

Síntesis y caracterización de nanocristales de peróxido de zinc para la purificación de la proteína MAP3773c de Mycobacterium avium Subsp. paratuberculosis y fotodegradación de nitrobenzeno.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA



TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

PRESENTA:

QFB. JESUS ISAIAS DE LEON RAMIREZ

ASESOR:

DRA. SANCHEZ LANDEROS BERTHA

Co-ASESOR:

DR. ESTEBAN HERNANDEZ GUEVARA

Universidad Autónoma de Baja California
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

FOLIO No. 291

Tijuana, B. C., a 17 de Diciembre del 2019

C. Jesús Isaias de León Ramírez
Pasante de: Maestro en Ciencias de la Salud
Presente

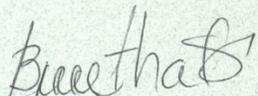
El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
Opción TESIS

Es propuesto, por los C.C. Dra. Bertha Landeros Sánchez y Dr. Esteban Hernández Guevara

Quienes serán los responsables de la calidad de trabajo que usted presente, referido al tema “Síntesis y Caracterización de Nanocristales de Peróxido de Zinc para la Purificación de la Proteína MAP3773c de *Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis* y Fotodegradación de Nitrobenceno”

El cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I.- RESUMEN
- II.- INTRODUCCIÓN
- III.- ANTECEDENTES
- IV.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA
- V.- JUSTIFICACIÓN
- VI.- OBJETIVO
- VII.- HIPÓTESIS
- VIII.- MATERIALES Y MÉTODOS
- IX.- RESULTADOS Y DISCUSIONES
- X.- PURIFICACIÓN DE MAP 3773C
- XI.- CONCLUSIONES

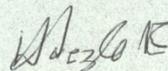


Dra. Bertha Landeros Sánchez
Director de Tesis

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE BAJA CALIFORNIA



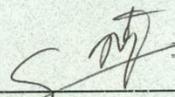
FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS E INGENIERÍA
COORDINACIÓN DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN



Dr. Esteban Hernández Guevara
Co-Director de Tesis



Dr. José Luis González Vázquez
Director



Dra. Rocío Alejandra Chávez Santoscoy
Sub-Directora

Índice

Lista de tablas.....	5
Lista de figuras	6
1.0 Resumen:.....	7
2.0 Capitulo 1 “Introducción”	¡Error! Marcador no definido.
2.1 Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis	¡Error! Marcador no definido.
2.2 Proteínas Fur	¡Error! Marcador no definido.
2.3 Proteínas recombinantes y purificación.....	¡Error! Marcador no definido.
2.4 Nanotecnología	¡Error! Marcador no definido.
2.5 Nanopartículas	¡Error! Marcador no definido.
2.6 Efecto corona	¡Error! Marcador no definido.
2.8 Semiconductores.....	¡Error! Marcador no definido.
2.7 Propiedades catalíticas.....	¡Error! Marcador no definido.
2.9 Nanopartículas ZnO y ZnO ₂	¡Error! Marcador no definido.
3.0 Capitulo 2 “Antecedentes”	10
3.1 Estudios de interacciones de nanomateriales con sistemas biológicos.....	10
3.2 Purificación de las proteínas FUR.....	10
3.3 Purificación de la proteína MAP 3773c.....	10
3.4 fotodegradación de compuestos orgánicos con nanopartículas	11
3.5 Síntesis de nanomateriales	12
3.6 Métodos de caracterización de nanopartículas.....	13
Capítulo 3	22
4.0 Planteamiento del problema:	22
5.0 Justificación:	¡Error! Marcador no definido.
Objetivo:.....	23
6.1 Objetivos específicos:.....	23
7.0 Hipótesis:.....	24
7.1 Hipótesis nula:.....	24

7.2 Hipótesis alterna:	24
Capítulo 5	24
8.0 Materiales y métodos:	24
8.1 <i>Síntesis de nanopartículas de zinc</i>	24
8.2 Caracterización de nanopartículas	25
8.3 Interacción nanopartícula-histidina	27
8.4 Interacción nanopartícula-proteína	27
8.4.1 Inducción para la sobreexpresión de la proteína MAP3773c	27
8.4.2 Lisis celular	28
8.4.2 Purificación.....	28
8.4.3 SDS-PAGE.....	28
8.6 Actividad fotocatalítica.....	29
8.7 Cromatografía de gases/masas	30
Capítulo 6	31
9.0 Resultados y discusiones “síntesis y caracterización de nanopartículas”	31
9.1 Síntesis de nanopartículas de ZnO ₂	31
9.2 Caracterización de nanopartículas ZnO ₂ :	32
9.2.1 Uv-Vis	32
9.2.2 FT-IR.....	34
9.2.3 Raman.....	36
9.2.4 Difracción de rayos X.....	36
9.2.5 SEM, EDX Y DLS.....	38
9.2.6 Potencial Z	40
Capítulo 7	42
9.3 Resultados y discusiones “Fotodegradación de nitrobenzeno”	42
9.3.1 Nanopartículas semiconductoras de ZnO ₂ como fotocatalizadoras	42
9.3.2 Efecto de la concentración de fotocatalizador	44
9.3.3 Efecto del pH	47
9.3.4 Identificación de productos de degradación por espectrometría de masas de alta resolución	50
Capítulo 8	53

9.4 Resultados y discusiones “Interacción nanopartícula- proteína recombinante map3773c ”	53
9.4.1 Unión Nanopartícula Histidina	53
9.4.1.1 FT-IR.....	53
9.4.1.2 Uv-Vis	56
9.5 Purificación de MAP 3773c	60
Capítulo 9	62
10.0 Conclusiones	62
Referencias.....	63

Lista de tablas

Tabla 1: Compuestos orgánicos fotodegradados por nanopartículas	11
Tabla 2: DRX	37
Tabla 3: Degradación de nitrobeneno	46
Tabla 4: Catalizadores	49
Tabla 5: FT-IR Histidina/Complejo	56

Lista de figuras

Figura 1: Síntesis.....	31
Figura 2 Espectro Uv-Vis/Band gap	33
Figura 3: Espectro FT-IR/RAMAN	35
Figura 4: XRD/EDX/SEM	38
Figura 5: SEM.....	39
Figura 6:SEM/DLS	40
Figura 7: Potencial Z	42
Figura 8: Espectro UV de nitrobencono	45
Figura 9: Fotodegradación de nitrobencono.....	47
Figura 10:Cromatografía de gases.....	51
Figura 11: Espectro de masas.....	52
Figura 12: FT-IR Nanopartícula-Histidina	55
Figura 13: Nanopartícula-Histidina.....	57
Figura 14:Curvas de calibración de histidina.....	58
Figura 15: Uv-Vis nanopartícula- Histidina.....	59

1.0 Resumen:

La adsorción de moléculas biológicas como, las proteínas sobre superficies sólidas resulta ser un tema interesante para diversas áreas científicas y tecnológicas. La creación de una capa de la molécula orgánica controlada, bien ordenada y funcional en una superficie se ha convertido en un campo de investigación desafiante para la biocatálisis, los biosensores, la biocompatibilidad de implantes artificiales en sistemas vivos, las tecnologías de membrana y la biocorrosión, entre otros mediante la creación de sistemas inmovilizados bien definidos, es decir, mediante el control de la interacción química y molecular de los sistemas biológicos sobre una superficie.

Uno de los materiales más utilizados en el tema de superficie son las nanopartículas, debido a que, tienen una relación superficie/volumen relativamente alta, lo que contribuye a mejorar estas interacciones, ya que, las nanopartículas en medios biológicos forman entidades dinámicas como resultado de la adsorción competitiva en superficies de nanopartículas, a las cuales llamamos proteínas coronas. Estas entidades dinámicas se estudian para optimizar procesos como purificación de proteínas recombinantes de difícil purificación y fotodegradación.

El objetivo de este trabajo es optimizar la purificación de una proteína recombinante de difícil purificación y la fotodegradación de un compuesto orgánico que ha sido un problema de contaminación del agua. Se evaluó el rendimiento de las nanopartículas de peróxido de zinc (ZnO_2) que tiene buena actividad superficial. Las nanopartículas de ZnO_2 se sintetizaron a partir de acetato de zinc y peróxido de hidrógeno usando un método Sol-Gel bajo la ayuda de ultrasonido. La caracterización se realizó mediante espectroscopia UV-Vis, espectroscopia de

reflectancia de la transformada de Fourier infrarroja (ATR-FT-IR), espectroscopia Raman, difracción de rayos X (XRD), potencial Zeta, dispersión dinámica de la luz (DLS), microscopía de exploración de campo (FE-SEM). Los experimentos para la degradación de NB se llevaron a cabo en un fotorreactor con irradiación de lámparas UV de 254 nm a 25 ° C a una solución de nanopartículas y nitrobenzeno, donde se obtiene como resultados las condiciones con la mayor degradación fueron 30 ppm (ZnO₂) y 15 ppm (NB) a pH 2 degradando > 90% en 2 horas. Los intermedios formados durante la fotodegradación de NB se identificaron mediante cromatografía de gases por espectrometría de masas.

Con el fin de evaluar mejor las propiedades de adsorción de la nanopartícula, se evaluó la adsorción de la histidina como ligando midiendo dicha interacción mediante (ATR-FT-IR), y (UV-VIS.) observando una buena adsorción. Mientras la purificación de la proteína recombinante se llevó a cabo a partir de un extracto de lisado bacteriano midiendo la interacción de la proteína con ayuda de SDS page.

Abstract:

The adsorption of large biological molecules such as proteins onto solid surfaces is of interest for many scientific and technological areas. The creation of a controlled, well-ordered, and functional protein layer at a metal surface has become a challenging research field for biocatalysis, biosensors, biocompatibility of artificial implants in living systems, membrane technologies, and biocorrosion, among others. By creating well-defined immobilized systems, that is, by controlling the chemical and molecular interaction of biological systems on a surface.

When talking about surface one of the most used materials are nanoparticles since they have a relatively high surface / volume ratio and this can help to improve these interactions, since the nanoparticles in biological media form dynamic entities as a result of competitive adsorption in Nanoparticle surfaces which we call protein crowns, these entities are studied to

optimize processes such as purification of recombinant proteins of difficult purification and photodegradation. In this work, it is intended to optimize the purification of a recombinant protein of difficult purification and the photodegradation of an organic compound that has been a problem of water contamination. In the present work is evaluated the performance of the zinc peroxide (ZnO_2) nanoparticles which has higher surface activity. ZnO_2 nanoparticles were synthesized from zinc acetate and hydrogen peroxide using a Sol-Gel method under the assistance of ultrasound. The characterization was made by UV-Vis spectroscopy, infrared Fourier transform total reflectance (ATR-FT-IR) spectroscopy, Raman spectroscopy, X-ray diffraction (XRD), Zeta potential, dynamic light scattering (DLS), field emission scanning microscopy (FE-SEM). The experiments for the degradation of NB were carried out in a photoreactor with irradiation of UV lamps of 254 nm at 25°C to a solution of nanoparticles and nitrobenzene, where the conditions with the highest degradation were 30 ppm (ZnO_2) and 15 ppm (NB) at pH 2 degrading > 90% in 2 hours. The intermediates formed during the photodegradation of NB were identified by gas chromatography mass spectrometry. In order to better evaluate the adsorption properties of nanoparticle, we decided to assess adsorption histidine as ligand, measuring said interaction by (ATR-FT-IR), and (UV-VIS.) observing a good adsorption. While the purification of the recombinant protein was carried out from a bacterial lysate extract by measuring the interaction of the protein with the help of the SDS page.

3.0 Capitulo 2 “Antecedentes”

3.1 Estudios de interacciones de nanomateriales con sistemas biológicos

Las nanopartículas de óxido de zinc pueden unirse a diferentes moléculas biológicas como proteínas, se tienen antecedentes de unión a proteínas como albumina de suero utilizando grafeno con una envoltura de nanopartículas de óxido de zinc [61], así como la unión de nanopartículas de óxido de zinc a una proteína llamada cisteína [54] [SadhanaTiwari] [62] utilizo nanopartículas ZnO-NRs/WFP para capturar mioglobina [Bipin S. Khade] fijo nano hojas de óxido de zinc a alfa amilasa estudiando su interacción, esto demuestra que las nanopartículas de óxido de zinc pueden unirse a moléculas biológicas.

3.2 Purificación de las proteínas FUR

Las proteínas FUR son proteínas muy específicas con características especiales, por lo que su purificación es un tanto complicada en la siguiente tabla se mostraran trabajos de investigación en donde han purificado distintas fur, Shin, J. H. [63], Pawlik, M. C. [64], Lee, A. Y. [65], Lucarelli, D. [66], Napolitano, M [67]. Concluyendo en que los métodos existentes son costosos, poco efectivos y de procesos muy complicados.

3.3 Purificación de la proteína MAP 3773c

Se ha demostrado que la proteína MAP 3773c se ha purificado con IMAC, si se utiliza una matriz de fluido rápido del distribuidor general electric, para en seguida añadirle un metal como

el zinc, obteniendo resultados satisfactorios. A causa de esto, los investigadores prevén que la proteína tiene cierta afinidad por los metales divalentes, como por ejemplo el zinc [68] .

IMAC es efectiva, pero la difusión lenta de biomoléculas intrapartículas hacia sitios de unión en perlas porosas de tamaño micrométrico, puede conducir a un periodo de procesamiento relativamente largo, que podría ser obstaculizar el proceso de purificación de proteínas inestables [69] .

Además este método tiene la necesidad de un pretratamiento para eliminar los residuos celulares y otros contaminantes, baja especificidad de unión de proteínas, y alto consumo de disolventes, haciéndolo un método costoso y de difícil manejo [70] [71].

3.4 fotodegradación de compuestos orgánicos con nanopartículas

Los problemas ambientales asociados con los contaminantes orgánicos y los contaminantes tóxicos del agua proporcionan el impulso fundamental y la investigación aplicada en el área de la remediación ambiental. La fotocatalisis de semiconductores ofrece el potencial para la eliminación completa de químicos tóxicos a través de su eficiencia y una aplicabilidad potencialmente amplia [72].

Es por ello que en los últimos años, ha existido una gran variedad de investigaciones probando con diferentes semiconductores y aprovechando las propiedades de los diferentes materiales; un claro ejemplo son los nanomateriales (Tabla 1).

Tabla 1: Compuestos orgánicos fotodegradados por nanopartículas

Tabla 1 : Compuestos orgánicos fotodegradados por nanopartículas		
Nanomaterial	Compuesto orgánico	Referencia
MnZnO	Colorante	[73] Ullah, R. (2008)

Fe (III)TiO₂	Nitrofenoles	[74] Sood, S. (2015)
TiO₂-SiO₂	Compuestos Orgánicos Volátiles	[75] Šuligoj, A (2016)
CeO₂	Acetaldehído	[76] Magudieshwaran (2019)
ZnO / WO₃	Colorantes	[77] Ebrahimi, R (2019)

3.5 Síntesis de nanomateriales

Se han desarrollado varios métodos a lo largo de los años para la síntesis de nanomateriales. Las diversas rutas incluyen la síntesis utilizando precursores de fase líquida, sólida o gaseosa, que se someten al procesamiento físico o químico [26].

A continuación, se describen algunos de los métodos más importantes para la preparación de nanopartículas; métodos de condensación en fase gaseosa, procesamiento de llama, ablación con láser, procesamiento de plasma de microondas, síntesis hidrotermal, reacción de dispersión eléctrica, síntesis de combustión, procesamiento mecanoquímico, síntesis de microemulsiones, sol-gel y sonoquímica.

Los últimos dos ofrecen ventajas variadas como ejemplo, el método sol-gel ofrece polvos finos activos sinterizados, cristalización a baja temperatura, aparatos simples, preparación de una amplia variedad de óxidos, materiales metaestables en las formas deseadas y tamaño de partícula controlable al cambiar la concentración de reactivo. Mientras que el sonoquímico procesabilidad de una amplia variedad de materiales que incluyen materiales metaestables, polvos finos con alta área de superficie y densidad verde, nanopartículas amorfas y materiales nanoporosos para aplicaciones catalíticas [26]. En adición el método sonoquímico implica reacciones radicales y/o reacciones térmicas, que se originan a temperaturas y presiones extremadamente altas generadas en burbujas de cavitación. Además, las ondas de choque fuertes y los flujos de micro-chorro también son inducidos por la irradiación ultrasónica de un

líquido como consecuencia de un fenómeno de cavitación [78]. Debido a las ventajas asociadas con el uso de la irradiación con ultrasonido, la irradiación con ultrasonido en el método sol-gel se aplica en algunos estudios para mejorar las propiedades de los productos obtenidos. [79]

3.6 Métodos de caracterización de nanopartículas.

3.6.1 Espectroscopia de UV visible:

Las moléculas también pueden absorber la luz ultravioleta e incluso la luz visible. La espectroscopia de UV-Visible (UV-Vis), utiliza luz UV o la parte visible del espectro electromagnético para irradiar energía en una muestra. [78] La espectroscopia ultravioleta / visible (UV / Vis) es una técnica utilizada para cuantificar la luz que es absorbida y dispersada por una muestra (una cantidad conocida como extinción, que se define como la suma de la luz absorbida y dispersada). En su forma más simple, una muestra se coloca entre una fuente de luz y un fotodetector, y la intensidad de un haz de luz se mide antes y después de pasar a través de la muestra. Estas mediciones se comparan en cada longitud de onda para cuantificar el espectro de extinción dependiente de la longitud de onda de la muestra. Los datos se representan típicamente como extinción en función de la longitud de onda. Cada espectro se corrige en segundo plano con un "blanco" (una celda llena solo con el medio de dispersión) para garantizar que las características espectrales del disolvente no se incluyan en el espectro de extinción de la muestra [80].

Las nanopartículas metálicas tienen propiedades ópticas las que se pueden ajustar en un amplio rango espectral mediante la adaptación de sus parámetros geométricos. Las fascinantes características ópticas de las nanopartículas metálicas están determinadas esencialmente por las oscilaciones colectivas de electrones libres en los metales, conocidos como plasmones. Las nanoestructuras metálicas poseen resonancias de plasmón de

superficie localizadas dependientes de la geometría, que han estimulado un interés creciente en una serie de geometrías de nanopartículas metálicas. [81] Dentro del rango general de radiación electromagnética que es de importante para los químicos, la espectroscopia de absorción UV y VIS ocupa solo una región de frecuencia o de número de onda muy estrecha. Sin embargo, este rango es de suma importancia, ya que las diferencias de energía corresponden a las de los estados electrónicos de los átomos y las moléculas; de ahí el concepto de "espectroscopia electrónica". Además, en la región espectral visible, las interacciones entre la materia y la radiación electromagnética se manifiestan como color. Esto llevó a los primeros investigadores a los métodos de medición, cuyos principios básicos aún se aplican en la actualidad [82].

