

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

**BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS BIMETÁLICAS:  
Ag/Cu Y DETERMINACIÓN DE SUS PROPIEDADES  
ANTIBACTERIALES Y ANTIFÚNGICAS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIA DE MATERIALES**

**PRESENTA**

Q. FERNANDO LÓPEZ UBALDO

**DIRIGIDA POR:**

DR. RAÚL ALBERTO MORALES LUCKIE.

DR. VÍCTOR SÁNCHEZ MENDIETA.

DR. OSCAR FERNANDO OLEA MEJÍA



TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO; SEPTIEMBRE DE 2023

# ÍNDICE

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO .....	0
ÍNDICE .....	1
ÍNDICE DE FIGURAS .....	5
ÍNDICE DE TABLAS .....	9
ABREVIATURAS .....	10
AGRADECIMIENTOS.....	12
DEDICATORIAS.....	13
ABSTRACT .....	14
RESUMEN.....	15
INTRODUCCIÓN .....	16
PREFACIO .....	18
1. CAPÍTULO I. ANTECEDENTES.....	19
1.1. Nanotecnología.....	19
1.2. Nanomateriales o materiales nanoestructurados .....	20
1.2.1. Nanopartículas metálicas (NpsM) .....	21
1.2.2. Métodos de síntesis de Nps.....	23
1.2.2.1. Métodos físicos .....	24
1.2.2.2. Métodos químicos .....	25
1.2.2.3. Métodos biológicos.....	26
1.3. Química verde.....	26
1.3.1. Bioreducción .....	28
1.4. <i>Ricinus Communis</i> .....	29
1.5. Plata (Ag).....	32
1.5.1. Nps de Ag .....	32
1.6. Cobre (Cu) .....	33
1.6.1. Nps de Cu .....	34
1.7. Nps de Ag y Cu .....	34

1.7.1.	Efecto bactericida de las Nps .....	35
1.7.2.	Propiedades ópticas de NpsM – Resonancia de plasmón superficial (RPS).....	36
1.7.3.	Composición de las Nps bimetálicas y propiedades ópticas .....	38
1.8.	Microorganismos .....	41
1.8.1.	Bacterias.....	42
1.8.2.	Bacterias Gram-positivas .....	42
1.8.3.	Bacterias Gram-negativo .....	42
1.8.4.	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	43
1.8.5.	<i>Escherichia coli</i> .....	44
1.8.6.	<i>Aspergillus niger</i> .....	45
2.	CAPÍTULO II.....	46
2.1.	JUSTIFICACIÓN .....	46
2.2.	HIPÓTESIS.....	46
2.3.	OBJETIVO GENERAL .....	46
2.4.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	46
2.5.	METAS.....	47
3.	CAPÍTULO III. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN .....	48
3.1.	Técnicas espectroscópicas moleculares .....	48
3.1.1.	Espectroscopia ultravioleta-visible (uv-vis).....	48
3.1.2.	Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).....	51
3.2.	Microscopía electrónica.....	54
3.2.1.	Conceptos básicos de microscopía electrónica .....	55
3.2.2.	Microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	56
3.2.3.	Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	57
3.2.4.	Espectroscopia de energía dispersa de rayos X (EDS) .....	60
3.3.	Métodos de prueba a la sensibilidad antimicrobiana .....	61
3.3.1.	Método de difusión: Método del antibiograma disco-placa (Prueba de difusión por disco o halo inhibitorio) .....	61
3.3.2.	Método por dilución: Concentración mínima inhibitoria (CMI).....	62
3.3.2.1.	Concentración mínima Letal (CML).....	64
4.	CAPÍTULO IV. MATERIALES Y MÉTODOS .....	65
4.1.	Materiales .....	65

