, S., Morrison, L., Fogarty, A., Cormican, M., ... Morris, D. (2017). Silver nanoparticles in the environment: Sources, detection and ecotoxicology. *Science of the Total Environment*, 575, 231–246. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.041>
- Montaño, N. (2010). Los microorganismos : pequeños gigantes, 77, 15–23.
- Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramírez, J. T., & Yacaman, M. J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16(10), 2346–2353. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/059>

- Natsuki, J., Natsuki, T., & Hashimoto, Y. (2015). A Review of Silver Nanoparticles : Synthesis Methods , Properties and Applications, 4(5), 325–332. <https://doi.org/10.11648/j.ijmsa.20150405.17>
- OECD, WHO, FAO, & OIE. (2017). Tackling Antimicrobial Resistance: Ensuring Sustainable R & D, (June), 1–36. Retrieved from <http://www.oecd.org/g20/summits/hamburg/Tackling-Antimicrobial-Resistance-Ensuring-Sustainable-RD.pdf>
- Pellieux, B. C., Dewilde, A., & Pierlot, C. (2000). [18] Bactericidal and Virucidal Activities of Singlet Oxygen G e n e r a t e d b y T h e r m o l y s i s of Naphthalene E n d o p e r o x i d e s, 319(1995).
- Pokropivny, V., Hussainova, I., & Vlassov, S. (2007). Introduction to nanomaterials and nanotechnology. *Introduction in Nanomaterials and Nanotechnology*, 1–138. Retrieved from www.tyk.ee
- Pokropivny, V. V., & Skorokhod, V. V. (2008). New dimensionality classifications of nanostructures. *Physica E: Low-Dimensional Systems and Nanostructures*, 40(7), 2521–2525. <https://doi.org/10.1016/j.physe.2007.11.023>
- Prucek, R., Kvítek, L., Filip, J., Kolá, M., & Zbo, R. (2011). Biomaterials The targeted antibacterial and antifungal properties of magnetic nanocomposite of iron oxide and silver nanoparticles s Paná, 32, 4704–4713. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.03.039>
- Radzig, M. A., Nadtochenko, V. A., Koksharova, O. A., Kiwi, J., Lipasova, V. A., & Khmel, I. A. (2013). Antibacterial effects of silver nanoparticles on gram-negative bacteria: Influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 102, 300–306. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.07.039>
- Rai, M. K., Deshmukh, S. D., Ingle, A. P., & Gade, A. K. (2012). Silver nanoparticles: The powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 112(5), 841–852. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05253.x>
- Robertson, J. D., Rizzello, L., Avila-Olias, M., Gaitzsch, J., Contini, C., MagoÁ, M. S., ... Battaglia, G. (2016). Purification of Nanoparticles by Size and Shape. *Scientific Reports*, 6, 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep27494>
- Russell, A. D., Path, F. R. C., Sl, F. R. P., & Hugo, W. B. (1994). 7 Antimicrobial Activity and Action of. *Progress in Medicinal Chemistry* 31, 31, 351.
- Sanchez, F., & Sobolev, K. (2010). Nanotechnology in concrete - A review. *Construction and Building Materials*, 24(11), 2060–2071. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2010.03.014>
- Scenihhr. (2013). *Nanosilver: safety, health and environmental effects and role in antimicrobial resistance. Biochemical Pharmacology* (Vol. 18). <https://doi.org/10.2772/76851>