3.6.2 Espectroscopia de infrarrojos (FT-IR)

La espectroscopia infrarroja es, sin duda, una de las técnicas analíticas más importantes disponibles para los científicos de hoy. Una de las grandes ventajas de la espectroscopia infrarroja es que se puede estudiar cualquier muestra en prácticamente cualquier estado. Sin embargo, los avances más significativos en la espectroscopia infrarroja han sido resultado de la introducción de los espectrómetros de transformada de Fourier (FTIR). Este tipo de instrumento emplea un interferómetro y explota el proceso matemático bien establecido de la transformación de Fourier. La FTIR ha mejorado dramáticamente la calidad de los espectros infrarrojos y ha minimizado el tiempo requerido para obtener datos. Además, con las mejoras constantes en las computadoras, la espectroscopia infrarroja ha hecho grandes avances. La espectroscopia infrarroja es una técnica basada en las vibraciones de los átomos de una molécula. Un espectro infrarrojo se obtiene comúnmente al pasar la radiación infrarroja a través de una muestra y determinar qué fracción de la radiación incidente se absorbe en una energía particular. La energía a la que aparece cualquier pico en un espectro de absorción

corresponde a la frecuencia de una vibración de una parte de una molécula que se analiza. [83] Esta técnica ofrece múltiples ventajas, ya que es una técnica no destructiva, mayor velocidad de recolección de espectros, mayor sensibilidad con capacidad de alta resolución, mayor rendimiento óptico y simplicidad mecánica [84].

El ATR (Attenuated Total Reflection) es una técnica de análisis utilizada en el IR, la cual se produce cuando una radiación infrarroja entra en un cristal ATR dicho cristal es un cristal transparente al IR y de alto índice de refracción, sobre el que está colocada la muestra. En su paso a través del cristal, el haz IR incidente se refleja varias veces y la superficie de la muestra absorbe parte de la radiación a frecuencias características; por lo tanto, un requerimiento de vital importancia es que haya el contacto adecuado entre el cristal y la muestra [85].

La espectroscopia ATR-FTIR proporciona información importante sobre la especiación de la superficie de los ligados adsorbidos en los nanomateriales. La precisión de la información depende de la correcta asignación de los modos vibraciones. [86] Además, la espectroscopia IR se ha aplicado con éxito para estudiar los nanomateriales y los efectos de la superficie. Por ejemplo, puede utilizarse para identificar grupos funcionales en la superficie de nanopartículas funcionalizadas. También se empleó para estudiar la fisisorción de moléculas en la superficie de los nanomateriales. Además, los espectros IR de suspensiones se utilizaron para extraer información sobre el área superficial específica, la densidad de carga superficial y la concentración de un nanomaterial [87].

3.6.3 Espectroscopia Raman

La espectroscopía Raman es una técnica espectroscópica empleada para el análisis cuantitativo de prácticamente cualquier material, ya sea orgánico o inorgánico. Sus principales ventajas radican en que no es necesaria ninguna preparación de la muestra a estudiar y que se trata de un proceso no destructivo. El fundamento físico de la técnica está basado en el

efecto Raman, físico indio que descubrió el efecto que lleva su nombre, que consiste en la dispersión inelástica de una fracción de la luz incidente en la muestra, [88] que es una emisión láser, la cual se caracteriza por ser monocromática o de una única frecuencia o color, ser direccional y tener la misma fase, constituyéndola en una emisión coherente. Estas características permiten la concentración de una gran cantidad de energía en una superficie relativamente pequeña [89]. La cual sufre entonces un cambio de frecuencia debido al intercambio de energía con la materia en dicha colisión.

Microscópicamente, este efecto se puede describir como una excitación de la nube electrónica de la molécula debido a la interacción con el fotón incidente. Este provoca que la excitación de la molécula a un estado excitado virtual, luego emite otro fotón con el objetivo de regresar al estado fundamental. Sin embargo, si el choque ha sido inelástico y se ha perdido o ganado energía, la molécula no volverá exactamente al mismo estado, sino que se encontrará en un estado rotacional o vibracional distinto del inicial. La diferencia de energía entre estos estados es lo que modifica la frecuencia del fotón emitido [88].

Para obtener información molecular, se analizan los niveles de energía vibracional, los cuales son característicos de los átomos del enlace, su conformación y su entorno. Estos niveles tienen frecuencias de resonancia característicos, las cuales son función de la masa de las moléculas y la fortaleza de sus enlaces. A diferencia de la espectroscopia infrarroja, en la que es necesario un cambio en el momento dipolar de la molécula, para la espectroscopia, Raman es necesario un cambio en la polarizabilidad, lo cual permite obtener información espectral complementaria sobre moléculas homonucleares [88].

La espectroscopia Raman es una técnica establecida para la caracterización de semiconductores. Las posiciones de la banda en el espectro medido contienen información sobre la composición del material, la estructura y las fuerzas mecánicas [89].

3.6.4 Difracción de rayos X (RDX):

Los rayos X se producen al bombardear un metal con electrones de alta energía. Cuando los electrones penetran el metal se desaceleran y emiten radiación en un intervalo de longitudes de onda [90] este intervalo de longitudes de onda va desde aproximadamente 10^{-5} Å hasta alrededor de 100 Å; sin embargo, la espectroscopia de rayos X convencional abarca la región de aproximadamente 0.1 Å a 25 Å [91].

Estos fueron descubiertos por Rontgen en 1895 [92]. En 1912 se sabía que los cristales se formaban mediante la repetición periódica de alguna unidad, probablemente un átomo o molécula, y que estas unidades estaban situadas a 1 o 2 Å aparte.

Por otro lado, hubo indicaciones, pero solo indicaciones, de que los rayos X pueden ser ondas electromagnéticas de aproximadamente 1 o 2 Å en longitud de onda. Además, el fenómeno de la difracción se entendía bien, y se sabía que la difracción, a partir de la luz visible por una rejilla reglada, ocurría cada vez que el movimiento de onda encontraba un conjunto de objetos dispersos espaciados regularmente, siempre que la longitud de onda del movimiento de onda fuera de el mismo orden de magnitud que la distancia de repetición entre los centros de dispersión [93].

Von Laue razonó que, si los cristales estaban compuestos de átomos espaciados regularmente, podrían actuar como centros de dispersión para rayos X, y si los rayos X fueran ondas electromagnéticas de longitud de onda aproximadamente igual a la distancia interatómica en los cristales, entonces debería ser posible difractar los rayos X por medio de cristales. Bajo su dirección, Friedrich y Knipping realizaron experimentos para probar esta hipótesis: se instaló un cristal de sulfato de cobre en la trayectoria de un haz de rayos X estrecho y se dispuso una placa fotográfica para registrar la presencia de rayos difractados, si los hubiera. El segundo intento fue exitoso y mostró sin duda que los rayos X fueron

difractados por el cristal del haz primario para formar un patrón de puntos en la placa fotográfica [93].

El relato de estos experimentos fue leído con gran interés por dos físicos ingleses, W. H. Bragg (1862-1942) y su hijo WL Bragg (1890-1971). Este último, aunque solo era un joven estudiante en ese momento, todavía era el año 1912, analizó con éxito el experimento de Laue y pudo expresar lo necesario. Condiciones para la difracción en una forma matemática considerablemente más simple que la utilizada por von Laue . También atacó el problema de la estructura cristalina con la nueva herramienta de difracción de rayos X y, al año siguiente, resolvió las estructuras de NaCl, KCl, KBr y KI, todas las cuales tienen la estructura de NaCl; estas fueron las primeras determinaciones completas de la estructura cristalina jamás hechas. Las estructuras más simples de metales como el hierro y el cobre no se determinaron hasta más tarde. [93]

En términos generales la difracción de rayos X es la interacción entre el vector eléctrico de la radiación X y los electrones de la materia por la que pasa da lugar a una dispersión de los rayos. Cuando los rayos X son dispersados por el entorno ordenado de un cristal, tienen lugar interferencias (tanto constructivas como destructivas) entre los rayos dispersados, ya que las distancias entre los centros de dispersión son del mismo orden de magnitud que la longitud de onda de la radiación. El resultado es la difracción esta difracción puede obtener cualquier ángulo θ , la ecuación que nos permite estudiar las direcciones cristalográficas con la predicción de estos ángulos es la ecuación de Bragg que cumple con la siguiente formula: $n\lambda = 2d \text{ sen}\theta$. [91]

3.6.5 Microscopía electrónica de Barrido (SEM)

El microscopio electrónico de barrido fue desarrollado principalmente para vencer las limitaciones que presenta el microscopio óptico (baja resolución y limitada profundidad de campo). Con esta técnica se colectan electrones secundarios y de retroceso que son emitidos de la superficie del material bajo observación. [94] Estos electrones ayudan a identificar las características de la superficie de las nanopartículas, estas deben ser capaces de resistir el vacío. El tamaño medio promedio evaluado por SEM es comparable con los resultados obtenidos por la técnica llamada dispersión dinámica de la luz (DLS). Además esta técnica basada en microscopía electrónica determina, la forma y la morfología de la superficie con la visualización directa de las nanopartículas [95].

En un SEM, los electrones incidentes (de un cañón de electrones) típicamente tienen energías de 2 a 40 keV. Existen tres tipos de cañones de electrones de uso general: el más común es el filamento de tungsteno que se calienta (al pasar una corriente a través de él) a más de 2500°C para producir la emisión térmica de electrones desde su punta. Los filamentos de hexaboruro de lantano (LaB6) también funcionan por emisión termiónica, pero las ventajas incluyen una mayor corriente de haz máxima, es decir, un haz "más brillante" (porque LaB6 tiene una función de trabajo más baja que el tungsteno) y una vida útil más larga. Sin embargo, estos filamentos son más caros [96].

3.6.6 Dispersión dinámica de luz (DLS)

La investigación actual exige el método más rápido y más popular para determinar el tamaño de partícula. Las técnicas más rápidas y populares, como la espectroscopia de correlación de fotones (PCS) o la dispersión dinámica de la luz (DLS), se utilizan ampliamente para determinar el tamaño de las nanopartículas brownianas en suspensiones coloidales en los

rangos de nano y submicrón. En esta técnica, la solución de partículas esféricas en movimiento browniano, provoca un cambio Doppler cuando se exponen contra la luz monocromática brillante (láser). Dicha exposición a la luz monocromática golpea la partícula en movimiento, lo que resulta en el cambio de la longitud de onda de la luz entrante. El alcance de este cambio en la longitud de onda determina el tamaño de la partícula. Este parámetro ayuda en la evaluación de la distribución del tamaño, el movimiento de las partículas en el medio, que puede ayudar aún más en la medición del coeficiente de difusión de la partícula y el uso de la función de autocorrelación. La dispersión dinámica de la luz (DLS) ofrece la técnica más utilizada para una estimación precisa del tamaño de partícula y la distribución de tamaño. [86]

3.6.7 Potencial Z

El potencial zeta es una propiedad de los materiales que miden el potencial electrocinético en sistemas coloidales en la química coloidal; se denota por lo general con la letra griega zeta. Desde un punto de vista físico, el potencial zeta es el potencial eléctrico en la doble capa interfacial; es decir que es el punto donde se unen la capa difusa y la de Stern. [97].

Por lo tanto, el potencial zeta es la potencia electrostática que existe entre la separación de las capas que rodean a la partícula. Se usa el modelo de la doble capa para visualizar la atmósfera iónica en la proximidad del coloide cargado y para explicar cómo actúan las fuerzas eléctricas de repulsión. Es posible entender este modelo como una secuencia de etapas que ocurren alrededor de un coloide negativo, si los iones que neutralizan sus cargas son repentinamente separados [98].

Efecto del coloide sobre el ion positivo (llamado contra ion) en la solución. Inicialmente, la atracción del coloide negativo hace que algunos iones positivos formen una rígida capa adyacente alrededor de la superficie del coloide; esta capa de contra iones es conocida como la capa de Stern. Otros iones positivos adicionales son todavía atraídos por el coloide negativo, pero estos son ahora rechazados por la capa de Stern, así como otros iones positivos que intentan acercarse al coloide. Este equilibrio dinámico resulta en la formación de una capa difusa de contra iones, éstos tienen una alta concentración cerca de la superficie, la cual disminuye gradualmente con la distancia, hasta que se logra un equilibrio con la concentración de los contra iones en el seno de la disolución [98].

El potencial zeta, el cual es importante porque puede ser medido de una manera muy simple, mientras que la carga de la superficie y su potencial no pueden medirse. El potencial zeta puede ser una manera efectiva de controlar el comportamiento del coloide puesto que indica cambios en el potencial de la superficie y en las fuerzas de repulsión entre los coloides. La relación entre el potencial zeta y el potencial de superficie depende del nivel de iones en la solución. Así, en el agua, la doble capa hace que el potencial zeta sea una buena aproximación del potencial de superficie [98].

Para las moléculas y partículas que son lo suficientemente pequeños, un alto potencial zeta le confiere estabilidad, es decir, la solución o dispersión se resistirá a la agregación. También la estabilidad de las dispersiones depende del balance entre las cargas electrostáticas repulsivas en la partícula coloidal y las fuerzas de atracción de van der Waals [97].

Capítulo 3

4.0 Planteamiento del problema y justificación:

Cuando las tecnologías avanzan traen con ellos grandes problemas que aún están sin resolverse, recientemente han surgido nanomateriales capaces de resolver un gran número de problemáticas, debido a esto se permanece en búsqueda de nuevas aplicaciones para las nanomateriales, en este trabajo se plantean dos grandes problemas. La purificación de la proteína MAP 3773c (FUR) es complicada reproducirla teniendo un costo muy elevado y la contaminación de aguas por nitrobenceno es muy recurrente. Se pretende aprovechar las características de adsorción y semiconducción de las nanopartículas para poder resolverlos.

En virtud de los grandes avances y el desarrollo de nuevas y cada vez más eficientes técnicas del estudio de proteínas recombinantes ha surgido una gran necesidad de crear o modificar métodos de purificación de las mismas, que nos permitan obtenerlas con mayor éxito y en un menor lapso de tiempo.

Con esto se optimizarán los procesos, haciéndolos menos costosos y obteniendo un gran beneficio. Puesto que en la actualidad, los métodos existentes para la purificación de la proteína MAP3773c son muy costosos e ineficientes, ya que en algunas es complicado obtener un proceso óptimo como se sabe que map 3773c es una proteína inestable los métodos actuales tienen un tiempo de procesamiento largo lo cual dificulta que la proteína se purifique con eficiencia, además de que se utilizan soluciones demasiado costosas, que suben el valor monetario de la purificación .

Por lo tanto, de este problema surge la propuesta de crear un nuevo método, que se enfoque en aprovechar el comportamiento de la proteína, se sabe que la proteína tiene afinidad a metales divalentes especialmente en zinc, sabiendo esto se plantea que con una nanopartícula aumenta el área de contacto superficial y por ende una mejor interacción

material – proteína, aprovechando también que cuando un material es nanoestructurado se pulen y adquiere nuevas propiedades físicas y químicas.

Además de que si la proteína resultara blanco farmacológico pudiéramos dar la pauta para elaborar un sistema de liberación de fármacos ya que el zinc es biológicamente amigable para los sistemas biológicos.

Aprovechando las características de la nanopartículas como la gran interacción de las nanopartículas- material orgánico se aprovechó para evaluar la degradación de una de las moléculas más contaminantes de agua, como nitrobenzeno.

Objetivo:

Aprovechar las características fisicoquímicas de las nanopartículas de peróxido de zinc para elaborar un procedimiento de purificación con interacciones específicas de la proteína MAP 3773c para aumentar la eficiencia de la purificación de esta proteína haciendo interaccionar nanopartículas de peróxido de zinc así como elaborar una fotodegradación efectiva para poder proponer el nanomaterial como un buen fotocatalizador

6.1 Objetivos específicos:

- Elaborar nanopartículas de peróxido de zinc.
- Caracterizar nanopartículas de peróxido de zinc
- Evaluar las propiedades de interacción nanopartícula-Histidina a distintos pH
- Lograr una purificación más óptima de la MAP 3773 C.
- Evaluar la condición más óptima de fotodegradación de Nitrobenzeno.

7.0 Hipótesis:

7.1 Hipótesis nula:

Las nanopartículas de zinc generan interacciones eficientes con histidina y por lo tanto es más fácil una purificación eficiente y eficaz del monómero de la proteína map3773c.

La fotodegradación de nitrobenceno es mayor al 90% en dos horas

7.2 Hipótesis alterna:

Las nanopartículas de peróxido de zinc no hacen interacción con la histidina

La fotodegradación de nitrobenceno es menor al 90%.

Capítulo 5

8.0 Materiales y métodos:

8.1 *Síntesis de nanopartículas de zinc*

Las nanopartículas de ZnO₂ se sintetizaron por una ruta sol-gel asistido por sonoquímica; para este propósito, se preparó una solución precursora de 50 ml utilizando 5 ml de peróxido al 30% con agua de grado HPLC de J.T Baker, la solución se trató con ultrasonidos (TPC Advance Technology UC-450 Model) durante un período de 2 minutos. Luego, se disolvió 1 g de acetato de zinc (99.9%) de reactivos de TSA en la solución precursora se colocó en ultrasonido durante un período de 5 minutos hasta que se obtuvo una solución homogénea.

Posteriormente se colocó en ultrasonido durante media hora a una temperatura de 60 ° C ± 5 ° C [99], una vez que transcurrió el tiempo, se obtuvo una solución blanca. Esa solución se

colocó en una caja Petri y se dejó secar a 36° C por 24 horas, se obtuvo un polvo blanco que se lavó 2 veces con agua destilada.

8.2 Caracterización de nanopartículas

8.2.1 *Análisis UV-VIS*

Para evaluar las propiedades ópticas de las nanopartículas y tratar de comprender la estructura electrónica que pudieran tener las nanopartículas se utilizó un espectrofotómetro UV-VIS DR 6000 marca HACH. Se utilizó una solución de 30 ppm de nanopartículas ZnO₂ utilizando como disolvente agua destilada, las lecturas se efectuaron en un rango de barrido de 700 a 190 nm y se utilizaron celdas de cuarzo de 1 cm.

8.2.2 *Análisis FT-IR*

Para estudiar las vibraciones de enlace de ZnO₂ se llevó a cabo un análisis de FT-IR se utilizó el equipo Nicolet IS10 Thermo Scientific FT-IR , con el método de ATR realizando un barrido de los 500 cm⁻¹ a 4000 cm⁻¹ (se realizaron 100 barridos por lectura y se llevaron a cabo 3 lecturas) para ello se utilizó aproximadamente 100 mg de muestra .

8.2.3 *Análisis Raman*

El espectro Raman fue analizado con ayuda de un equipo Raman WITec Confocal Raman Microscope System (alpha300R) utilizando un láser Nd: YVO4 con una longitud de onda de excitación de 532 nm. La resolución típica utilizada se logró utilizando un objetivo de 100x. Con una rejilla de 672 líneas/mm (4cm⁻¹) y Rejilla 1800 líneas/mm (1 cm⁻¹). La velocidad de adquisición de espectros puntuales fue ≤ 10µs, utilizando una potencia de lámpara de 14.4 mW (para la znsio 118um, znsio) teniendo en cuenta los efectos de la temperatura del láser sobre la muestra. Los espectros se corrigieron utilizando una función lineal.