4.2.	Metodología .....	66
4.3.	Síntesis de Nps bimetálicas .....	66
4.4.	Caracterización Instrumental .....	68
4.5.	Métodos de prueba a la sensibilidad antimicrobiana .....	69
4.5.1.	Método de difusión: KIRBY-BAUER (Prueba de difusión por disco o halo inhibitorio) .....	71
4.5.2.	Microdilución en caldo (CMI) .....	73
4.5.3.	Concentración mínima letal (CML) .....	75
5.	CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	76
5.1.	Determinación de la concentración adecuada del extracto acuoso de <i>Ricinus communis</i> y la relación de volumen precursor:bioreductor. ....	76
5.2.	Espectroscopia ultravioleta-visible.....	76
5.3.	Espectroscopia infrarroja (FTIR). ....	79
5.4.	Microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	81
5.5.	Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	83
5.5.1.	Microanálisis 10:90. ....	83
5.5.2.	Microanálisis 25:75. ....	84
5.5.3.	Microanálisis 50:50. ....	86
5.5.4.	Microanálisis Ag.....	87
5.5.5.	Microanálisis Cu.....	88
5.6.	Pruebas microbiológicas.....	89
5.6.1.	Caracterización de cepas microbianas para las pruebas.....	89
5.6.2.	Prueba de halo de inhibición. ....	91
5.6.3.	Concentración mínima inhibitoria (CMI).....	92
5.6.4.	Concentración mínima letal (CML). ....	95
6.	CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES .....	98
	ANEXOS.....	100
	ANEXO 1.....	100
	Cálculo de la concentración de Ag y Cu en las muestras. ....	100
	ANEXO 2.....	101
	Nanopartículas sintetizadas con el extracto de hoja seca de <i>Ricinus communis</i> . ....	101
1.1.	Espectroscopia ultravioleta-visible.....	101

1.1.1.	Determinación de la concentración adecuada de <i>Ricinus communis</i> .....	101
1.1.2.	Determinación de la relación en volumen del precursor Ag:Cu y extracto bioreductor de <i>ricinus communis</i> .....	102
1.2.	Microscopía electrónica de barrido (SEM) 25:75. ....	105
1.3.	Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	106
1.3.1.	Sistema Ag:Cu 25:75; precursor:bioreductor 1:0.25. ....	106
1.3.2.	Sistema Ag:Cu 25:75; precursor:bioreductor 1:10. ....	108
ANEXO 3.....		110
Tarjetas cristalográficas. ....		110
<b>Ag</b> .....		110
<b>Cu</b> .....		111
ANEXO 4.....		112
Artículo.....		112
BIBLIOGRAFÍA.....		121