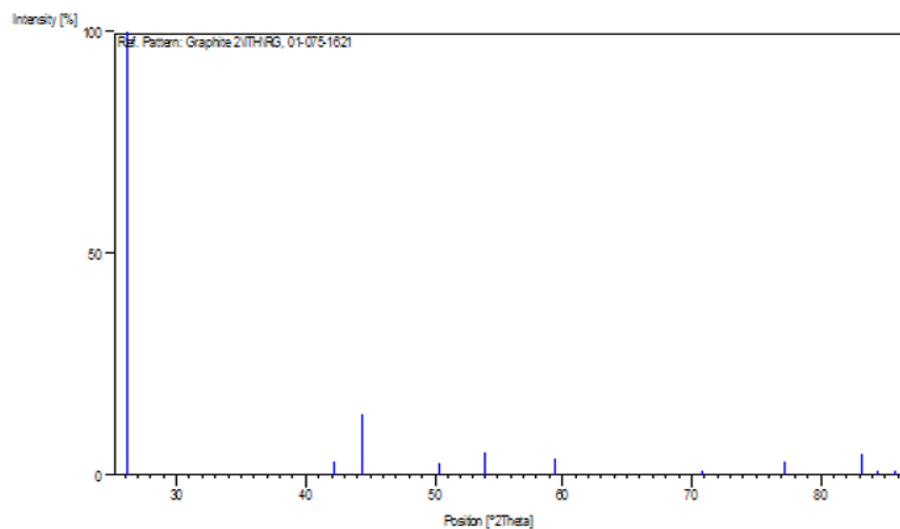
- Schreurs, W. J. A., & Rosenberg, H. (1982). Effect of silver ions on transport and retention of phosphate by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 152(1), 7–13.
- Sharma, G., & Jeevanandam, P. (2013). A Facile Synthesis of Multifunctional Iron Oxide @ Ag Core – Shell Nanoparticles and Their Catalytic Applications, 6126–6136. <https://doi.org/10.1002/ejic.201301193>
- Shlaes, D. M., Sahm, D., Opiela, C., & Spellberg, B. (2013). The FDA reboot of antibiotic development. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(10), 4605–4607. <https://doi.org/10.1128/AAC.01277-13>
- Silver, S. (2003). Bacterial silver resistance: Molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2–3), 341–353. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00047-0](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00047-0)
- Spellberg, B. (2014). The future of antibiotics. *Critical Care*, 18(3), 1–7. <https://doi.org/10.1186/cc13948>
- Sriram, M. I., Kalishwaralal, K., Barathmanikanth, S., & Gurunathani, S. (2012). Size-based cytotoxicity of silver nanoparticles in bovine retinal endothelial cells. *Nanoscience Methods*, 1(1), 56–77. <https://doi.org/10.1080/17458080.2010.547878>
- Syafiuddin, A., Salmiati, Salim, M. R., Beng Hong Kueh, A., Hadibarata, T., & Nur, H. (2017). A Review of Silver Nanoparticles: Research Trends, Global Consumption, Synthesis, Properties, and Future Challenges. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 64(7), 732–756. <https://doi.org/10.1002/jccs.201700067>
- Tanarro, I., Herrero, V. J., Carrasco, E., & Jiménez-Redondo, M. (2011). Cold plasma chemistry and diagnostics. In *Vacuum* (Vol. 85, pp. 1120–1124). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.vacuum.2010.12.027>
- Tavakoli, A., Sohrabi, M., & Kargari, A. (2007). A review of methods for synthesis of nanostructured metals with emphasis on iron compounds. *Chemical Papers*, 61(3), 151–170. <https://doi.org/10.2478/s11696-007-0014-7>
- Thannickal, V. J., & Fanburg, B. L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279(12), L1005–L1028. <https://doi.org/10.1164/rccm.2206007>
- Tiwari, J. N., Tiwari, R. N., & Kim, K. S. (2012). Zero-dimensional, one-dimensional, two-dimensional and three-dimensional nanostructured materials for advanced electrochemical energy devices. *Progress in Materials Science*, 57(4), 724–803. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2011.08.003>
- Valavanidis, A., & Vlachogianni, T. (2009). (8-OHdG): A Critical Biomarker of Oxidative Stress and Carcinogenesis, 0501(May). <https://doi.org/10.1080/10590500902885684>
- Whitehead, J. C. (2016). *The Chemistry of Cold Plasma. Cold Plasma in Food and Agriculture: Fundamentals and Applications*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801365-6.00003-2>

Xie, H., Mason, M. M., Pierce, J., & Sr, W. (2011). Genotoxicity of metal nanoparticles, 26(4), 251–268. <https://doi.org/10.1515/REVEH.2011.033>

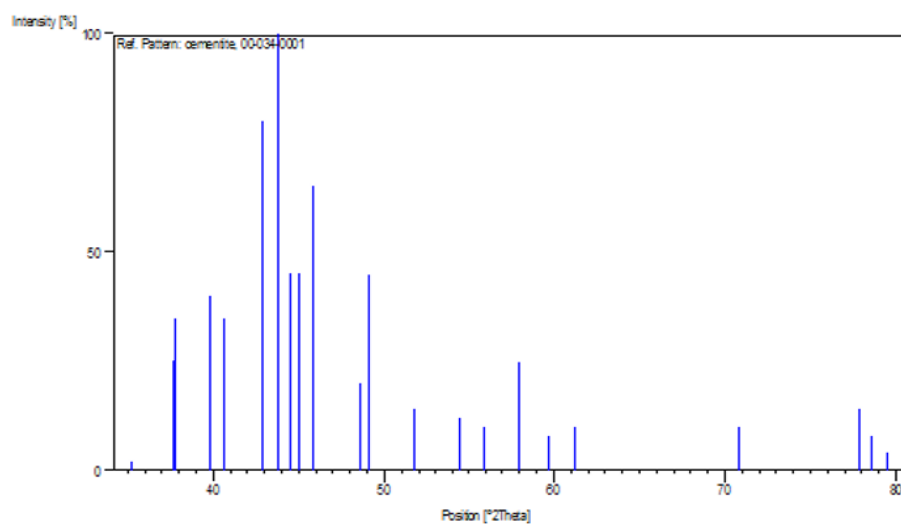
APÉNDICE A

Fichas cristalográficas

Grafito 01-075-1621 (ICSD)



Carburo de hierro 00-034-0001 (ICSD)



Plata 00-004-0783 (ICSD)