8.2.4 Análisis Difracción de rayos X

Los experimentos de difracción de rayos X del polvo se realizaron en un Difractómetro de Bruker D8 Advance diffractometer (Bruker Co., Billerica, MA, USA) con una velocidad de escaneo de $0.02^\circ / 1.2004 \text{ s}$ de dos pasos el tubo de radiación $\text{CuK}\alpha$ 1.5406 \AA se hizo funcionar a 30 kV y 30 mA. Las difracciones de rayos X en polvo (XRPD) se tomaron en el rango de $15\text{--}75^\circ$ (2θ) en tamaños de paso de 0.02° .

8.2.5 Análisis microscopía electrónica de barrido (SEM)

La muestra se analizó con un recubrimiento de oro para mejorar la resolución de la imagen, para el recubrimiento se siguió el método de pulverización catódica (JFC-110 ion sputter, JEOL). Las imágenes de las muestras se obtuvieron en un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM7600F Tokio, Japón) con un voltaje de aceleración de 5 Kev. La distribución del tamaño y el tamaño del diámetro promedio de grano y cristal se determinaron contando los granos y los cristales con un software de procesamiento y análisis de imágenes ImagenJ. Para elaborar los histogramas de distribución de tamaño se utilizó un software para gráficos y análisis de datos origin pro 8. El diámetro promedio de cada partícula y cristal, se determinó mediante la medición de al menos 180-200 partículas o cristales por imagen a partir de 5 imágenes. Además, se realizó un análisis de espectroscopia de dispersión de energía (EDS) para la composición química del material utilizando el mismo microscopio electrónico (JEOL JSM7600F) con un rango de voltaje de operación de 0-12 keV.

8.2.6 Análisis DLS y Potencial Z

Las mediciones de dispersión dinámica de la luz (DLS) para obtener el diámetro hidrodinámico (D_h) se llevaron a cabo a temperatura ambiente (25°C) utilizando un Zetasizer nano-ZS de

Malvern Instruments (ZEN3500). El mismo equipo también se usó para medir el potencial zeta (ζ) de las soluciones de nanopartículas a diferentes valores de pH ajustados con HCl y NaOH. Para el Dh y ζ se evaluaron a temperatura ambiente a una solución de 300 ppm.

8.3 Interacción nanopartícula-histidina

Las soluciones tampón de enlace fueron preparadas. Antes de cada experimento, las nanopartículas, se colocaron en la solución tampón adecuado. Después de una reacción de unión durante 18 h a 25 °C en un baño de agitación, se aísla. Luego se recogieron los sobrenadantes, y se analizaron por absorbancia UV . Para estimar indirectamente la cantidad de histidina adherida y así determinar el tampón óptimo y pH [30].

Para el análisis FT-IR se utilizó el equipo Nicolet IS10 Thermo Scientific FT-IR , con el método de ATR realizando un barrido de los 400 cm^{-1} a 4000 cm^{-1}

8.4 Interacción nanopartícula-proteína

8.4.1 Inducción para la sobreexpresión de la proteína MAP3773c

Se seleccionaron las siguientes condiciones de inducción para la sobreexpresión de la proteína MAP3773c con la cepa *Escherichia coli* BL21 (DE3) – pRSET-MAP3773c: 16 horas de incubación a 30°C con una concentración final del inductor IPTG a 1 mM en el intervalo de 0.6-0.7 de densidad óptica a 600 nm; enseguida se procedió a sobreexpresar la proteína MAP3773c a partir de 10 L de caldo LB estéril. Al finalizar la inducción, el cultivo se centrifugó a 10,000 rpm por 30 minutos a 4 °C, se recolectó el sobrenadante y las células recolectadas se lavaron con una solución de NaCl 0.15 M, la biomasa celular se congeló a -20 °C. [68].

8.4.2 Lisis celular

Se descongeló aproximadamente 13.0 g de biomasa celular en hielo molido y se homogenizó volúmenes de columna de búffer A previamente filtrado en papel whatman® y con una concentración final de 3 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, inhibidor de proteasas), que partió de una solución concentrada disuelta en isopropanol (se mantuvo siempre en un baño hielo molido la suspensión).

Se utilizó el equipo Dr. Hielscher UP200s Sonifier para sonicar la suspensión celular en hielo molido con 10 ciclos de 45 segundos con 30 segundos de pausa entre cada ciclo, con una amplitud de 90 % y ciclo de 0.5; después el lisado se centrifugó 3 veces a 20,000 rpm por 20 minutos a 4 oC, se recuperó cada vez el sobrenadante y se descartaron los restos celulares precipitados. Finalmente el lisado se pasó por filtros de 0.80 µm y 0.22 µm (Millipore), se tomó una alícuota de 100 µL para realizar una electroforesis SDS-PAGE.

8.4.2 Purificación

8.4.3 SDS-PAGE

A las alícuotas recolectadas durante la purificación se les precipitó las proteínas de la siguiente manera, para eliminar el cloruro de guanidinio que es incompatible con los geles de poliacrilamida: se tomaron 15 µL de cada muestra a concentrar, luego se les adicionó 85 µL de agua destilada y se mezclaron con 100 µL de ácido tricloroacético al 10%, enseguida se incubaron en hielo molido durante 20 minutos; luego se centrifugaron a 20,000 rpm durante 20 minutos a 4 oC, se descartaron los sobrenadantes y luego se lavó cada precipitado con 1 mL de etanol al 95 % frío, de nuevo se centrifugaron a 20,000 rpm durante 20 minutos a 4 oC

y se descartaron los sobrenadantes, los precipitados se dejaron secar a temperatura ambiente y se resuspendieron (con la ayuda de un vórtex) en 15 μ L de agua destilada.

Con las alícuotas concentradas en el paso anterior se procedió a realizar una electroforesis SDS-PAGE en gel al 17 %. [68]

8.6 Actividad fotocatalítica

Para medir la actividad fotocatalítica de las nanopartículas de ZnO_2 , se degradó nitrobenzeno (NB). Las condiciones de reacción son especificadas por Reynoso-Soto et. Alabama. (2013) [100]

Para las reacciones de fotocatálisis, la solución preparada fue de 250 ml de NB a 15 ppm y 3 diferentes concentraciones de nanopartículas de ZnO_2 (20, 30 y 40 ppm), el pH fue neutro a menos que se especifique. Las muestras se centrifugaron en una microcentrífuga (Thermo Espresso Personal Microcentrifuge, Thermo Fisher Scientific Inc., MA, EE. UU.) Durante 10 minutos a 15 000 rpm para eliminar las nanopartículas de la solución. Para las modificaciones de pH se utilizó HCl y NaOH. Todos los experimentos de fotocatálisis se realizaron por duplicado. El consumo de energía específico (SEC) se estimó utilizando la siguiente expresión (ec. 1):

$$SEC = L \cdot NP \cdot t / m \quad (1)$$

L = número de lámparas, NP = potencia nominal de las lámparas (KW), t = tiempo para el porcentaje máximo de degradación (h) y m = masa de NB degradada (kg), calculada a partir de la concentración inicial de NB y la concentración de NB en " t " [101].

8.7 Cromatografía de gases/masas

Para identificar los intermedios de la degradación de la fotocatalisis de NB, cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS). Los GC-MS se registraron en un TRACE 1310 (GC) de Thermo Scientific y en un cuadrupolo simple ISQ LT (MS) de Thermo Scientific, con un modelo de columna TG-SQC (30 m x 0,25 mm de diámetro interno, 0,25 µm de espesor de película).

La temperatura del detector fue de 240 ° C, la temperatura del inyector fue de 250 ° C y la temperatura de la línea de transferencia fue de 250 ° C; la temperatura del horno comenzó a 70 ° C durante 3 min, aumentó a una velocidad de 40 ° C / min hasta 280 ° C, con un tiempo de mantenimiento de 7 min.

Se empleó helio como gas portador, a 1 ml/min de flujo. Se extrajeron 50 ml de muestras con 5 ml de diclorometano (duplicado), en una proporción de 10: 1 entre la muestra y el disolvente. El extracto orgánico se secó con Na₂SO₄ anhidro. Se colocó 1 ml de extracto en un vial de 2 ml y luego se inyectó manualmente a GC.

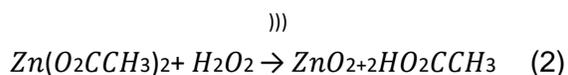
El porcentaje de los productos de degradación detectados se calculó utilizando el área bajo la curva de los picos del cromatograma correspondientes a NB y los nitrofenoles (NP) en proporción al NB% detectado por espectroscopia UV-Vis. El porcentaje de intermedios de reacción corresponde a la suma de estos.

Capítulo 6

9.0 Resultados y discusiones “síntesis y caracterización de nanopartículas”

9.1 Síntesis de nanopartículas de ZnO₂

La síntesis de nanopartículas de peróxido de zinc ZnO₂ da lugar a la siguiente reacción (eq.2) [102]



La formación de la reacción ZnO₂ se confirmó mediante evaluación visual. El color de la reacción de la mezcla se cambió de transparente a blanco lechoso (figura 1) , posteriormente esta solución se seca y se lava para obtener un polvo fino blanco.



Figura 1: Síntesis

En la figura 1 se muestra la solución de ZnO₂ después del tratamiento de ultrasonido y temperatura

9.2 Caracterización de nanopartículas ZnO₂:

9.2.1 Uv-Vis

Los picos característicos de absorción de las nanopartículas de ZnO₂ se muestran en el rango de 260 nm a 330 [103]. Los desplazamientos se pueden deber al tamaño y/o forma de las nanopartículas [104]. En la figura 2A se observa el espectro Uv-Vis una banda de excitación máxima a los 285 nm a pesar que las absorciones máximas características de las nanopartículas de óxido de zinc son a los 350 – 381 nm aproximadamente [105], el espectro se asemeja mucho a los espectros obtenidos por Arefi, M. R (2012) y Fooladsaz (2012) [106] [107], cuando caracterizaron las nanopartículas de ZnO.

Sin embargo, en nuestro espectro podemos observar un desplazamiento que puede deberse a fenómenos de tamaño o forma, como se mencionó anteriormente, se observa que la solución absorbe de 650 nm a 250 nm. Esto puede deberse al hecho de que tiene una energía de unión diferente [108], ya que ZnO₂ necesita menos cantidad de energía de enlace que ZnO [109]. En la figura 2 A se puede observar que en el espectro de los reactantes (línea punteada) no hay una absorción característica a diferencia que la ilustración 2 A (línea negra), se observa cómo cambia el espectro después del proceso al que se sometió, observando un cambio notorio en el espectro Uv-Vis.

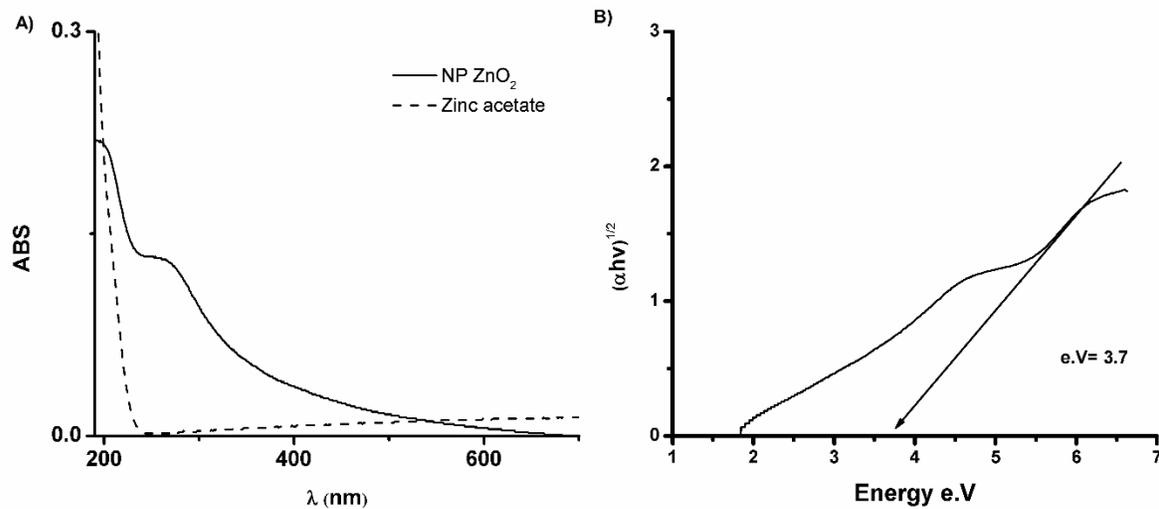


Figura 2 Espectro Uv-Vis/Band gap

Figura 2: A) Espectro UV-Vis de nanopartículas de ZnO₂ obtenidas (línea negra) dispersas en agua y Uv-Vis del reactivo acetato de zinc (línea de puntos) utilizado para la síntesis. (B) Cálculo de band gap indirecta para nanopartículas de ZnO₂.

Como sabemos el espectro Uv-Vis nos brinda información no solo de las propiedades ópticas sino de la band-gap figura 2 B se conoce que existe una fuerte hibridación entre los estados Zn-d y O-p. Y que ZnO₂ es un semiconductor indirecto con la parte superior de la banda de valencia ubicada en Γ y la parte inferior de la banda de conducción ubicada entre Γ y R. para ZnO₂ la banda prohibida es de 2.3 eV. Sin embargo, generalmente se subestima aproximadamente en un 50-100%, usando la teoría de la funcional densidad. Por lo tanto, el valor real de la brecha de energía para ZnO₂ podría estar en el rango de 3.3-4.6 eV, de acuerdo con el valor calculado a partir del espectro de emisión [110].

Se observa el cálculo de energía del intervalo de banda figura 2 B, la energía del intervalo de banda se calculó utilizando el método tauc (ecuación 3) como se ve a continuación:

$$\alpha h\nu = C(h\nu - E_g)^n \quad (\text{ecuación 3})$$

En donde α es el coeficiente de absorción, $h\nu$ es la energía incidente, n es = 2 C es la energía de la banda prohibida, se grafico $(\alpha h\nu)^2$ contra $h\nu (E_g)$ para el cálculo de la energía de banda prohibida se extrapolo la parte lineal con la abscisa $(h\nu \text{ eV})$ [111] [112]. Como se puede observar en la ilustración 2 obteniendo un valor de 3.7 eV, estando dentro del intervalo consultado en la bibliografía.

9.2.2 FT-IR

El espectro FT-IR de las nanopartículas de ZnO_2 se muestra en la figura 3A con picos característicos de 667 cm^{-1} , 1022 cm^{-1} , 1405 cm^{-1} y 1535 cm^{-1} . Las posiciones de los picos en 1022 cm^{-1} , 1405 cm^{-1} y 1535 cm^{-1} pueden deberse a las bandas de vibración del enlace correspondiente a O-O, los cuales pueden corresponder a los iones peróxido (O_2^{-2}) de las nanopartículas de ZnO_2 .

Otra banda de absorción bien definida de las nanopartículas de ZnO_2 se observa ubicada a 667 cm^{-1} que puede corresponder a la vibración de Zn-O. Verma et.al. (2014) observaron picos de vibraciones características de nanopartículas de ZnO_2 a 436 cm^{-1} para el enlace Zn-O, y 1040 , 1334 y 1450 cm^{-1} para el enlace O-O [109] las cuales tienen una gran semejanza con nuestras nanopartículas solo con un desplazamiento este desplazamiento indica la propiedad de confinamiento cuántico de las nanopartículas.

En el rango de confinamiento cuántico, la band-gap de la partícula aumenta, lo que resulta en el desplazamiento del borde de absorción a una longitud de onda más baja, a medida que el tamaño de partícula disminuye [113]

Conjuntamente el pico ancho en la longitud de onda de 3384 cm^{-1} , corresponde a vibraciones características de la molécula de agua [114]. Por otro lado, las bandas mostradas en 1535 cm^{-1} y 1405 cm^{-1} pueden corresponder a las vibraciones de los reactivos (acetato de zinc), ya que son características de las vibraciones de los enlaces C-O y C-C [115]. Esto podría ser parte del reactivo que no reaccionó, puede parecer lógico que todavía estén presentes en la muestra, ya que la muestra no se sometió a ningún tratamiento térmico o también pudo deberse a la absorción de CO_2 en la superficie de las nanopartículas [116]. Esto corresponde con el porcentaje de las proporciones de los átomos del análisis EDX figura 4B en donde el ZnO_2 no contiene oxígeno adicional proveniente del acetato.

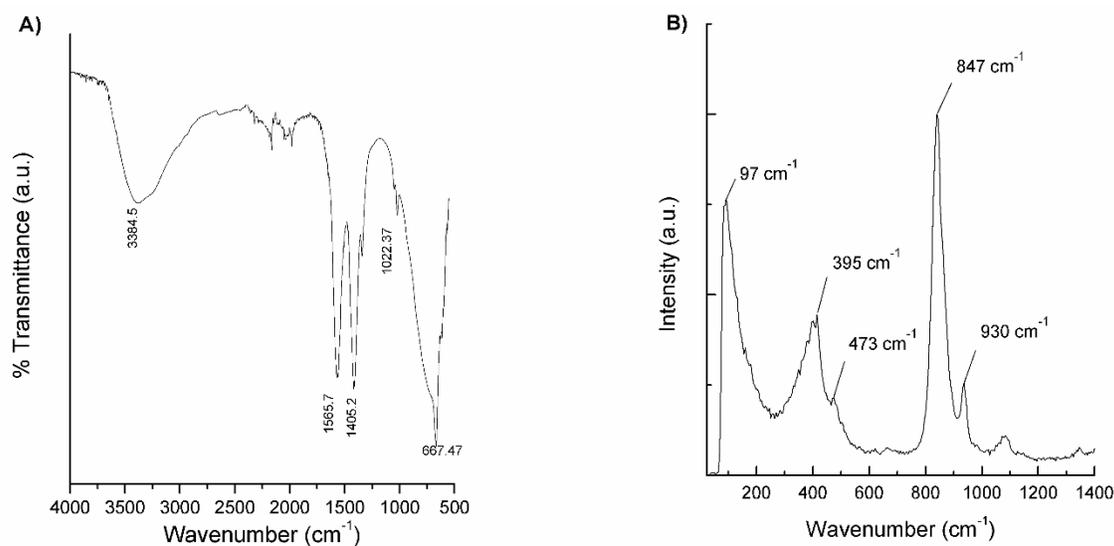


Figura 3: Espectro FT-IR/RAMAN

Figura 3: (A) corresponde al espectro FTIR y (B) corresponde al espectro Raman para nanopartículas de ZnO_2 .

9.2.3 Raman

El espectro de Raman de nanopartículas de ZnO₂ se muestra en la figura 3B , donde están presentes 5 señales, en la posición de 97, 395, 473, 847 y 930 cm⁻¹, respectivamente. Los picos en las señales aproximadamente 99 y 440 cm⁻¹ se asignan a los dos modos de vibración E2 activos Raman no polares para ZnO. Están asociados al E2-bajo y E2-alto respectivamente. El pico en 390 se atribuye a los modos A1 alto y A1 bajo con una ligera diferencia con los resultados informados por Sun, M. et. Alabama. (2007) [117] [118] 848 y 925 cm⁻¹ coinciden con los picos característicos del espectro raman de ZnO₂ nanocrystalino [119].