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Modelo del enlace metálico con las cargas (a) [14] y vista en 3D (b) [15].	21
Fig. 2. Orbital molecular (OM) para uno (a), tres (b) y cinco (c) átomos de Li. OM para el enlace metálico de Li (d) [10].	22
Fig. 3. Correlación entre tamaño de partícula y átomos en la superficie [10].	23
Fig. 4 <i>Ricinus communis</i> . Hojas y tallo (a), fruto (b), semilla (c) [61].	30
Fig. 5. Micrografía electrónica de transmisión de nanoesferas y nanorodillos (a, b) de Au y nanoprismas triangulares de Ag (c). Fotografías de nanopartículas de Au-Ag con incremento de concentración de Au (d), nanorodillos de Au con incremento en su relación de aspecto (e) y nanoprismas de Ag con incremento de tamaño (f) [12].	36
Fig. 6. Esquema de la interacción de radiación electromagnética con NPsM esféricas. Oscilaciones transversales y longitudinales de electrones en nanorodillos [75].	38
Fig. 7. Espectros Uv-vis. de nanopartículas sintetizadas con ácido ascórbico y quitosano compuestas por: a)Ag, Cu, Ag+Cu, Ag/Cu [40]. b) Relación molar Ag/Cu: A) 1:0; B)0.75:0.25; C)0.5:0.5; D) 0.75:0.25; E)0:1 [44].	38
Fig. 8. Espectro Uv-vis. de nanopartículas obtenidas mediante ácido ascórbico, alcohol etílico, $\beta$ -CDs (beta ciclo dextrina), solución de amonio e hidróxido de sodio [71].	39
Fig. 9. a) Imagen TEM y TEM-EDS compuesta (verde para Ag y rojo para Cu) para nanopartículas bimetálicas Ag-Cu sintetizadas a partir de $\text{AgNO}_3/\text{Cu}(\text{OAc})_2+\text{H}_2\text{O}/\text{PVP}$ mezclados en EG a una relación molar $[\text{Ag}]/[\text{Cu}]=0.25$ . b)Espectro Uv-Vis de la cinética de crecimiento de las nanopartículas [72].	39
Fig. 10. Imagen de las partículas Ag/Cu=0.25 [72].	40
Fig. 11. Mecanismos de crecimientos para a)aleación Ag/Cu, b)núcleo Ag coraza Cu (Ag@Cu), c)Ag/Cu bicompartida, d)huecas y e)núcleo Cu coraza Ag (Cu@Ag), empleando métodos sintéticos a base de polioles [72].	41
Fig. 12. Esquema de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas [79].	43
Fig. 13. Cepa del <i>Aspegilua niger</i> en PDA (a) y esquema del hongo (b) [86].	45
Fig. 14. Espectro electromagnético [88].	48
Fig. 15. Interacciones del espectro electromagnético con la materia [87].	48
Fig. 16. Diagrama de excitaciones en moléculas al absorber energía radiante UV-VIS [90].	49
Fig. 17. Espectrofotómetro de “doble haz en el tiempo” [93].	50
Fig. 18. Espectrofotómetro de haz doble alternado Cary 16 [93].	50
Fig. 19. Espectro Uv-Vis para nanopartículas sintetizadas a partir de $\text{AgNO}_3$ (1mM) con extracto de hoja de <i>Ricinus communis</i> a lo largo de 3 horas [4].	51
Fig. 20. Izquierda. Tipos de vibración molecular en el Infrarrojo. [93].	51
Fig. 21. Diagrama (a) [93] y esquema (b) [92] de la configuración óptica de un espectrofotómetro FTIR.	52
Fig. 22. Diagrama del camino óptico (a) y esquema (b) de un aditamento ATR [92].	54

Fig. 23. Formación de imagen en microscopio óptico (a), electrónico de transmisión (b) y electrónico de barrido (c) [95].	55
Fig. 24. Señales generadas por la interacción de un haz de electrones de alta energía y la muestra [96].	55
Fig. 25. Interacción de lente electromagnética con el haz de electrones [96].	56
Fig. 26. Diagrama óptico del Microscopio electrónico de barrido [98] y localización de los instrumentos [99].	57
Fig. 27. Esquema del microscopio de transmisión electrónica (a). Esquema óptico de la formación de imagen de campo claro (b) y del patrón de difracción de electrones (b) en el TEM [96].	58
Fig. 28. Esquema óptico para la formación de imágenes de campo oscuro por haz inclinado (izquierda) y apertura fuera de centro (derecha) en el TEM [96].	59
Fig. 29. Esquema de la formación de imágenes de alta resolución en el TEM [96].	59
Fig. 30 Izquierda Emisión de rayos X [101].	60
Fig. 31. Esquema de la CML y de la CMI en concentraciones crecientes del antimicrobiano [AB] [108].	64
Fig. 32. Metodología general para la obtención de Nps metálicas, su caracterización y evaluación microbiológica.	66
Fig. 33. Cepas bacterianas de <i>S. aureus</i> (BHI) (a, b) y <i>E. coli</i> (EMB) (c, d) en tubo y sembrado por estría en caja.	69
Fig. 34. Esquema de frotis bacteriano [109].	70
Fig. 35. Esquema de la tinción de Gram [110].	70
Fig. 36. Preparación de <i>A. niger</i> con azul algodón de lactofenol para observar en microscopio.	71
Fig. 37 Esquema del tratamiento de muestra para la prueba de difusión de disco [111].	72
Fig. 38 Esquema de la placa de micropozos empleada, donde: C- es control negativo, C+ control positivo, D diluciones y la columna morada indica las alícuotas de nanopartículas empleadas para el test de CMI.	73
Fig. 39 Esquema de la prueba de CML a partir de la evaluación de CMI.	75
Fig. 40. Muestras de Nps obtenidas por el extracto de <i>Ricinus comunis</i> (Rc) (1/10) en los sistemas precursor:bioreductor 1:10, para los precursores de: Rc (extracto dilución 1/10), Cu ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), 10:90 (Ag:Cu), 25:75 (Ag:Cu), 50:50 (10:90 (Ag:Cu) y Ag ( $\text{AgNO}_3$ ), a los 15 minutos y 3 horas de reacción.	76
Fig. 41. Espectros uv-vis de los sistemas "precursor:extracto diluido" 1:10 a 5 min, 15 min, 30 min, 45 min y 1-6 horas, para los precursores Ag:Cu: a) 10:90, b) 25:75, c) 50:50, d) Ag (5min.), e) Ag (3 horas), f) 25:75 (20 horas).	77
Fig. 42. Espectros uv-vis contraídos de los sistemas Ag:Cu a) 10:90 y b) 25:75 de las figuras 41a y 41b respectivamente.	79
Fig. 43. Espectros FTIR de nanopartículas sintetizadas a partir de la hoja fresca de <i>Ricinus communis</i> . HF- extracto de la hoja fresca, Nps Ag:Cu 10:90, 25:75, 50:50, Ag y Cu.	80