9.2.4 Difracción de rayos X

Para estudiar la forma cristalina de las nanopartículas de ZnO₂ se sometió a un análisis de difracción de rayos X obteniendo el difractograma mostrado en la figura 4 A en donde se observan que todos los picos se ajustan perfectamente a los datos encontrados en la referencia JCPDS (01-077-2414), pertenece a la estructura cubica de ZnO₂ para los cálculos de parámetro de red, volumen de celda y radio atómico se utilizó la siguiente fórmula:

$$d_{hkl} = \frac{a}{\sqrt{h^2k^2l^2}} = \frac{n\lambda}{2 \sin \phi} \text{ (Ecuación 4)}$$

En donde hkl son los índices de miller indicados en el plano, n donde comúnmente es 1, λ es la longitud de onda (1.541 Å. CuKα) y φ es el ángulo de difracción. Estos cálculos se muestran en la tabla 2 en donde podemos observar que el parámetro de red es a=b=c un comportamiento típico de las estructuras cubicas, para el tamaño de cristal se utilizó la ecuación de Scherrer [120] [121] obteniendo un tamaño de cristal de aproximadamente 8nm figura 4 C.

Tabla 2: DRX

Tabla 2: Parámetros de estructura cristalina de ZnO₂ calculados por difracción de rayos X

Distancia 2-theta	Distancia interplanar longitud de onda= 1.541 A. CuKa	Plano JCPDS			Parámetro de red A°	Radio atómico	Volumen de celda
37	2.43	2	0	0	4.86	2.43	114.87
31	2.84	1	1	1	4.91	2.45	118.84
53	1.72	2	2	0	4.87	2.43	115.90
63	1.47	3	1	1	4.87	2.43	115.99
66	1.41	2	2	2	4.87	2.43	115.82
41	2.19	2	1	0	4.89	2.44	117.41
45	1.99	2	1	1	4.88	2.44	116.24

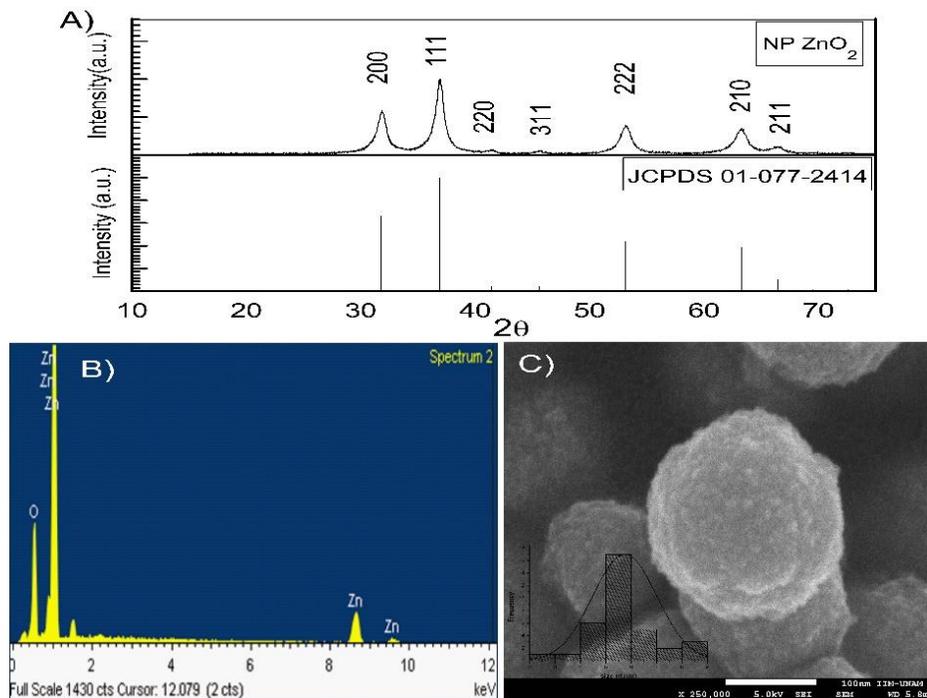


Figura 4: XRD/EDX/SEM

Figura 4: Las imagines (A) XRD, (B) EDX and (C) SEM corresponden a nanopartículas de ZnO₂. La imagen SEM y el histograma de distribución de tamaño corresponde a cristales que constituyen una partícula de 100 nm de diámetro

9.2.5 SEM, EDX Y DLS

En la Figura 3 B se muestra el espectro EDX típico de ZnO₂, esto indica la composición de la muestra formada por Zn y O (la relación atómica Zn: O es 1: 1.54), aproximándose a la de la bibliografía consultada. [122] [123] Confirmando la elemental obtenido por XRD.

Como se mencionó anteriormente, el tamaño de los cristales calculado por la ecuación de Scherrer fue de aproximadamente 8 nm, en la Figura 3 C podemos observar una micrografía de una nanopartícula de ZnO₂, en la que se puede ver que la partícula está hecha de pequeños cristales que se midieron en aproximadamente 6 nm. La figura 5 muestra fotografías de las nanopartículas tomadas a diferentes distancias. La Figura 6 A muestra la medición del

diámetro de una foto captada con un voltaje de aceleración de 5 KeV y sometida a análisis de imágenes, con la ayuda de un software de imagen J que obtiene un diámetro promedio de aproximadamente 100 nm con una distribución normal. Esto confirma el análisis DLS figura 6 B del cual obtuvimos un D_h de ~ 100 nm, lo que significa que sintetizamos grupos de nanopartículas de aproximadamente 100 nm, con una distribución normal hecha de pequeños cristales de aproximadamente de 8 nm.

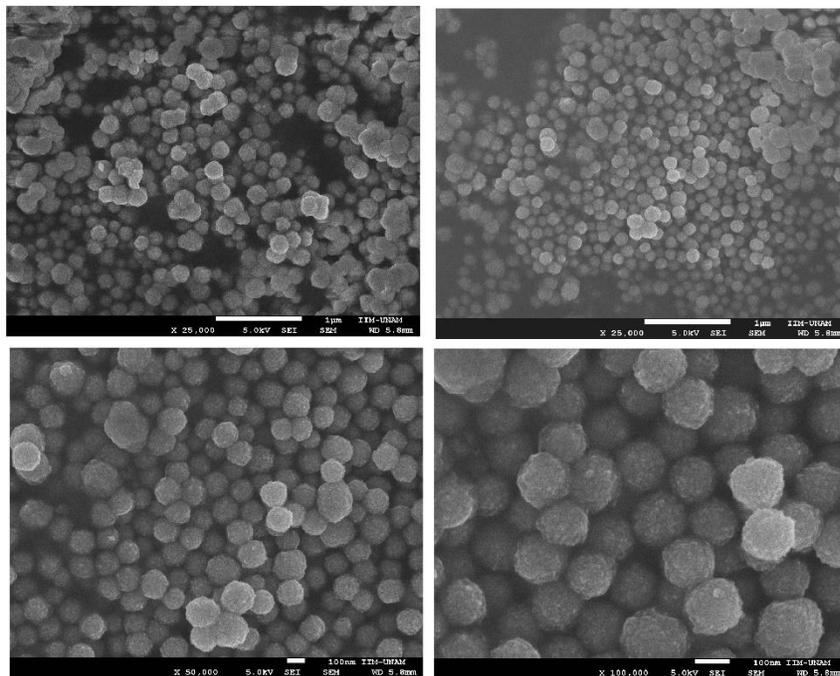


Figura 5: SEM

La figura 5 muestra Imágenes SEM de nanopartículas de peróxido de zinc tomadas a diferentes distancias.

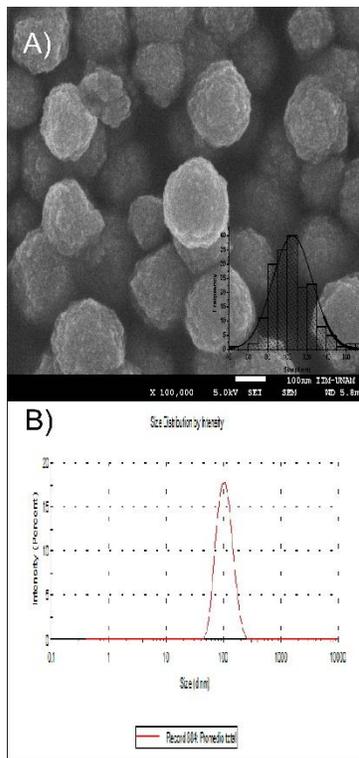


Figura 6:SEM/DLS

Figura 6: (A) imagen SEM con un recubrimiento de oro y (B) distribución del diámetro hidrodinámico (D_h) por análisis de DLS para nanopartículas de ZnO_2 . El inserto en la imagen SEM corresponde a un histograma de distribución de tamaño de las partículas de 100 nm de diámetro.

9.2.6 Potencial Z

La Figura 7 presenta el perfil del potencial zeta medido a un pH variable de las suspensiones de ZnO_2 , calculado entre pH 3 y 9, el pH inicial de las soluciones fue a pH 6.3 con un potencial zeta promedio de +15 mV.

A medida que aumentó el pH, se observó que el potencial zeta disminuía gradualmente, el punto de carga cero (PZC) se midió entre pH 7,5 y 8,0, después de este punto, la solución mostró una aglomeración en el pH 9, las nanopartículas tiene una carga de -18 mV +/- 2. A

un pH más alto, las especies dominantes son $\text{Zn}(\text{OH})_2(\text{ac})$ que podrían precipitar dando una nueva fase sólida, $\text{Zn}(\text{OH})_2(\text{s})$.

Al aumentar el pH, las especies negativas, como $\text{Zn}(\text{OH})_3^{-}(\text{aq})$ y $\text{Zn}(\text{OH})_4^{2-}(\text{aq})$ dominan y determinan la carga negativa general por la deposición de las especies metálicas de la solución. [124] Al disminuir el pH de la solución por debajo de pH 7, mostró una región de dispersión al aumentar el potencial zeta. Teniendo así una región de disolución y una región de aglomeración, de acuerdo con la referencia consultada [125]. Se observó un punto isoeléctrico (IEP) a pH 3.2 figura 7 observando dos puntos de IEP (punto isoeléctrico) a pH ácido y PZC (Punto de carga cero) a pH alcalino que coincide con la referencia [126].

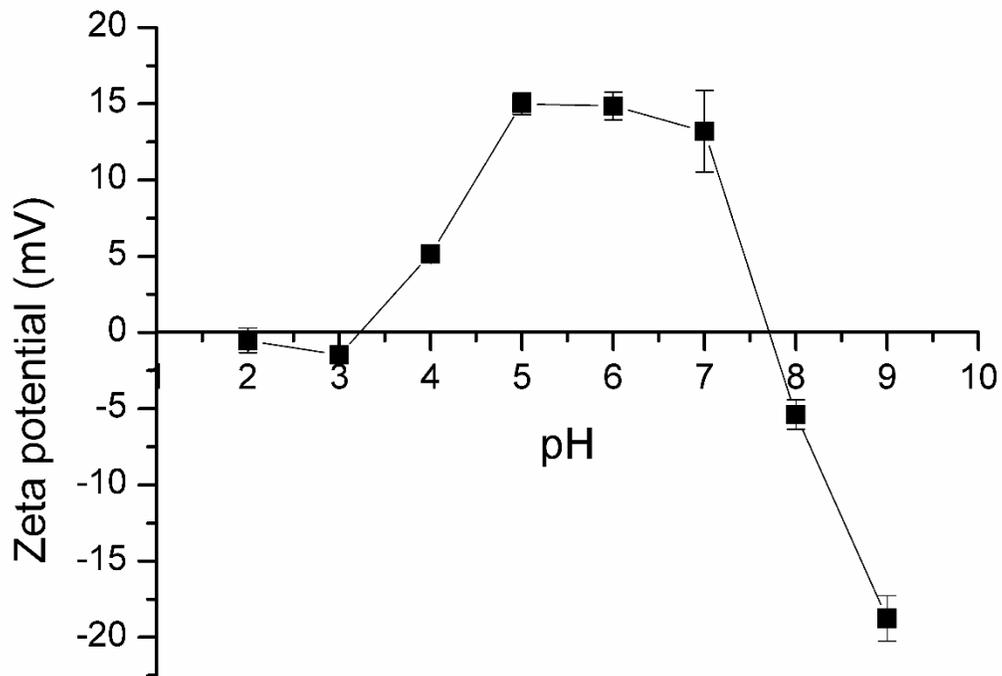


Figura 7: Potencial Z

Figura 7: Efecto del pH en la medición del potencial zeta para nanopartículas de ZnO₂.

Capítulo 7

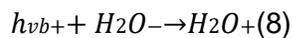
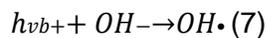
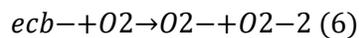
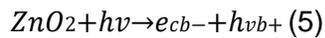
9.3 Resultados y discusiones “Fotodegradación de nitrobeneno”

9.3.1 Nanopartículas semiconductoras de ZnO₂ como fotocatalizadoras

Cuando una partícula semiconductor absorbe un fotón con una energía ($h\nu$) que coincide o excede su banda de energía (E_g), un electrón (ecb^-) se excita desde la banda de valencia (VB) a la banda de conducción (CB), dejando un agujero (hvb^+). Los electrones y los agujeros

generados por la foto pueden recombinar y disipar la energía de entrada en forma de calor, quedar atrapados en estados de superficie metaestables o reaccionar con donantes de electrones y receptores adsorbidos en la superficie del semiconductor o dentro de la capa eléctrica doble circundante de partículas cargadas [127].

Estos electrones fotogenerados en la banda de conducción (ecb^-) y orificios dentro de la banda de valencia (hvb^+), pueden recombinarse o residir en un estado atrapado o dentro de la banda respectiva. Y reaccionar con O_2 para formar los iones O_2^- o O_2^{2-} [128]. En los orificios que unen los átomos de O^- con una carga formal de O^- , los poderosos agentes oxidantes son capaces de extraer electrones del H_2O adsorbido para producir H_2O^+ , que puede disociarse para producir un protón y el radical de superficie hidroxilo. [129] Como se expresa en las siguientes ecuaciones (ecuaciones 5-10):



9.3.2 Efecto de la concentración de fotocatalizador

La Figura 7 presenta los espectros de absorción UV-vis de muestras de solución de NB después de la fotorreacción para diferentes tiempos y diferentes concentraciones, el espectro típico de NB muestra un pico de absorción entre 250 nm y 268 nm [121] [130].

En este trabajo, los espectros de NB muestran un pico de absorción en 265 que disminuyó considerablemente en intensidad a medida que aumentaba el tiempo de exposición a los rayos UV. La siguiente fórmula (eq. 11) para obtener el porcentaje de degradación fue la siguiente:

$$\text{Degradación (\%)} = [(C_0 - C_t)/C_0] \times 100 \quad (11)$$

Donde C_0 es la concentración inicial o en su defecto, la absorbancia inicial de NB y C_t es la concentración de NB en un momento determinado "t" en minutos, o bien una absorbancia de NB en un momento determinado en minutos [131].

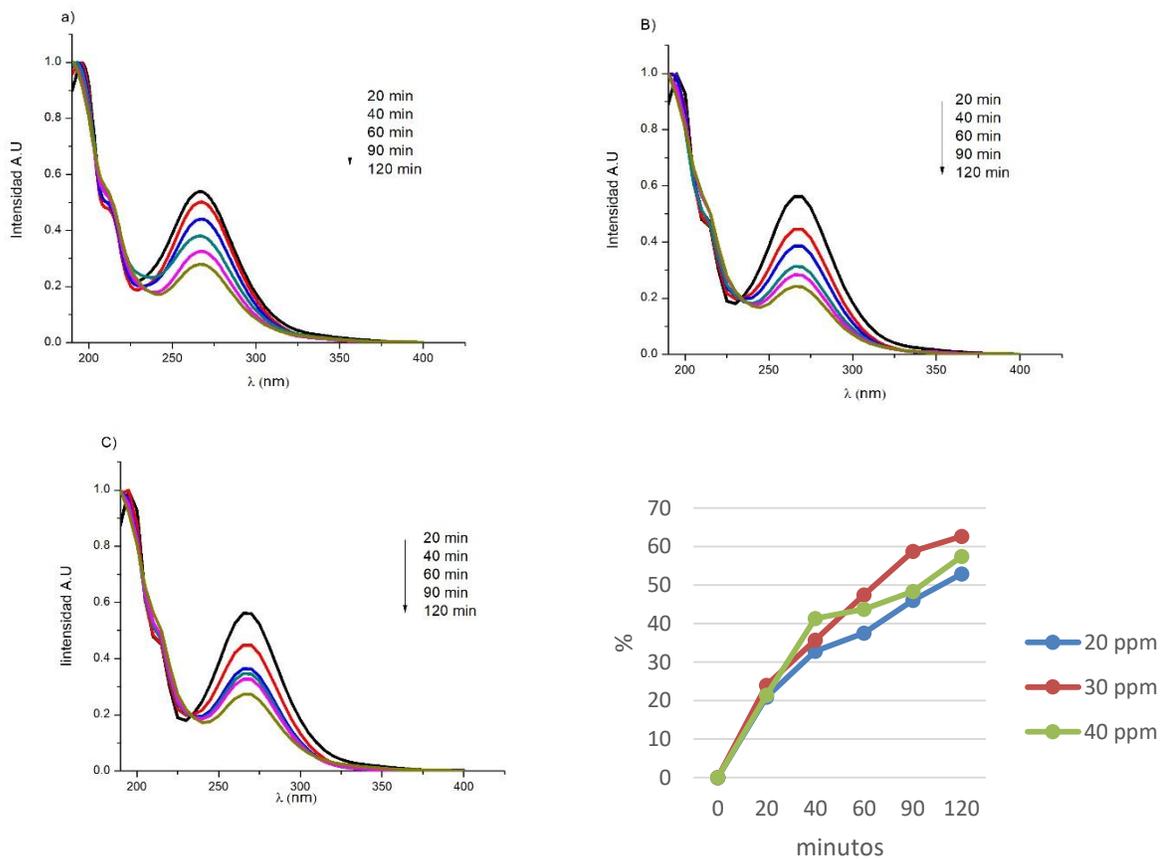


Figura 8: La figura a) muestra el espectro *Uv-Vis* de la solución de nitrobenzeno después del tratamiento con *Uv* utilizando como catalizador nanorodas de peróxido de zinc con una concentración de 20 ppm, la figura B) muestra el espectro bajo las mismas condiciones solo que con una concentración de 30 ppm de nanopartículas ZnO_2 , la figura C) contiene una concentración de 40 ppm de nanopartículas ZnO_2 mientras que la figura D) muestra el comportamiento de degradación: Tiempo / Porcentaje de degradación de las 3 concentraciones.

Figura 8: Espectro UV de nitrobenzeno

En la figura 8 A se muestra el porcentaje de fotodegradación de NB a diferentes concentraciones de nanopartículas de ZnO_2 , siendo estas 20, 30 y 40 ppm con una degradación de NB del 52.9%, 62.6% y 57.4% respectivamente, como se muestra en la tabla 2.

Se puede ver que al aumentar la concentración de 20 ppm a 30 ppm, la degradación de NB aumentó, confirmándose la influencia positiva del aumento del número de sitios activos de ZnO₂ en el proceso [132], por lo tanto la eficiencia podría mejorarse con el aumento de la concentración de ZnO₂, porque el área de superficie total disponible para la adsorción de nitrobenzeno aumentó [133].

Por el contrario, aumentar la concentración a 40 ppm tuvo una repercusión en la degradación, la disminución de la reacción fotocatalítica podría deberse a la disminución de la penetración de la luz y al aumento de la dispersión de la luz UV. [134] [135] O bien a que los iones O₂ excesivos actúan como eliminadores de radicales OH y tienen un efecto de bloqueo en la superficie del fotocatalizador de partículas y disminuyen la eficiencia de descomposición [136].

Tabla 3: Degradación de nitrobenzeno

Tabla 3: En la siguiente tabla se puede observar el porcentaje de degradación de nitrobenzeno cuando se utiliza como fotocatalizador las nanopartículas de peróxido de zinc en presencia de luz UV.						
Nanopartículas 20 ppm						
Tiempo (min)	0	20	40	60	90	120
Concentración (ppm)	15	11.9	10.0	9.4	8.1	7.1
Degradación (%)	0	20.9	32.9	37.6	46.0	52.9
Nanopartículas 30 ppm						
Concentración (ppm)	15	11.4	9.8	7.9	6.2	5.6
Degradación (%)	0	23.9	35.6	47.4	58.8	62.6
Nanopartículas 40 ppm						
Concentración (ppm)	15	11.8	8.8	8.4	7.7	6.4
Degradación (%)	0	21.5	41.3	43.7	48.4	57.4

9.3.3 Efecto del pH

El efecto del pH sobre la actividad fotocatalítica figura 9 B de las nanopartículas de ZnO_2 fue de 62.6%, 64.9% y 97.7% para pH 7, 10, 2, respectivamente, siendo pH 2 más efectivo. La razón puede ser que cuando el pH es 2.0, existe una fuerte fuerza de Coulomb entre la superficie de la nanopartícula de ZnO_2 y el nitrobenzeno, lo cual es favorable para la adsorción de nitrobenzeno en la superficie del fotocatalizador [133].

La solución coloidal de nanopartículas de ZnO_2 entre pH 2 y 3 tendría, por lo tanto, una carga superficial negativa figura 7 y se esperaría que experimentarían una atracción significativa hacia las superficies con carga superficial positiva. Ya que el pKa de la NB es 3.98, donde la forma aniónica domina al aumentar el pH de la solución. [137]

Por lo tanto, a un pH entre 2 y 3, ZnO_2 tiene un potencial zeta negativo y NB una carga positiva en estas condiciones, lo que aumentaría las atracciones nanopartículas-NB. De esta manera,

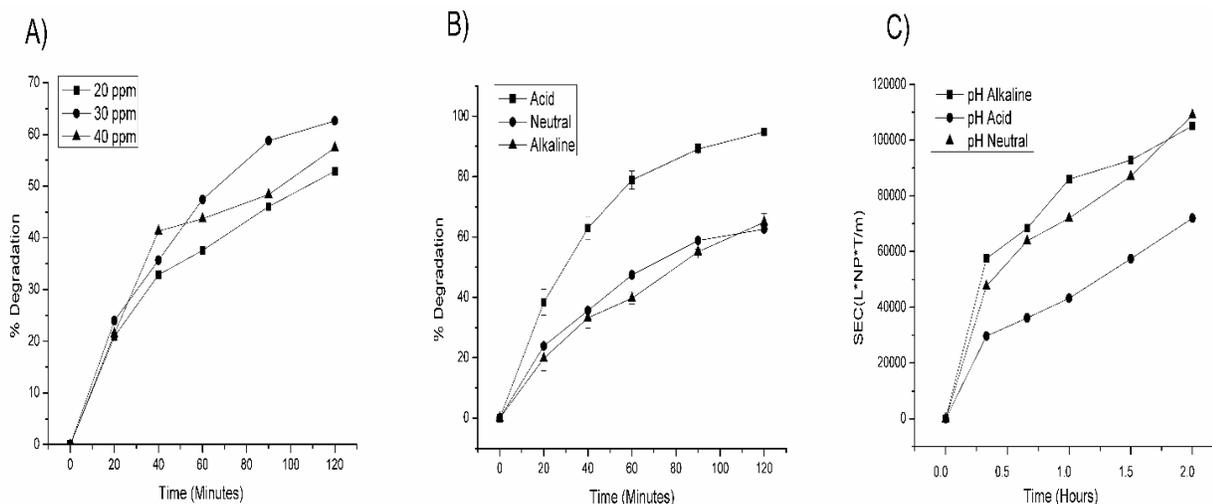


Figura 9: Fotodegradación de nitrobenzeno

Figura 9: Porcentaje de fotodegradación de NB por nanopartículas de ZnO_2 a diferentes concentraciones de fotocatalizador (A), (B) valor de pH inicial diferente con 30 ppm de fotocatalizador y (C) consumo de energía específica para cada reacción a diferentes valores de pH.

se mejora la disponibilidad de contacto con la superficie $\text{OH} \cdot$ generada (ecuaciones 3 y 5) y incrementa el porcentaje de degradación. Además, a un pH 2 las nanopartículas de ZnO_2 liberan los iones O_2^- [138] [139], el anión radical superóxido recién formado reacciona con el agua para generar aniones de peróxido de hidrógeno y el incremento del número de radicales hidroxilo aumenta el rendimiento de la reacción [140].

Con frecuencia, tanto en la literatura como en los estándares internacionales, la SEC se utiliza como un indicador de rendimiento energético para evaluar o medir el rendimiento de la eficiencia energética [141]. La figura 9 C muestra la eficiencia energética del efecto del pH sobre la actividad fotocatalítica, a los parámetros óptimos (pH 2 y 30 ppm de ZnO_2) y después de 120 minutos de tratamiento, el 97,7% de NB se degradó con una SEC correspondiente de aproximadamente 60 000 kWh/kg.

Nuestras nanopartículas de actividad fotocatalítica en comparación con los fotocatalizadores informados (Tabla 3) para la degradación de NB, tuvieron un alto porcentaje de remoción del 97.7%. Como se muestra en la tabla 3, nuestro porcentaje de eliminación (97.7%) se logra en la mitad o incluso, en una cuarta parte del tiempo (2 horas) en comparación con la degradación obtenida por: nanotubos de TiO_2 (50 mg) [142], $\text{SrFeO}_{3-\delta}$ (1,000 ppm) [143] TiO (0.3 % w/v) [49] y TiO_2 (50 mg) [35] que eliminó el NB en solución en 100%, 99%, 98.5% y 98% en 4, 6, 4, 8 horas respectivamente. Sin embargo, G-ZnO-Au NC [144] y (0.50%) TiO_2 dopado con Zn [100] tuvieron un porcentaje de degradación de 97.8 % y 97 % en 2.3 y 2 horas respectivamente, con resultados muy similares a los de nuestras nanopartículas sintetizadas. En contraste, hemos sintetizado nanopartículas de ZnO_2 mediante un método fácil, capaz de actuar como un fotocatalizador para la degradación de NB mejor o como el catalizador publicado en la literatura.

Tabla 4: Catalizadores

Tabla 4: Comparación de la actividad fotocatalítica de ZnO ₂ con los diversos catalizadores informados para la degradación de NB							
Material	[Material]	[NB]	Tiempo (hora)	Tipo de irradiación	NB (%) degradación	Principales intermediarios	Referencia
TiO₂ Nanotubes	50 mg/50 ml	40ppm	4	Energía solar	100.00%	No reportado	[69]
SrFeO_{3-δ}	1000 ppm	50 ppm	6	125 W, Lámpara de vapor de mercurio	99.00%	No reportado	[70]
TiO^{**}	0.3 % w/v	300 ppm	4	Energía solar	98.50%	3-nitrofenol y 4-nitrofenol	[71]
TiO₂	50 mg	50 ppm	8	125-W, Lámpara de vapor de mercurio	98%	No reportado	[10]
G-ZnO-Au NCs	4 ppm	5 mM	2.3	500 W, < 420 nm	97.80%	Anilina	[72]
(0.50%) Zn doped TiO₂		15 ppm	2	254 nm	97.00%	No reportado	[30]
GT-1	200ppm	50 ppm	4	200W Lámpara de vapor de mercurio	96%	No reportado	[73]
Ag-h-TiO₂ ***	0.5 g/L	61.5 ppm	3.5	435.8 nm	95.50%	n-butanol, diethyl ether, furano, orthoformic acid, propanol and acetic acid.	[74]
TiFe0.5 ***	4 glass plates	2.51×10 ⁻⁴ M	4	320–500 nm.	88.45%	No report	[22]
ZnO₂* 	30 ppm	15 ppm	2	254 nm	97.8 %	2-NP, 3-NP and 4-NP	Este trabajo

* Ácido ** Alcalino *** Neutro (las reacciones en las que no se especifica el pH, se supone que son una solución acuosa pH neutro). G-ZnO-Au NCs = Graphene-ZnO-Au Nanocomposites GT-1 = Carbono gráfico (1%) - Compuestos de TiO₂
 Ag-h-TiO₂ = Nanoesferas de TiO₂ huecas dopadas con Ag TiFe0.5 = 0.5% en peso de TiO₂ dopado con Fe depositado como película delgada sobre placas de vidrio (área de irradiación de 19.5 cm²) Nitrofenol = NP, 2-nitrofenol = 2-NP, 3-nitrofenol = 3-NP y 4-nitrofenol = 4-NP

9.3.4

Identificación de productos de degradación por espectrometría de masas de alta resolución

Para explorar el mecanismo de la fotodegradación de NB mediante nanopartículas de ZnO_2 , los intermedios formados durante la reacción se identificaron mediante GC-MS, donde 2-nitrofenol (2-NP), 3-nitrofenol (3-NP) y 4-nitrofenol (4-NP) se detectaron los principales intermediarios de nuestra degradación de nitrobenceno, el pico de NB apareció en el cromatograma de GC (cromatografía de gases) para pH 2 figura 10 A), 7 figura 10 B y 10 figura 10 C en un tiempo de retención cercano a 5,9 min, mientras que los picos correspondientes a los intermedios aparecieron en tiempos de retención cercanos a 6,2 min. (mismo tiempo de retención para los tres pH).

En la Figura 11 se muestra el resultado del espectro de masas de los picos mencionados, que se asignaron a NB (A), 2-NP (B), 3-NP (C) y 4-NP (D), respectivamente. La concentración de los intermedios se midió calculando el área bajo la curva a partir de los picos del cromatograma en proporción a la concentración de NB conocida. Los intermedios de reacción detectados para el pH 2 figura 11 A, 7 figura 11 B y 10 figura 11 C fueron 0.51%, 6.3% y 1.2% respectivamente.

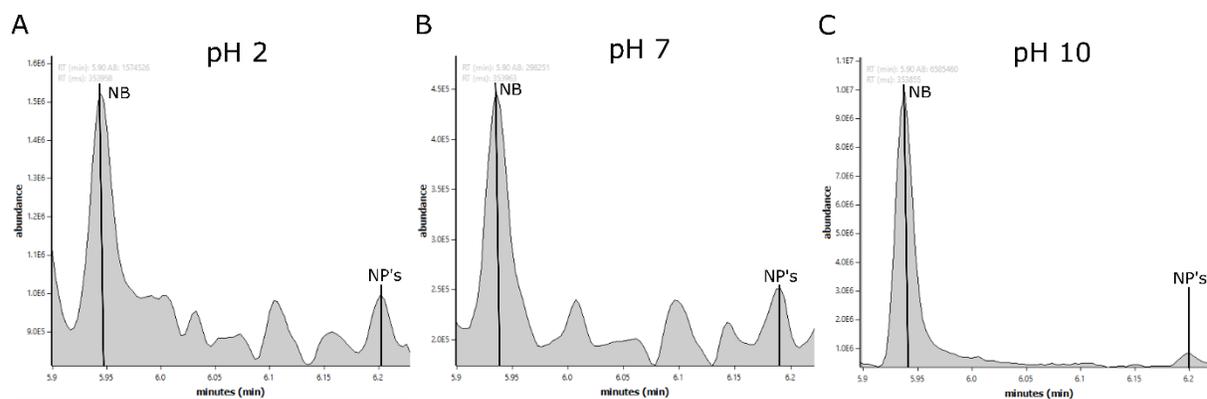


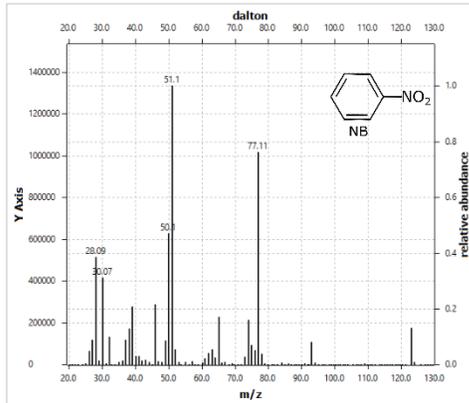
Figura 10: Cromatografía de gases

Figura 10: Cromatogramas de cromatografía de gases (GC) de los extractos de fotocatalisis de nitrobenzeno (NB) para las reacciones a pH: (A) 2, (B) 7 y (C) 10. Dos picos detectados el primero corresponden a NB y el segundo corresponde a intermediarios de reacción, nitrofenoles (NPs).

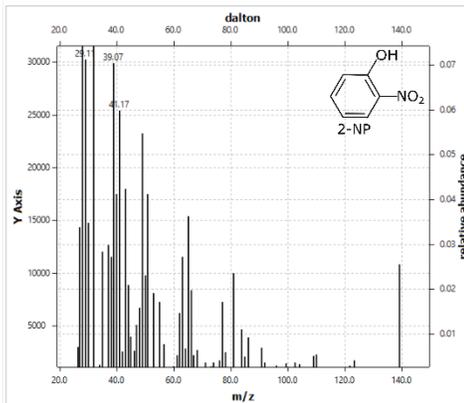
Al presentar estos productos, se propone que el nitrobenzeno se pueda oxidar a través de una vía, los radicales hidroxilo se pueden agregar al anillo aromático del nitrobenzeno y forman radicales hidroxilo ciclohexadienilo [145] [146]. Cuando se añade el radical hidroxilo en la posición orto, meta y para del anillo de nitrobenzeno, la oxidación o desproporción de los radicales hidroxilo ciclohexadienilo podría producir 2-nitrofenol, 3-nitrofenol y 4-nitrofenol, respectivamente. La distribución de los isómeros en la hidroxilación mediada por HO no obedece a la orientación prevista, según las características de desactivación del grupo nitro. [147]

A

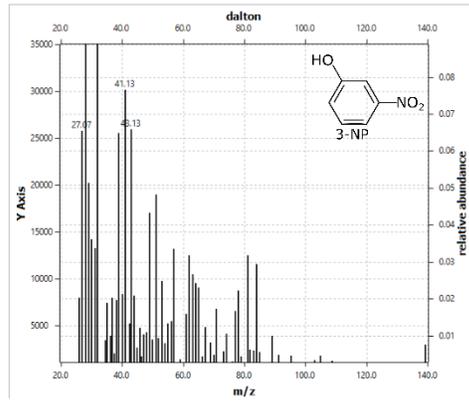
Scan: 984 | RT: 5.945 | RI: 0 | Detector: MS1 | Type: Centroid | Signal: 6856829

**B**

Scan: 1056 | RT: 6.189 | RI: 0 | Detector: MS1 | Type: Centroid | Signal: 1023572

**C**

Scan: 1059 | RT: 6.199 | RI: 0 | Detector: MS1 | Type: Centroid | Signal: 983776

**D**

Scan: 1061 | RT: 6.206 | RI: 0 | Detector: MS1 | Type: Centroid | Signal: 1165410

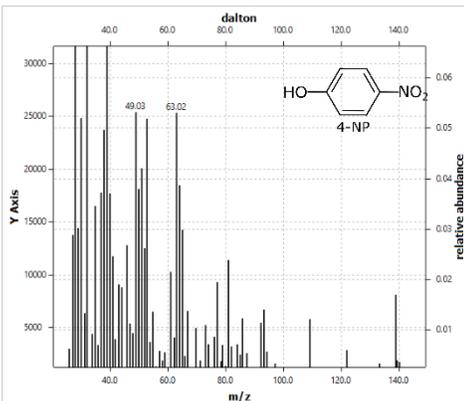


Figura 11: Espectro de masas

Figura 11: Espectro de masas (MS) para las moléculas detectadas de los extractos de fotocatalisis de nitrobenzeno (NB). (A) NB, (B) 2-nitrofenol (2-NP), (C) 3-nitrofenol (3-NP) y (D) 4-nitrofenol (4-NP).