Fig. 44. Micrografías de electrones secundarios correspondientes a síntesis con relación en volumen 1:10 precursor : extracto acuoso (1/10) de hoja fresca, para Nps de: Cu (a), Ag (e), sistemas Ag:Cu 10:90 (b), 25:75 (c), 50:50 (c).....	82
Fig. 45. Espectros EDS y porcentos en peso y atómico, para Nps de: Cu (a), Ag (e), sistemas Ag:Cu 10:90 (b), 25:75 (c), 50:50 (c), de la Figura 51.....	83
Fig. 46. Micrografías de nanopartículas sistema Ag:Cu 10:90 (a,b). Histograma de frecuencias (c) y patrón de difracción (d) del sistema mencionado, los planos de las partículas de Ag en azul y del Cu en naranja. ....	84
Fig. 47. Micrografías de nanopartículas sistema Ag:Cu 25:75 (a,b). Histograma de frecuencias para el sistema mencionado (c).....	85
Fig. 48. Patrón de difracción de nanopartículas sistema Ag:Cu 25:75, los planos que corresponden a las partículas de Ag se encuentran en azul y los que corresponden al Cu en naranja (a). Patrón de difracción tratado digitalmente para observar las señales correspondientes al plano (400) de Ag. ....	86
Fig. 49. Micrografías de nanopartículas sistema Ag:Cu50:50 (a,b). Histogramas de frecuencias de 50:50 para el 90% de partículas en el rango de 1-40 nm(c) y para el 10% en el rango de 50-90 nm (b).....	86
Fig. 50. Micrografías (a,b), histograma de frecuencias (c) y patrón de difracción (d) de nanopartículas de Ag.....	87
Fig. 51. Micrografías de nanopartículas sistema de Cu. ....	88
Fig. 52. Micrografías de microscopio óptico (a) y confocal (b) de la muestra de <i>S. aureus</i> ATCC25923. ....	90
Fig. 53. Micrografías de microscopio óptico (a) y confocal (b) de la muestra de <i>E. coli</i> ATCC25922. ....	90
Fig. 54. Esquema estructural del <i>Aspergillus sp.</i> y <i>Penicillium sp</i> (a). Micrografía de microscopio óptico de <i>A. niger</i> (b). Micrografía de microscopio confocal del <i>A. niger</i> . ....	91
Fig. 55. Cajas petri con pruebas de halo inhibitorio para cepa <i>E. coli</i> y Np's sintetizadas con hoja seca (a) y hoja fresca de <i>Ricinus communis</i> (b). Hs- <i>Ricinus comunis</i> seca. Ag-plata. Bco-Blanco. Hf- Hs- <i>Ricinus comunis</i> fresca. Sistemas Ag:Cu 10:90, 25:75: 50:50.....	92
Fig. 56. Cajas con pocillo (200µl, 5x10 <sup>5</sup> UFC/ml) de <i>S. aureus</i> (a) y <i>A. niger</i> (b). En columnas: C- control negativo (solo caldo de cultivo). M muestra. D1-D9 dilución 1-9. C+ control positivo (Cepa y caldo de cultivo). En filas: las soluciones de nanopartículas que se están evaluando.....	93
Fig. 57. Pruebas de CML para <i>S. aureus</i> para: a)Cu, b) Ag:Cu 10:90, c) 25:75, d)50:50, e) Ag. C+ control positivo, C- control negativo, Np's alícuota de nanopartículas, X <sup>a</sup> D es el número de dilución.....	95
Fig. 58. Espectro Uv-vis de Higuierilla diluida 1:100 (negro), 1:10 (rojo), nanopartículas a 2H. con relación Ag:Cu 25:75 obtenida por reducción con higuierilla diluida 1:10 (verde) y 1:100 (azúl). A la derecha: imágenes de las muestras. a) Ag:Cu 25:75 con relación Precursor:Reductor 1:10 con la dilución del extracto 1/10. b) Ag:Cu 25:75 con relación P:R 1:10 con la dilución del extracto 1/100. c) Estructura de la flavanona. ....	101