Capítulo 8

9.4 Resultados y discusiones “Interacción nanopartícula- proteína recombinante map3773c”

9.4.1 Unión Nanopartícula Histidina

La unión química de las proteínas en los metales se puede modelar mediante el estudio de las interacciones de los aminoácidos individuales con las superficies. Debido a su estructura relativamente simple en comparación con los polipéptidos y proteínas, y como son bloques de construcción en los últimos, los aminoácidos pueden aportar información básica sobre la adsorción de proteínas en una superficie metálica. El estudio del aminoácido simple puede ayudar en la comprensión de sistemas más complejos, donde la conformación en el estado adsorbido da como resultado todas las interacciones individuales entre los aminoácidos y la superficie, y entre los aminoácidos [148]

9.4.1.1 FT-IR

En la figura 3 A se muestra el espectro característico de las nanopartículas de ZnO₂ con las bandas asociadas a vibraciones conocidas: 667 cm⁻¹, 1405 cm⁻¹ y 1535 cm⁻¹. La histidina contiene en su estructura un anillo imidazol (C₃H₄N₂), una amina (NH₂) y un grupo carboxílico (COOH). En el FT-IR tienen bandas de absorción que corresponden a las vibraciones de 1600, 1510, 1441, 1408, y 1328 cm⁻¹ para la amina y el grupo carboxílico con diferentes modos de vibración simétricos y asimétricos de estiramiento y de tijera, y de 1600, 1512, 1346, 1275 y 3000 cm⁻¹ asociados a estiramientos de CH₂ del anillo de imidazol en su estado de cristal [86] [149]

En la figura 11 se puede observar el espectro de la histidina a pH 11 (línea verde) y el espectro de las nanopartículas –Histidina (Np-His) (Linea Roja) donde se observan bandas asociadas a nanopartículas de ZnO₂ con un desplazamiento de los picos de la nanopartícula 1405 y 1535 hacia el rango de mayor energía y en donde se encuentra las vibraciones características

de enlace asociadas a CH_2 [150] que se le atribuyen a la histidina. En base al desplazamiento observado generalmente apunta a un mecanismo de unión bidentado [151] Sin embargo se puede observar la desaparición de banda de ciertos modos de vibración de la histidina (Tabla 4) el modo de vibración cercano a 3000 cm^{-1} puede desaparecer debido a que esta mu cerca de la banda de estiramiento de O-H [152] La desaparición de la banda 1590 cm^{-1} asociada a COO^- así como una una bandas asociadas a C-N lo cual sugiere un sitio de unión Np-His. [153]

Además en la figura 12 se muestra el espectro de las nanopartículas de peróxido de zinc que estuvieron en contacto con la histidina a un pH de 3 en este espectro también se observa un desplazamiento a una región de enlace asociada a COO^- [150] sin embargo esta ni la señal asociada NH_3^+ (tabla 5) no desaparecen, pero desaparece una señal de C-N del anillo. En conjunto se observa una deformación del pico característico de la nanopartículas de ZnO_2 que muestra una unión Np-His [154] esto nos lleva a la conclusión de que existe una adsorción por C-N y un aporte iónico debido a que la superficie es ligeramente negativa. Estas observaciones confirman la presencia del agente de cobertura en los nanocristales de ZnO_2 . [155]. En la figura 12 el espectro de la NP-His pH 7 se muestra que solo aparece una señal muy baja de la vibración ZnO_2 y una señal muy intensa de del anillo de imidazol lo cual concluimos que la nanopartícula está siendo totalmente recubierta por la histidina solo dejando expuesto el anillo de la histidina. En los tres casos se observa un desplazamiento de las bandas características de las nanopartículas lo cual muestra una unión exitosa en todos los pH. [152]

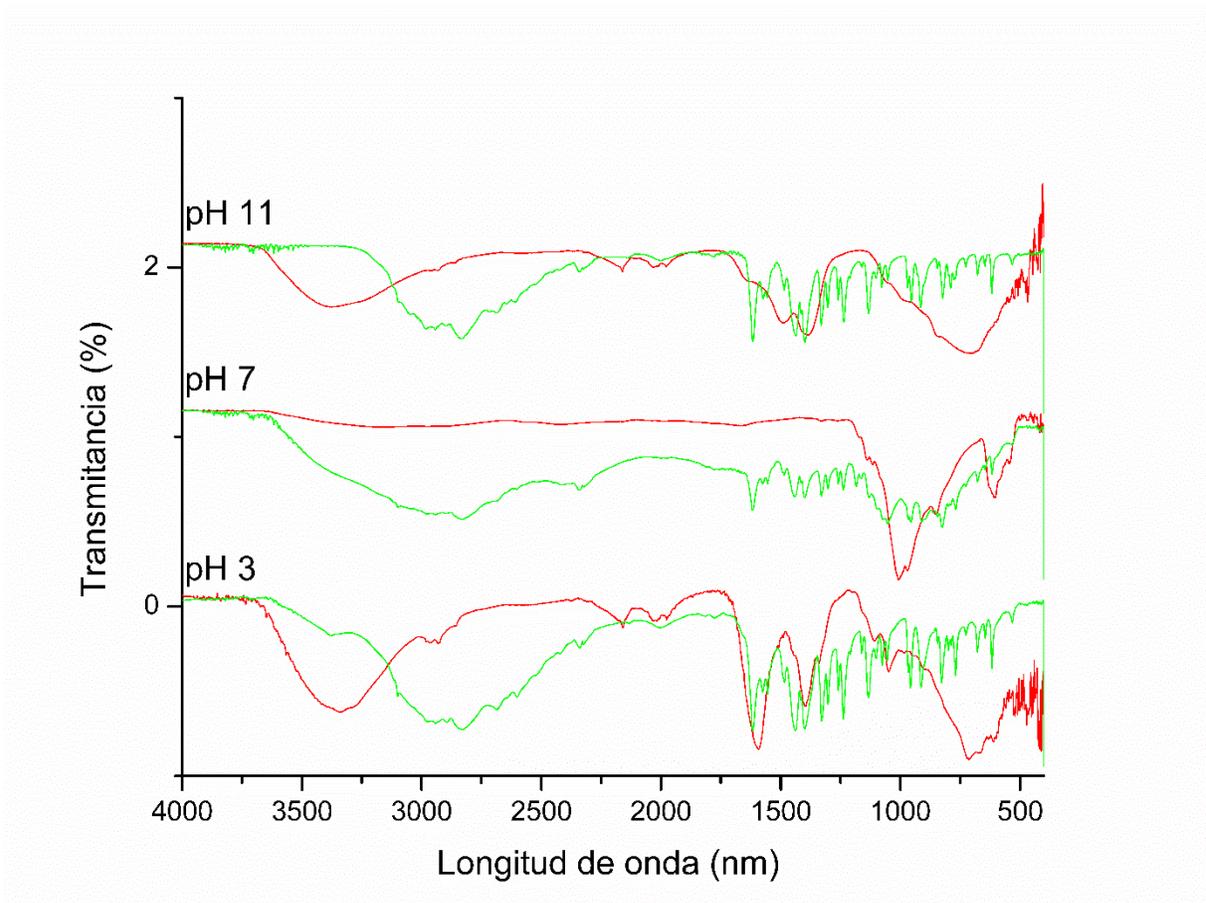


Figura 12: FT-IR Nanopartícula-Histidina

Figura 12: Muestra la comparación de los espectros de histidina (línea verde) y el complejo Nanopartícula histidina (línea roja) a distintos pH.

Tabla 5: FT-IR Histidina/Complejo

Tabla 5: Frecuencias de absorción de infrarrojo observadas de en histidina y el complejo Np-His a diferentes pH							
pH 11		pH 7		pH 3		Asignación	Referencia
Histidina	Complejo	Histidina	Complejo	Histidina	Complejo		
2800 cm ⁻¹	-	2800 cm ⁻¹	-	2800 cm ⁻¹	2900 cm ⁻¹	CH2 del anillo de imidazol	[149]
-	-	1600 cm ⁻¹	-	1600 cm ⁻¹	1600 cm ⁻¹	δNH3+	[150]
1590 cm ⁻¹	-	-	-	-	-	vas CO2 -	[150]
1430 cm ⁻¹	1440 cm ⁻¹	-	-	1430 cm ⁻¹	-	δCH2	[150]
1400 cm ⁻¹	1400 cm ⁻¹	1400 cm ⁻¹	-	1403 cm ⁻¹	1403 cm ⁻¹	vs CO2 -	[150]
1330 cm ⁻¹	1330 cm ⁻¹	1333 cm ⁻¹	-	1334 cm ⁻¹	1334 cm ⁻¹	CH2	[150]
1300 cm ⁻¹	-	1300 cm ⁻¹	-	1300 cm ⁻¹	-	δCH2/δ=C-H	[150]
1260 cm ⁻¹	-	1260 cm ⁻¹	-	1260 cm ⁻¹	-	v=C-N + δ C-H	[150]
1240 cm ⁻¹	-	1242 cm ⁻¹	-	1243 cm ⁻¹	-	v=C-N + δC-H	[150]
1170 cm ⁻¹	-	1180 cm ⁻¹	-	1164 cm ⁻¹	-	v-C-H (CH2)	[150]
1130 cm ⁻¹	-	1130 cm ⁻¹	1130 cm ⁻¹	1130 cm ⁻¹	-	v=C-N/δ=N-H	[150]
1099 cm ⁻¹	-	1095 cm ⁻¹	1099 cm ⁻¹	1095 cm ⁻¹	1095 cm ⁻¹	v=C-N/δ=C-H(Npi)	[150]
1080 cm ⁻¹	-	1075 cm ⁻¹	-	1075 cm ⁻¹	-	v=C-N/δ=C-H(Npi)	[150]
1049 cm ⁻¹	-	1050 cm ⁻¹	-	1050 cm ⁻¹	1050 cm ⁻¹	vC-N side chain	[150]
973 cm ⁻¹	973 cm ⁻¹	970 cm ⁻¹	970 cm ⁻¹	973 cm ⁻¹	-	v=C-N/δ ring	[150]
850 cm ⁻¹	850 cm ⁻¹	848 cm ⁻¹	848 cm ⁻¹	-	-	δ NH3+	[150]
825 cm ⁻¹	825 cm ⁻¹	825 cm ⁻¹	-	825 cm ⁻¹	825 cm ⁻¹	Modo de vibración de anillo	[150]

9.4.1.2 Uv-Vis

Las soluciones muestra se elaboraron colocando 10 mg de nanopartículas modificando las concentraciones de histidina y se colocaron en sus soluciones amortiguadoras correspondientes figura 13. La concentración de histidina de cada solución de muestra y la eficiencia de captura de las nanopartículas calcularon midiendo la reducción en el pico UV máximo de la solución sobrenadante y utilizando las curvas de calibración presentadas en la figura 14 , que muestra un buen comportamiento lineal. Correlación ($R^2 = 0.999$) en el caso de las tres curvas de calibración.



Figura 13: Nanopartícula-Histidina

Figura 13: Se muestra soluciones de nanopartículas de peróxido de zinc con una concentración de histidina conocida

No obstante esto no fue posible debido a que la absorción supera las concentraciones medidas en las curvas de calibración, por lo tanto se puede apreciar un efecto hipercromico

[156]

Como se puede apreciar en la figura 14 un aumento de absorbancia respecto a la absorbancia inicial.

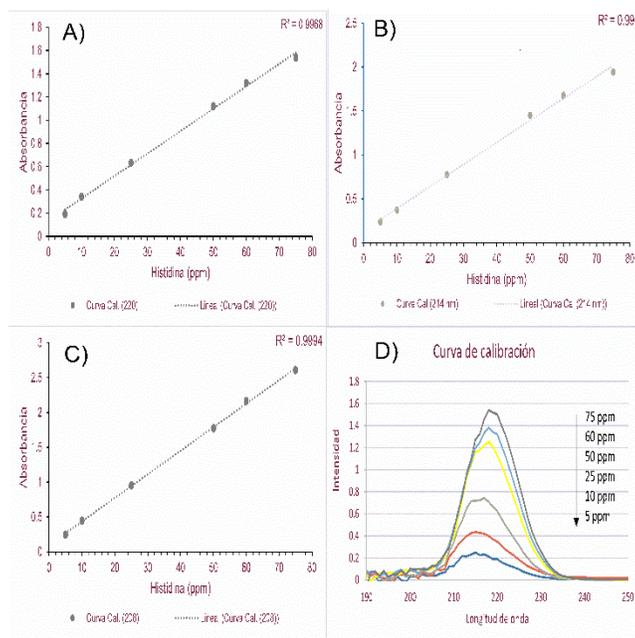


Figura 14: Curvas de calibración de histidina.

Figura 14: La figura A, B Y C muestran la curva de calibración de histidina para pH3 pH7 y pH11 respectivamente la figura D muestra el espectro Uv-Vis de la curva de histidina.

Este efecto es común cuando existe un tipo de interacción ya sea electrostática o de otro tipo entre nanopartículas y moléculas biológicas. [157] [158] En la figura 15 en los tres casos se puede observar un desplazamiento de longitud de onda de absorción lo que se puede deber a la agregación de nanopartículas, esta agregación puede deberse al acomplejamiento entre nanopartícula histidinas [159], estos desplazamientos pueden estar influenciados por el cambio de pH a que las moléculas se pueden encontrar protonadas y esto puede aumentar este tipo de interacciones, [160] sin embargo este tipo de desplazamiento no es muy notable en todas las concentraciones de histidina esto puede deberse a que este tipo de complejos tienden a formarse por el anillo de la histidina [161] o que no sufren ningún cambio estructural [162].

En la figura 15 B se observa que a mayor concentración dio como resultado una disminución en I_{max} y la aparición de un hombro a aproximadamente 280 nm lo cual se puede especular

que se está dando una formación de complejos de aminoácidos entre la nanopartícula y la histidina. [163]

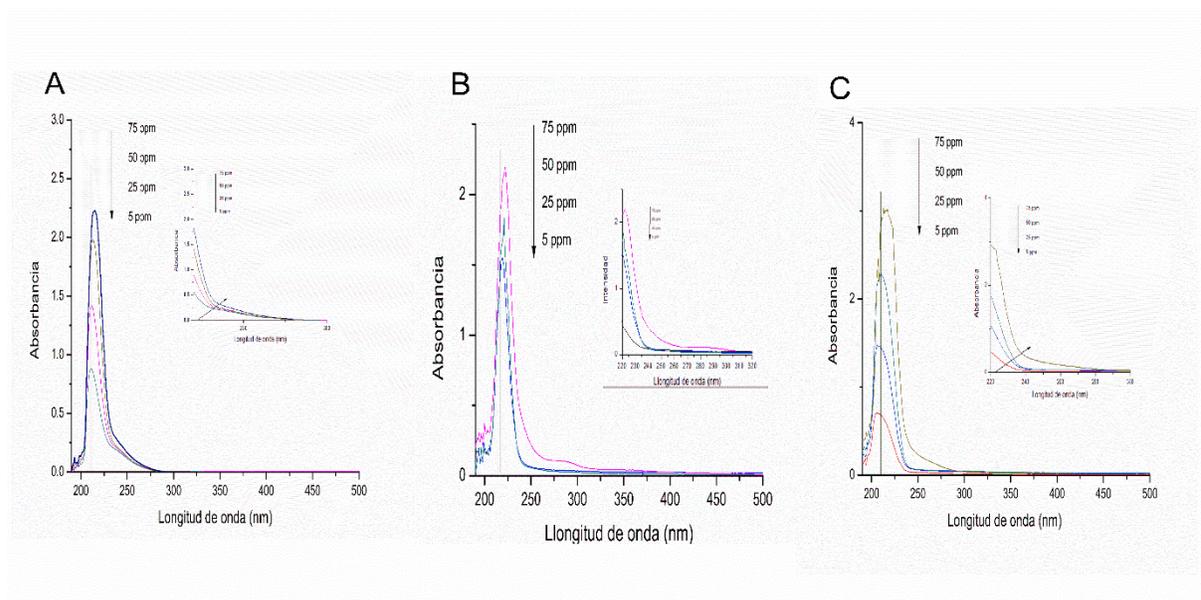


Figura 15: Uv-Vis nanopartícula- Histidina

La figura 15 muestra espectros Uv-Vis de las soluciones Nanopartícula-histidina a diferente pH 3, 7 y 11 (A, B y C)

9.5 Purificación de MAP 3773c

Para poder estudiar a la proteína MAP3773c es conveniente que esta se encuentre de forma soluble y sin ningún cambio conformacional [164] sin embargo en la figura 15 podemos observar el extracto que procede de la cepa de E-coli transformada, en este se puede observar que los niveles de sobreexpresión son muy bajos, por lo cual será muy complicado la purificación de esta proteína por lo que en el primer gel se pretende observar si se forma la corona de proteínas en la nanopartícula.

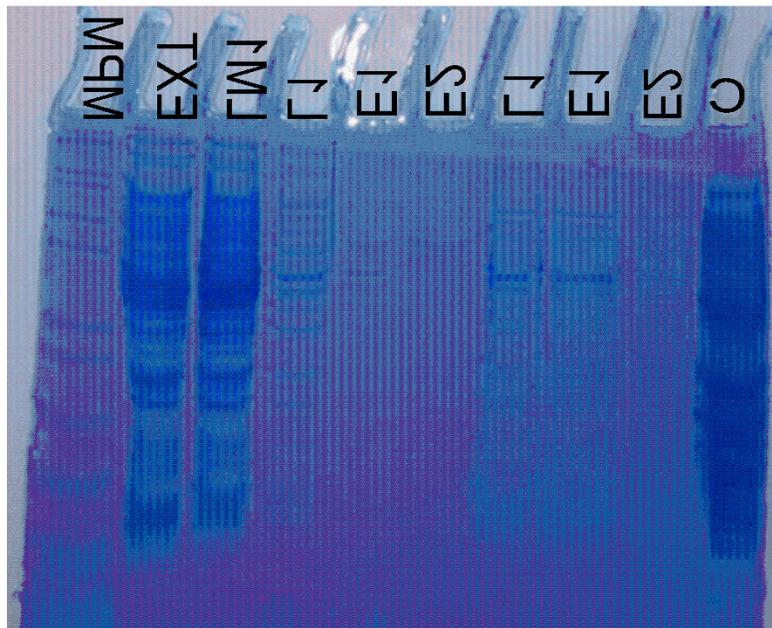
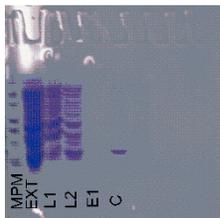


Figura 16: SDS-PAGE

Análisis SDS-PAGE de muestras de proteínas eluidas con dos concentraciones de sal. El carril 1 es un marcador de bajo peso molecular (MARK 12), el carril 2 representa extracto crudo; los carriles 3 (L1) representan un lavado con Tris Buffer pH 8 el carril 4 y 5 representan (E1 Y E2) representan eluciones a diferentes tiempos con Tris buffer pH 8 500 mM Imidazol los carriles 6,7 y 8 representan el lavado y las eluciones que se sometieron a un proceso de precipitación mientras que el carril 9 representan la formación de la corona.

En la figura 16 se muestra un gel de electroforesis SDS-PAGE donde se muestra en el carril 9 pudieran ser las proteínas formadas por la corona dura ya que estas son las proteínas que tienen más afinidad y las que tienen mayor grado de complejidad de deshacer la interacción [165] ya que esta elución se obtuvo mediante condiciones extremas de separación, es por eso que conforman las proteínas con mayor afinidad hacia la nanopartícula .

Sin embargo en la corona se observa que está formada por proteínas de varios pesos moleculares, por lo que se pretende mejorar los lavados y las eluciones agregando agentes con mayor afinidad hacia la nanopartícula, en la figura 17 se puede observar que en la elución eluye la proteína esperada, sin embargo se puede observar que se eluye mas proteínas de diferentes pesos esto puede ser la misma proteína pero con diferente conformación, esto puede deberse al tiempo de exposición de la proteína con la nanopartícula [166], sin embargo se observa que los carriles de los lavado no se observan bandas, y es por eso que se pretende mejorar los lavados, para lograr eluir las proteínas menos específicas.



Capítulo 9

10.0 Conclusiones

Con el método utilizado (Sol-gel asistido por ultrasonido) es posible sintetizar nanopartículas de ZnO₂ con 100 nm, compuesta de nano cristales altamente cristalinos de ~7 nm con bandgap de 3.7 eV y carga superficial de cero a dos pHs diferentes (IEP pH 7-8 y PZC 7.5-8). Estas características sugieren una posible aplicación como fotocatalizadores y/o adsorbentes.

Las nanopartículas semiconductoras de ZnO₂ actúan como fotocatalizador para la degradación de 97.7 % de NB en solución a 30 ppm y pH 2 con luz UV. Sin obtener algún producto obvio de degradación lo cual sugiere una mineralización de NB.

Las nanopartículas a pH 3, 7 y 11 pueden adsorber histidina, siendo totalmente recubiertas a pH 7. Las nanopartículas tienen potencial como agente de purificación para proteínas con etiqueta 6His y/o alto porcentaje de histidina con oportunidad de mejora las condiciones de purificación.