Fig. 59. Muestras de Nps obtenidas por diversas relaciones de volumen: precursor:extracto (columnas) ; precursores Ag:Cu (filas). .....	102
Fig. 60. Espectro Uv-vis de nanopartículas Ag:Cu (10:90, 25:75, 50:50) en el sistema de un volumen de solución precursora por 0.5 veces el volumen de Bioreductor. ....	103
Fig. 61. Espectro uv-vis de nanopartículas Ag:Cu (10:90, 25:75, 50:50) en el sistema de un volumen de solución precursora por 10 veces el volumen de Bioreductora las 6 horas de reacción.....	104
Fig. 62. Microanálisis elemental de las Np's de Ag:Cu 25:75 para un volumen 1:10 de Precursor:Bioreductor. Area de análisis en cuadro rojo (a,b), espectro EDS (c,d) y porcentaje en peso (e, f). ....	106
Fig. 63. Micrografía de muestra Ag:Cu 2575; precursor:bioreductor 1:0.25 (a,b) histograma de frecuencias para las micrografías (c,d) .....	107
Fig. 64. Micrografía de muestra Ag:Cu 2575; precursor:bioreductor 1:0.25 (a,b) histograma de frecuencias para las micrografías (c,d). ....	108
Fig. 65. Patrón de difracción de muestra Ag:Cu 25:75; precursor:bioreductor 1:0.25. ....	108
Fig. 66. Micrografías de muestra Ag:Cu 25:75; precursor:bioreductor 1:10. ....	109
Fig. 67. Histograma de frecuencia para las partículas del sistema Ag:Cu 2575; precursor:bioreductor 1:10. ....	109
Fig. 68. Micrografía para el sistema Ag:Cu 2575; precursor:bioreductor 1:10. b patrón de difracción de las partículas en la micrografía a. ....	109