Referencias

- [1] Manning, E. J., & Collins, M. T. (2001). *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis: pathogen, pathogenesis and diagnosis*. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 20(1), 133-150.
- [2] Hermon-Taylor, J., Bull, T. J., Sheridan, J. M., Cheng, J., Stellakis, M. L., & Sumar, N. (2000). *Causation of Crohn's disease by Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 14(6), 521-539.
- [3] Greenstein, R. J. (2003). *Is Crohn's disease caused by a mycobacterium? Comparisons with leprosy, tuberculosis, and Johne's disease*. *The Lancet infectious diseases*, 3(8), 507-514..
- [4] Harris, N. B., & Barletta, R. G. (2001). *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in veterinary medicine*. *Clinical microbiology reviews*, 14(3), 489-512..
- [5] Clarke CJ: *The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species*. *J Comp Pathol* 1997, 116: 217-261..
- [6] Eckelt, Elke, et al. "Identification of a lineage specific zinc responsive genomic island in *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis*." *BMC genomics* 15.1 (2014): 1076..
- [7] Ibarra. German. "Self regulation of the MAP3773c gene of of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*." (2016)..
- [8] Sanchez, Bertha Landeros. "MAP3773c of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* has a iron regulatory activity." (2016)..
- [9] Fillat, M. F. (2014). *The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: diversity and versatility of key transcriptional regulators*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 546, 41-52..

- [10] Pinochet-Barros, A., & Helmann, J. D. (2017). *Redox Sensing by Fe²⁺ in Bacterial Fur Family Metalloregulators. Antioxidants & Redox Signaling.*
- [11] Guerrero-Olazarán, M., Cab-Barrera, E. L., Galán-Wong, L. J., & Viader-Salvadó, J. M. (2004). *Biología de Proteínas Recombinantes para la aplicación en acuicultura. Avances en Nutrición Acuicola VII.* , Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuicola, 16-19..
- [12] Geisse, S., & Fux, C. (2009). *Recombinant protein production by transient gene transfer into Mammalian cells. In Methods in enzymology (Vol. 463, pp. 223-238). Academic Press.*
- [13] Ahmed, H. (2017). *Principles and reactions of protein extraction, purification, and characterization. CRC press.*
- [14] González, A., & Fillat, M. F. (2018). *Aspectos metodológicos de la expresión de proteínas recombinantes en Escherichia coli. Revista de Educación Bioquímica, 37(1), 14-27.*
- [15] Rosenberg, I. M. (2013). *Protein analysis and purification: benchtop techniques. Springer Science & Business Media.*
- [16] Ladisch, M. R. (1990). *Protein purification: from molecular mechanisms to large-scale processes (Vol. 427). An American Chemical Society Publication.* .
- [17] Bonner, P. (2007). *Protein purification. Taylor & Francis.*
- [18] Ferrer-Miralles, N., Saccardo, P., Corchero, J. L., Xu, Z., & García-Fruitós, E. (2015). *General introduction: recombinant protein production and purification of insoluble proteins. In Insoluble Proteins (pp. 1-24). Humana Press, New York, NY.*
- [19] Ramsden, J. (2009). *Essentials of nanotechnology. BookBoon.*
- [20] Kumar, N., & Kumbhat, S. (2016). *Essentials in Nanoscience and Nanotechnology. John Wiley & Sons.*
- [21] Do Carmo, D. R., Fernandes, D. S., Cumba, L. R., de Souza Magossi, M., & dos Santos, V. S. (2016). *Solvent mixture effect in the zinc hexacyanoferrate (III) nanoparticles: Synthesis, characterization and voltammetric application. Materials Research Bulletin.*
- [22] Salari, Z., Ameri, A., Forootanfar, H., Adeli-Sardou, M., Jafari, M., Mehrabani, M., & Shakibaie, M. (2017). *Microwave-assisted biosynthesis of zinc nanoparticles and their cytotoxic and antioxidant activity.*, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 39, 116-123.*

- [23] Schmid, G. (Ed.). (2011). *Nanoparticles: from theory to application*. John Wiley & Sons..
- [24] de Mello Donegá, C. (Ed.). (2014). *Nanoparticles: workhorses of nanoscience*. Springer..
- [25] Quirke, N. (2005). *Adsorption and Transport at the Nanoscale*. CRC Press..
- [26] Jayadevan, K. P., & Tseng, T. Y. (2005). *Oxide nanoparticles*. *ChemInform*, 36(12), no-no..
- [27] Del Pino, P., Pelaz, B., Zhang, Q., Maffre, P., Nienhaus, G. U., & Parak, W. J. (2014). *Protein corona formation around nanoparticles—from the past to the future*. *Materials Horizons*, 1(3), 301-313..
- [28] Lynch, I., & Dawson, K. A. (2008). *Protein-nanoparticle interactions*. *Nano today*, 3(1-2), 40-47..
- [29] Van Hong Nguyen, B. J. L. (2017). *Protein corona: a new approach for nanomedicine design*. *International journal of nanomedicine*, 12, 3137..
- [30] Nierenberg, D., Khaled, A. R., & Flores, O. (2018). *Formation of a protein corona influences the biological identity of nanomaterials*. *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy*..
- [31] Del Pino, P., Pelaz, B., Zhang, Q., Maffre, P., Nienhaus, G. U., & Parak, W. J. (2014). *Protein corona formation around nanoparticles—from the past to the future*. *Materials Horizons*, 1(3), 301-313..
- [32] Candal, R., Bilmes, S. A., & Blesa, M. A. (2001). *Semiconductores con actividad fotocatalítica. Eliminación de Contaminantes por Fotocatálisis Heterogénea*. Editor: Miguel Blesa, Red CYTED VIII-G, 79-101..
- [33] Astruc, D. (Ed.). (2008). *Nanoparticles and catalysis*. John Wiley & Sons..
- [34] Chong, H., Li, P., Xiang, J., Fu, F., Zhang, D., Ran, X., & Zhu, M. (2013). *Design of an ultrasmall Au nanocluster—CeO₂ mesoporous nanocomposite catalyst for nitrobenzene reduction*. *Nanoscale*, 5(16), 7622-7628...
- [35] Tayade, R. J., Kulkarni, R. G., & Jasra, R. V. (2006). *Photocatalytic degradation of aqueous nitrobenzene by nanocrystalline TiO₂*. *Industrial & engineering chemistry research*, 45(3), 922-927.
- [36] Beauchamp, R. O., Irons, R. D., Rickert, D. E., Couch, D. B., Hamm, T. E., & Lyon, J. P. (1982). *A critical review of the literature on nitrobenzene toxicity*. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 11(1), 33-84.

- [37] Katritzky, A. R., Oliferenko, P., Oliferenko, A., Lomaka, A., & Karelson, M. (2003). Nitrobenzene toxicity: QSAR correlations and mechanistic interpretations. *Journal of physical organic chemistry*, 16(10), 811-817.
- [38] Harrison, M. R. (1977). Toxic methaemoglobinaemia: a case of acute nitrobenzene and aniline poisoning treated by exchange transfusion. *Anaesthesia*, 32(3), 270-272.
- [39] Mu, Y., Yu, H. Q., Zheng, J. C., Zhang, S. J., & Sheng, G. P. (2004). Reductive degradation of nitrobenzene in aqueous solution by zero-valent iron. *Chemosphere*, 54(7), 789-794.
- [40] Wang, C., Feng, Y., Zhao, S., & Li, B. L. (2012). A dynamic contaminant fate model of organic compound: a case study of Nitrobenzene pollution in Songhua River, China. *Chemosphere*, 88(1), 69-76.
- [41] Elnashaie, S. S. E., Danafar, F., & Abashar, M. E. E. (2018). Maximum Production Minimum Pollution (MPMP), Necessary but not Sufficient for Sustainability. *European Journal of Sustainable Development Research*, 2(4), 41.
- [42] Zhao, L., Lu, Z., Tan, S., Ciren, J., & Tan, C. (2018). Effects of glucose and starch on the toxicity of nitrobenzene to plants and microbes in constructed wetlands. *Science of The Total Environment*.
- [43] Cai, Z., Fu, J., Du, P., Zhao, X., Hao, X., Liu, W., & Zhao, D. (2018). Reduction of nitrobenzene in aqueous and soil phases using carboxymethyl cellulose stabilized zero-valent iron nanoparticles. *Chemical Engineering Journal*, 332, 227-236.
- [44] Cao, L., Zhang, C., Zou, S., Zhu, G., Li, N., Zhang, Y., & Rittmann, B. E. (2018). Simultaneous anaerobic and aerobic transformations of nitrobenzene. *Journal of environmental management*, 226, 264-269.
- [45] Li, Y. P., Cao, H. B., Liu, C. M., & Zhang, Y. (2007). Electrochemical reduction of nitrobenzene at carbon nanotube electrode. *Journal of hazardous materials*, 148(1-2), 158-163..
- [46] Wolanov, Y., Prihodchenko, P. V., Medvedev, A. G., Pedahzur, R., & Lev, O. (2013). Zinc dioxide nanoparticulates: a hydrogen peroxide source at moderate pH. *Environmental science & technology*, 47(15), 8769-8774.
- [47] Rodríguez, M., Kirchner, A., Contreras, S., Chamarro, E., & Esplugas, S. (2000). Influence of H₂O₂ and Fe (III) in the photodegradation of nitrobenzene. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 133(1-2), 123-127.

- [48] Contreras, S., Rodriguez, M., Chamarro, E., Esplugas, S., & Casado, J. (2001). Oxidation of nitrobenzene by O₃/UV: the influence of H₂O₂ and Fe (III). Experiences in a pilot plant. *Water science and technology*, 44(5), 39-46..
- [49] Bhatkhande, D. S., Pangarkar, V. G., & Beenackers, A. A. (2003). Photocatalytic degradation of nitrobenzene using titanium dioxide and concentrated solar radiation: chemical effects and scaleup. *Water Research*, 37(6), 1223-1230..
- [50] Crişan, M., Mardare, D., Ianculescu, A., Drăgan, N., Niţoi, I., Crişan, D., ... & Dobromir, M. (2018). Iron doped TiO₂ films and their photoactivity in nitrobenzene removal from water. *Applied Surface Science*.
- [51] Ayati, A., Tanhaei, B., Bamoharram, F. F., Ahmadpour, A., Maydannik, P., & Sillanpää, M. (2016). Photocatalytic degradation of nitrobenzene by gold nanoparticles decorated polyoxometalate immobilized TiO₂ nanotubes., *Separation and Purification Technology*, 171, 62-68.
- [52] Cropek, D., Kemme, P. A., Makarova, O. V., Chen, L. X., & Rajh, T. (2008). Selective photocatalytic decomposition of nitrobenzene using surface modified TiO₂ nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C*, 112(22), 8311-8318.
- [53] Lee, K. M., Lai, C. W., Ngai, K. S., & Juan, J. C. (2016). Recent developments of zinc oxide based photocatalyst in water treatment technology: a review. *Water research*, 88, 428-448.
- [54] Sohail, A., Faraz, M., Arif, H., Bhat, S. A., Siddiqui, A. A., & Bano, B. (2017). Deciphering the interaction of bovine heart cystatin with ZnO nanoparticles: Spectroscopic and thermodynamic approach, *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 1056-1063..
- [55] Mirzaei, H., & Darroudi, M. (2017). Zinc oxide nanoparticles: Biological synthesis and biomedical applications. *Ceramics International*, 43(1), 907-914..
- [56] Rasouli, N., Movahedi, M., & Doudi, M. (2017). Synthesis and characterization of inorganic mixed metal oxide nanoparticles derived from Zn–Al layered double hydroxide and their antibacterial activity. *Surfaces and Interfaces*, 6110-115 .
- [57] Safeera, T. A., & Anila, E. I. (2017). Wet chemical synthesis of chitosan capped ZnO: Na nanoparticles for luminescence applications. *International Journal of Biological Macromolecules*..
- [58] Lee, K. M., Lai, C. W., Ngai, K. S., & Juan, J. C. (2016). Recent developments of zinc oxide based photocatalyst in water treatment technology: a review. *Water research*, 88, 428-448...

- [59] Chen, W., Lu, Y. H., Wang, M., Kroner, L., Paul, H., Fecht, H. J., ... & Kaiser, U. (2009). Synthesis, thermal stability and properties of ZnO₂ nanoparticles. *The journal of physical chemistry C*, 113(4), 1320-1324...
- [60] Hsu, C. C., & Wu, N. L. (2005). Synthesis and photocatalytic activity of ZnO/ZnO₂ composite. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 172(3), 269-274.
- [61] Naskar, A., Khan, H., Bera, S., & Jana, S. (2017). Soft chemical synthesis, characterization and interaction of ZnO graphene nanocomposite with bovine serum albumin protein. *Journal of Molecular Liquids*, 237, 113-119..
- [62] Tiwari, S., Vinchurkar, M., Rao, V. R., & Garnier, G. (2017). Zinc oxide nanorods functionalized paper for protein preconcentration in biodiagnostics. *Scientific Reports*, 7..
- [63] Shin, J. H., & Helmann, J. D. (2016). Molecular logic of the Zur-regulated zinc deprivation response in *Bacillus subtilis*. *Nature communications*, 7..
- [64] Pawlik, M. C., Hubert, K., Joseph, B., Claus, H., Schoen, C., & Vogel, U. (2012). The zinc-responsive regulon of *Neisseria meningitidis* comprises 17 genes under control of a Zur element. *Journal of bacteriology*, 194(23), 6594-6603..
- [65] Lee, A. Y., Kao, C. Y., Wang, Y. K., Lin, S. Y., Lai, T. Y., Sheu, B. S., ... & Wu, J. J. (2017). Inactivation of ferric uptake regulator (Fur) attenuates *Helicobacter pylori* J99 motility by disturbing the flagellar motor switch and autoinducer-2, production. *Helicobacter*..
- [66] Lucarelli, D., Russo, S., Garman, E., Milano, A., Meyer-Klaucke, W., & Pohl, E. (2007). Crystal structure and function of the zinc uptake regulator FurB from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry*, 282(13), 9914-9922..
- [67] Napolitano, M., Rubio, M. Á., Santamaría-Gómez, J., Olmedo-Verd, E., Robinson, N. J., & Luque, I. (2012). Characterization of the response to zinc deficiency in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Journal of bacteriology*, 194(10), 2426-2436 .
- [68] Ibarra German M, (2016). Caracterización bioquímica parcial y funcional de la proteína MAP3773c de *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* (Tesis de maestría) Universidad Autónoma De Baja California, Tijuana Baja California Mexico..
- [69] Janson, J. C. (Ed.). (2012). *Protein purification: principles, high resolution methods, and applications* (Vol. 151). John Wiley & Sons.

- [70] Cardoso, V. F., Sebastián, V., Silva, C. J., Botelho, G., & Lanceros-Méndez, S. (2017). Capture and separation of l-histidine through optimized zinc-decorated magnetic silica spheres. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 157, 48-55..
- [71] Z. Liu, M. Li, Z.H. Li, F. Pu, J.S. Ren, X.G. Qu, Easy access to selective binding and recyclable separation of histidine-tagged proteins using Ni²⁺-decorated superparamagnetic nanoparticles, *Nano Res.*, 5 (2012) 450-459..
- [72] Hu, J. S., Ren, L. L., Guo, Y. G., Liang, H. P., Cao, A. M., Wan, L. J., & Bai, C. L. (2005). Mass production and high photocatalytic activity of ZnS nanoporous nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition*, 44(8), 1269-1273..
- [73] Ullah, R., & Dutta, J. (2008). Photocatalytic degradation of organic dyes with manganese-doped ZnO nanoparticles. *Journal of Hazardous materials*, 156(1-3), 194-200..
- [74] Sood, S., Umar, A., Mehta, S. K., & Kansal, S. K. (2015). Highly effective Fe-doped TiO₂ nanoparticles photocatalysts for visible-light driven photocatalytic degradation of toxic organic compounds. *Journal of colloid and interface science*, 450, 213-223..
- [75] Šuligoj, A., Štangar, U. L., Ristić, A., Mazaj, M., Verhovšek, D., & Tušar, N. N. (2016). TiO₂-SiO₂ films from organic-free colloidal TiO₂ anatase nanoparticles as photocatalyst for removal of volatile organic compounds from indoor air, *Applied Catalysis B: Environmental*, 184, 119-131..
- [76] Magudieshwaran, R., Ishii, J., Raja, K. C. N., Terashima, C., Venkatachalam, R., Fujishima, A., & Pitchaimuthu, S. (2019). Green and chemical synthesized CeO₂ nanoparticles for photocatalytic indoor air pollutant degradation. *Materials Letters*, 239, 40-44.
- [77] Ebrahimi, R., Maleki, A., Zandsalimi, Y., Ghanbari, R., Shahmoradi, B., Rezaee, R., ... & Giahi, O. (2019). Photocatalytic degradation of organic dyes using WO₃-doped ZnO nanoparticles fixed on a glass surface in aqueous solution, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 73, 297-305.
- [78] Booker, R. D., & Boysen, E. (2005). *Nanotechnology for dummies*. John Wiley & Sons..
- [79] Edrissi, M., Soleymani, M., & Adinehnia, M. (2011). Synthesis of Silica Nanoparticles by Ultrasound-Assisted Sol-Gel Method: Optimized by Taguchi Robust Design. *Chemical Engineering & Technology*, 34(11), 1813-1819..
- [80] NANOCOMPOSIX. (2012). UV/VIS/IR SPECTROSCOPY ANALYSIS OF NANOPARTICLES. 2018, de NANOCOMPOSIX Sitio web: NANOCOMPOSIX.COM.

- [81] Kumar, C. S. (Ed.). (2013). *UV-VIS and photoluminescence spectroscopy for nanomaterials characterization* (pp. 231-285). Berlin, Heidelberg: Springer..
- [82] Perkampus, H. H. (2013). *UV-VIS Spectroscopy and its Applications*. Springer Science & Business Media..
- [83] Suart, B. (2004). *Infrared spectroscopy: Fundamental and applications*. Google Scholar..
- [84] Katumba, G., Mwakikunga, B. W., & Mothibinyane, T. R. (2008). FTIR and Raman spectroscopy of carbon nanoparticles in SiO₂, ZnO and NiO matrices. *Nanoscale research letters*, 3(11), 421..
- [85] Contreras, H. J., Trujillo, H. A., Arias, G., Pérez, J. L., & Delgado, E. (2010). Espectroscopía ATR-FTIR de celulosa: aspecto instrumental y tratamiento matemático de espectros. *e-Gnosis*, 8..
- [86] Mudunkotuwa, I. A., Al Minshid, A., & Grassian, V. H. (2014). ATR-FTIR spectroscopy as a tool to probe surface adsorption on nanoparticles at the liquid–solid interface in environmentally and biologically relevant media. *Analyst*, 139(5), 870-881..
- [87] Kiefer, J., Grabow, J., Kurland, H. D., & Müller, F. A. (2015). Characterization of nanoparticles by solvent infrared spectroscopy. *Analytical chemistry*, 87(24), 12313-12317..
- [88] Otero, J., & Gutierrez, V. (2014). *Espectroscopía Raman: Fundamento y aplicaciones*. Trabajo (Master en nuevos materiales) Universidad de Edinburgh..
- [89] Ramos, J. C., Luna, A. E. V., & Lima, C. M. O. (2013). Espectroscopia Raman y sus aplicaciones. *Opt. Pura. Apl*, 83-95..
- [90] Cortes Hernández, H. F., & Martínez Yepes, P. *Fundamentos de cristalografía*..
- [91] Gomis Yagües, V. (2008). Tema 6. Espectroscopia de rayos X y electrónica. *Técnicas Instrumentales en el Análisis Industrial*..
- [92] Sands, D. E. (1993). *Introducción a la cristalografía*. Reverté..
- [93] Cullity, B. D., & Stock, S. R. (2014). *Elements of X-ray Diffraction*. Pearson Education..
- [94] Lopez, J. L. M., & López, J. L. R. (2012). *Los materiales nanoestructurados*. FCE-Fondo de Cultura Económica..

- [95] *Bhatia, S. (2016). Nanoparticles types, classification, characterization, fabrication methods and drug delivery applications. In Natural polymer drug delivery systems (pp. 33-93). Springer, Cham.*
- [96] *Abdullaeva, Z. (2017). Nano-and Biomaterials: Compounds, Properties, Characterization, and Applications. John Wiley & Sons..*
- [97] *Mayoral, J. B., Moreno, A. C., & Martínez, E. S. M. (2014). Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas. Latin-American Journal of Physics Education, 8(4), 19..*
- [98] *Yoval, L. S., Palacios, L. M., Soberanis, M. P., & Guzmán, L. O. S. (2000). Potencial zeta como una herramienta para determinar la aglomeración de las partículas en la reducción del volumen del lodo a disponer. Instituto Mexicano de tecnología del Agua, Disponible em www.bvsde.paho.org/bvsaidis/tratagua/mexicona..*
- [99] *Colonia, R., Martínez, V. C., Solís, J. L., & Gómez, M. M. (2013). Síntesis de nanopartículas de ZnO₂ empleando ultrasonido: caracterización estructural y morfológica para aplicaciones bactericidas. Revista de la Sociedad Química del Perú, 79(2), 126-135..*
- [100] *Reynoso-Soto, E. A., Pérez-Sicairos, S., Reyes-Cruzaley, A. P., Castro-Riquelme, C. L., Félix-Navarro, R. M., Paraguay-Delgado, F., ... & Lin-Ho, S. W. (2013)., Photocatalytic degradation of nitrobenzene using nanocrystalline TiO₂ photocatalyst doped with Zn ions. Journal of the Mexican Chemical Society, 57(4), 298-305.*
- [101] *Pérez-Sicairos, S., Corrales-López, K. A., Hernández-Calderón, O. M., Salazar-Gastélum, M. I., & Félix-Navarro, R. M. (2016)., Photochemical degradation of nitrobenzene by S₂O₈²⁻ ions and UV radiation. Revista Internacional de Contaminación Ambiental, 32, 32(2), 227-236...*
- [102] *Carlos, R. (2013). Síntesis y caracterización de nanopartículas de ZnO₂ y su actividad antimicrobiana.; Tesis de Pregrado..*
- [103] *Shah, S. N., Ali, S. I., Ali, S. R., Naeem, M., Bibi, Y., Ali, S. R., ... & Sherwani, S. K. (2016). Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles for antibacterial applications. Journal of Basic and Applied Sciences, 12, 205-210..*
- [104] *Al-Shabib, N. A., Husain, F. M., Ahmed, F., Khan, R. A., Ahmad, I., Alsharaeh, E., ... & Hassan, I. (2016)., Biogenic synthesis of Zinc oxide nanostructures from Nigella sativa seed: prospective role as food packaging material inhibiting broad-spectrum quorum sensing and biofilm. Scientific reports, 6, 36761..*

- [105] Mashrai, A., Khanam, H., & Aljawfi, R. N. (2017). Biological synthesis of ZnO nanoparticles using *C. albicans* and studying their catalytic performance in the synthesis of steroidal pyrazolines. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S1530-S1536..
- [106] Fooladsaz, K., Negahdary, M., Rahimi, G., Habibi-Tamijani, A., Parsania, S., Akbari-dastjerdi, H., ... & Asadi, A. (2012). Dopamine determination with a biosensor based on catalase and modified carbon paste electrode with zinc oxide nanoparticles., *Int. J. Electrochem. Sci*, 7, 9892-9908..
- [107] Arefi, M. R., & Rezaei-Zarchi, S. (2012). Synthesis of zinc oxide nanoparticles and their effect on the compressive strength and setting time of self-compacted concrete paste as cementitious composites. *International journal of molecular sciences*, 13(4), 4340-4350..
- [108] Singla, M. L., & Kumar, M. (2009). Optical characterization of ZnO nanoparticles capped with various surfactants. *Journal of Luminescence*, 129(5), 434-438..
- [109] Verma, S., & Jain, S. L. (2014). Nanosized zinc peroxide (ZnO₂): a novel inorganic oxidant for the oxidation of aromatic alcohols to carbonyl compounds. *Inorganic Chemistry Frontiers*, 1(7), 534-539...
- [110] Chen, W., Lu, Y. H., Wang, M., Kroner, L., Paul, H., Fecht, H. J., ... & Kaiser, U. (2009). Synthesis, thermal stability and properties of ZnO₂ nanoparticles. *The journal of physical chemistry C*, 113(4), 1320-1324..
- [111] Mallika, A. N., RamachandraReddy, A., Sowri Babu, K., & Reddy, K. V. (2014). Synthesis and optical characterization of aluminum doped ZnO nanoparticles. *Ceramics International*, 40(8), 12171-12177..
- [112] Rusdi, R., Rahman, A. A., Mohamed, N. S., Kamarudin, N., & Kamarulzaman, N. (2011). Preparation and band gap energies of ZnO nanotubes, nanorods and spherical nanostructures. *Powder Technology*, 210(1), 18-22..
- [113] Drmosh, Q. (2010). *Synthesis and Characterization of Nano-Structure Metal Oxides and Peroxides Prepared by Laser Ablation in Liquids (Doctoral dissertation, King Fahd University of Petroleum and Minerals)*.
- [114] Malhotra, V. M., Jasty, S., & Mu, R. (1989). FT-IR spectra of water in microporous KBr pellets and water's desorption kinetics. *Applied Spectroscopy*, 43(4), 638-645..

- [115] Escobedo-Morales, A., Esparza, R., García-Ruiz, A., Aguilar, A., Rubio-Rosas, E., & Pérez, R. (2011). Structural and vibrational properties of hydrothermally grown ZnO₂ nanoparticles. *Journal of Crystal Growth*, 316(1), 37-41. .
- [116] Gondal, M. A., Drmosh, Q. A., Yamani, Z. H., & Saleh, T. A. (2009). Synthesis of ZnO₂ nanoparticles by laser ablation in liquid and their annealing transformation into ZnO nanoparticles. *Applied surface science*, 256(1), 298-304.
- [117] Ishioka, K., Kato, K., Ohashi, N., Haneda, H., Kitajima, M., & Petek, H. (2013). The effect of n- and p-type doping on coherent phonons in GaN. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 25(20), 205404..
- [118] Sun, M., Hao, W., Wang, C., & Wang, T. (2007). A simple and green approach for preparation of ZnO₂ and ZnO under sunlight irradiation. *Chemical physics letters*, 443(4-6), 342-346..
- [119] Yang, L. Y., Feng, G. P., & Wang, T. X. (2010). Green synthesis of ZnO₂ nanoparticles from hydrozincite and hydrogen peroxide at room temperature. *Materials Letters*, 64(14), 1647-1649..
- [120] Gonçalves, N. S., Carvalho, J. A., Lima, Z. M., & Sasaki, J. M. (2012). Size-strain study of NiO nanoparticles by X-ray powder diffraction line broadening. *Materials letters*, 72, 36-38..
- [121] Zak, A. K., Majid, W. A., Abrishami, M. E., & Yousefi, R. (2011). X-ray analysis of ZnO nanoparticles by Williamson-Hall and size-strain plot methods. *Solid State Sciences*, 13(1), 251-256..
- [122] Bai, H., & Liu, X. (2010). Green hydrothermal synthesis and photoluminescence property of ZnO₂ nanoparticles. *Materials Letters*, 64(3), 341-343..
- [123] Bai, H., & Liu, X. (2010). Green hydrothermal synthesis and photoluminescence property of ZnO₂ nanoparticles. *Materials Letters*, 64(3), 341-343..
- [124] Fatehah, M. O., Aziz, H. A., & Stoll, S. (2014). Stability of ZnO nanoparticles in solution. Influence of pH, dissolution, aggregation and disaggregation effects. *Journal of Colloid Science and Biotechnology*, 3(1), 75-84..
- [125] Omar, F. M., Aziz, H. A., & Stoll, S. (2014). Aggregation and disaggregation of ZnO nanoparticles: influence of pH and adsorption of Suwannee River humic acid. *Science of the total environment*, 468, 195-201..

- [126] Berg, J. M., Romoser, A., Banerjee, N., Zebda, R., & Sayes, C. M. (2009). *The relationship between pH and zeta potential of ~ 30 nm metal oxide nanoparticle suspensions relevant to in vitro toxicological evaluations*. *Nanotoxicology*, 3(4), 276-283.
- [127] Zhang, Q., Xu, M., You, B., Zhang, Q., Yuan, H., & Ostrikov, K. (2018). *Oxygen vacancy-mediated ZnO nanoparticle photocatalyst for degradation of methylene blue*. *Applied Sciences*, 8(3), 353.
- [128] Moon, D. R., Ingham, T., Whalley, L. K., Seakins, P. W., Baeza-Romero, M. T., & Heard, D. E. (2019). *Production of HO₂ and OH radicals from near-UV irradiated airborne TiO₂ nanoparticles*. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 21(5), 2325-2336.
- [129] Zent, A. P., Ichimura, A. S., Quinn, R. C., & Harding, H. K. (2008). *The formation and stability of the superoxide radical (O₂⁻) on rock-forming minerals: Band gaps, hydroxylation state, and implications for Mars oxidant chemistry*, *Journal of Geophysical Research: Planets*, 113(E9)...
- [130] Wu, W., Lin, R., Shen, L., Liang, R., Yuan, R., & Wu, L. (2013). *Highly efficient visible-light-induced photocatalytic hydrogenation of nitrobenzene to aniline in water*. *RSC Advances*, 3(27), 10894-10899. .
- [131] Modi, K. B., Natarajan, K., Kathad, C. R., Shah, S. J., Raval, P. Y., Pathak, T. K., ... & Tayade, R. J. (2016, May). *Synthesis and characterization of ferrite-semiconductor nano composite for photocatalytic degradation of aqueous nitrobenzene solution.*, In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 1728, No. 1, p. 020395). AIP Publishing..
- [132] Shahrezaei, F., Mansouri, Y., Zinatizadeh, A. A. L., & Akhbari, A. (2012). *Photocatalytic degradation of aniline using TiO₂ nanoparticles in a vertical circulating photocatalytic reactor*. *International Journal of Photoenergy*, 2012. ..
- [133] Chen, S., Zhang, H., Yu, X., & Liu, W. (2010). *Photocatalytic reduction of nitrobenzene by titanium dioxide powder*. *Chinese Journal of Chemistry*, 28(1), 21-26...
- [134] Sulkowski, E. (1985). *Purification of proteins by IMAC*. *Trends in Biotechnology*, 3(1), 1-7..
- [135] Chong, M. N., Jin, B., Chow, C. W., & Saint, C. (2010). *Recent developments in photocatalytic water treatment technology: a review*. *Water research*, 44(10), 2997-3027.
- [136] Jeong, S., Lee, H., Park, H., Jeon, K. J., Park, Y. K., & Jung, S. C. (2018). *Rapid photocatalytic degradation of nitrobenzene under the simultaneous illumination of UV and microwave radiation fields with a TiO₂ ball catalyst*. *Catalysis Today*, 307, 65-72..

- [137] ElMetwally, A. E., Eshaq, G., Al-Sabagh, A. M., Yehia, F. Z., Philip, C. A., Moussa, N. A., & ElShafei, G. M. (2019). *Insight into heterogeneous Fenton-sonophotocatalytic degradation of nitrobenzene using metal oxychlorides*, Separation and Purification Technology, 210, 452-462..
- [138] Bergs, C., Simon, P., Prots, Y., & Pich, A. (2016). *Ultrasmall functional ZnO 2 nanoparticles: synthesis, characterization and oxygen release properties*. RSC Advances, 6(88), 84777-84786.
- [139] Bergs, C., Brück, L., Rosencrantz, R. R., Conrads, G., Elling, L., & Pich, A. (2017). *Biofunctionalized zinc peroxide (ZnO 2) nanoparticles as active oxygen sources and antibacterial agents*. RSC Advances, 7(62), 38998-39010.
- [140] Karthik, R., Govindasamy, M., Chen, S. M., Cheng, Y. H., Muthukrishnan, P., Padmavathy, S., & Elangovan, A. (2017). *Biosynthesis of silver nanoparticles by using Camellia japonica leaf extract for the electrocatalytic reduction, of nitrobenzene and photocatalytic degradation of Eosin-Y*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 170, 164-172...
- [141] Lawrence, A., Thollander, P., Andrei, M., & Karlsson, M. (2019). *Specific Energy Consumption/Use (SEC) in Energy Management for Improving Energy Efficiency in Industry: Meaning, Usage and Differences*. Energies, 12(2), 247..
- [142] Tayade, R. J., & Key, D. L. (2010). *Synthesis and characterization of titanium dioxide nanotubes for photocatalytic degradation of aqueous nitrobenzene in the presence of sunlight*. In Materials science forum (Vol. 657, pp. 62-74). Trans Tech Publications..
- [143] Srilakshmi, C., Saraf, R., & Shivakumara, C. (2015). *Effective degradation of aqueous nitrobenzene using the SrFeO₃- δ photocatalyst under UV illumination and its kinetics and mechanistic studies*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 54(32), , 7800-7810.
- [144] Roy, P., Periasamy, A. P., Liang, C. T., & Chang, H. T. (2013). *Synthesis of graphene-ZnO-Au nanocomposites for efficient photocatalytic reduction of nitrobenzene*. Environmental science & technology, 47(12), 6688-6695.
- [145] Bhatia, K. (1975). *Hydroxyl radical induced oxidation of nitrobenzene*. The Journal of Physical Chemistry, 79(10), 1032-1038...
- [146] Eberhardt, M. K., & Yoshida, M. (1973). *Radiation-induced homolytic aromatic substitution. I. Hydroxylation of nitrobenzene, chlorobenzene, and toluene*. The Journal of Physical Chemistry, 77(5), 589-597.

- [147] Zhang, Y., Zhang, K., Dai, C., Zhou, X., & Si, H. (2014). An enhanced Fenton reaction catalyzed by natural heterogeneous pyrite for nitrobenzene degradation in an aqueous solution. *Chemical Engineering Journal*, 244, 438-445.
- [148] Marti, E. M., Methivier, C., Dubot, P., & Pradier, C. M. (2003). Adsorption of (S)-histidine on Cu (110) and oxygen-covered Cu (110), a combined Fourier transform reflection absorption infrared spectroscopy and force field calculation study, *The Journal of Physical Chemistry B*, 107(39), 10785-10792..
- [149] Singh, R. K., Pandey, S., Saxena, R. C., Thakre, G. D., Atray, N., & Ray, S. S. (2015). Derivatizing L-histidine to develop a novel additive for a polyol-based biolubricant. *New Journal of Chemistry*, 39(7), 5354-5359..
- [150] Mesu, J. G., Visser, T., Soulimani, F., & Weckhuysen, B. M. (2005). Infrared and Raman spectroscopic study of pH-induced structural changes of L-histidine in aqueous environment. *Vibrational spectroscopy*, 39(1), 114-125..
- [151] Schwaminger, S. P., Blank-Shim, S. A., Scheifele, I., Fraga-Garcia, P., & Berensmeier, S. (2017). Peptide binding to metal oxide nanoparticles. *Faraday discussions*, 204, 233-250..
- [152] Du, Z., Zhang, S., Zhou, C., Liu, M., & Li, G. (2012). L-histidine functionalized multi-walled carbon nanotubes for on-line affinity separation and purification of immunoglobulin G in serum. *Talanta*, 99, 40-49..
- [153] Torreggiani, A., Bonora, S., & Fini, G. (2000). Raman and IR spectroscopic investigation of zinc (II)-carnosine complexes. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 57(6), 352-364..
- [154] Schwaminger, S. P., García, P. F., Merck, G. K., Bodensteiner, F. A., Heissler, S., Günther, S., & Berensmeier, S. (2015). Nature of interactions of amino acids with bare magnetite nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C*, 119(40), 23032-23041..
- [155] Sreevalsa, V. G., Jeeju, P. P., Augustine, M. S., Anilkumar, K. M., & Jayalekshmi, S. (2013). L-Histidine-modified biocompatible zinc oxide nanocrystals. *Journal of Experimental Nanoscience*, 8(7-8), 937-946..
- [156] S. LIN, «Ultraviolet Spectrophotometry,» *Springer Series in Wood Science*, vol. 1, p. 16, 1992.
- [157] «Thomas, R. K., Sukumaran, S., Prasanth, S., & Sudarsanakumar, C. (2019). Revealing the interaction strategy of Diosmin functionalized gold nanoparticles with ctDNA: Multi-spectroscopic, calorimetric and thermodynamic approach. *Journal of Luminescence*, 205».

- [158] «Pandya, S. R., Patel, S., Bakshi, S., & Singh, M. (2018). In vitro DNA binding, antioxidant, antimicrobial and anticancer assessment of amino acid functionalized magnetic nanoparticles. *Applied Surface Science*, 451, 1-19.».
- [159] «Liu, Z., Xing, Z., Zu, Y., Tan, S., Zhao, L., Zhou, Z., & Sun, T. (2012). Synthesis and characterization of L-histidine capped silver nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*, 32(4), 811-816.».
- [160] «Liu, Z., Zu, Y., Fu, Y., Meng, R., Guo, S., Xing, Z., & Tan, S. (2010). Hydrothermal synthesis of histidine-functionalized single-crystalline gold nanoparticles and their pH-dependent UV absorption characteristic. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*,».
- [161] «Sanader, Ž., Mitrić, R., Bonačić-Koutecký, V., Bellina, B., Antoine, R., & Dugourd, P. (2014). The nature of electronic excitations at the metal–bioorganic interface illustrated on histidine–silver hybrids. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 16(3), 1257.».
- [162] «Khanapurmath, N. I., Chougala, L. S., Kulkarni, M. V., & Kadadevarmath, J. S. (2019). Effect of stereo electronic factors of coumarin derivatives during their interaction with TiO₂ nanoparticles. *Journal of Molecular Liquids*, 291, 111266.».
- [163] «Folmer-Andersen, J. F., Lynch, V. M., & Anslyn, E. V. (2005). “Naked-Eye” Detection of Histidine by Regulation of CuII Coordination Modes. *Chemistry—A European Journal*, 11(18), 5319-5326.».
- [164] «Aubin-Tam, M. E., & Hamad-Schifferli, K. (2008). Structure and function of nanoparticle–protein conjugates. *Biomedical Materials*, 3(3), 034001.».
- [165] «Mao, H., Chen, W., Laurent, S., Thirifays, C., Burtea, C., Rezaee, F., & Mahmoudi, M. (2013). Hard corona composition and cellular toxicities of the graphene sheets. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 109, 212-218.».
- [166] «Kim, J. S., Valencia, C. A., Liu, R., & Lin, W. (2007). Highly-efficient purification of native polyhistidine-tagged proteins by multivalent NTA-modified magnetic nanoparticles. *Bioconjugate chemistry*, 18(2), 333-341.».