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Nanoestructuras y sus ensamblajes [13]. .....	20
Tabla 2. Relación entre el tamaño y forma de Nps de Ag con respecto a la planta con que se sintetizaron. ....	28
Tabla 3. Pruebas microbianas de extracto en acetato de metilo y Metanol de <i>Ricinus communis</i> [60]. .....	31
Tabla 4. Actividad antimicrobiana de algunas nanopartículas de plata sintetizadas con extracto de plantas. ....	33
Tabla 5. Pruebas de CMI y CML para nanopartículas de Ag, Cu, Ag+Cu y Ag/Cu (ácido ascórbico y quitosano) con 200 nm de tamaño, en cepas de <i>B. subtilis</i> y <i>E. coli</i> [40].....	34
Tabla 6. Regiones del espectro infrarrojo [94]. .....	52
Tabla 7. Relación en volumen de solución acuosa de AgNO <sub>3</sub> y CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O 10mM. ....	66
Tabla 8. Relaciones volumétricas de solución acuosa por ml de extracto acuoso (1/10). ....	67
Tabla 9. Lista de experimentos para los diversos sistemas de síntesis Ag:Cu. ....	67
Tabla 10. Concentración de Ag y Cu (µg/ml), para las Nps, en las disoluciones sucesivas, en placas de micropozos.....	74
Tabla 11. Esquematización de los resultados en placas con micropocillos para <i>S. aureus</i> . Coloración verde-parámetros, roja-cerigrafía en la placa, en azul resultados de presencia (T) o ausencia (C) de turbidez.....	93
Tabla 12. Esquematización de los resultados en placas con micropocillos para <i>E. coli</i> . Coloración verde-parámetros, roja-rotulación en la placa, en azul resultados de presencia (T) o ausencia (C) de turbidez.....	94
Tabla 13. Esquematización de los resultados en placas con micropocillos para <i>A. niger</i> . Coloración verde-parámetros, roja-cerigrafía en la placa, en azul resultados de presencia (T) o ausencia (C) de turbidez.....	94
Tabla 14. Concentración del metal en Nps (µg/ml), para la CMI de sistemas: Hf (extracto 1/10 de <i>Ricinus communis</i> ), Cu, 10:90, 25:75, 50:50 y Ag, evaluados en las cepas de <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> y <i>A. niger</i> . ....	94
Tabla 15. CMI y CML (µg en un pocillo de 200 µl y µg/ml) para los sistemas Hf (extracto 1/10 de <i>Ricinus communis</i> ), Cu, 10:90, 25:75, 50:50 y Ag, evaluados en las cepas de <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> y <i>A. niger</i> (5x10 <sup>5</sup> UFC/ml). ....	96
Tabla 16. Concentraciones de los metales para los sistemas sintéticos (µg/ml o mg/L). ...	100
Tabla 17. Señales de absorción en uv-vis de los sistemas Ag:Cu y Precursor: Extracto acuoso (1/10) a 6 horas.....	104

## ABREVIATURAS

AMR	American Medical Response.
ANLIS	Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de salud.
BHI	Brain Heart Infution (Infusión corazón cerebro).
CCIQS	Centro Conjunto de Investigaciones en Química Sustentable.
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute. (Instituto de estándares clínicos y de laboratorio).
EMB	Eosin Methylene Blue (Eosin azul de metileno).
EDS	Energy-dispersive X-ray spectroscopy (Dispersión de energía de rayos X).
FTIR	Fourier Transform Infrared. (Espectroscopía Infrarroja con transformada de Fourier)
Hf	Higuerilla ( <i>Ricinus communis</i> ) fresca.
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital (Orbital molecular altamente ocupado).
Hs	Higuerilla ( <i>Ricinus communis</i> ) seca
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital (Orbital molecular de baja ocupación).
LIDMA	Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Materiales Avanzados.
M	Molaridad.
M <sup>0</sup>	Metal con estado de oxidación 0.
M <sup>+</sup>	Ion metálico.
MH	Müllen-Hinton.
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards (Comité nacional para estándares de laboratorio clínico).
Nps	Nanopartículas.

NpsM	Nanopartículas metálicas.
PDA	Potato Dextrose Agar (Agar de papa dextrosa).
RPS	Resonancia de Plasmón superficial.
SEM	Scanning Electron Microscopy (Microscopía electrónica de barrido).
SEI	Secondary Electron Image (Imagen por electrones secundarios).
TEM	Transmission electron microscopy (Microscopía electrónica de transmisión)
UAEM	Universidad Autónoma del Estado de México.
UFC	Unidades Formadoras de Colonias.
Uv-Vis	Ultravioleta - visible





## ABSTRACT

This thesis work proposes the bimetallic nanoparticles Ag/Cu synthesis using a 1/10 aqueous extract dilution obtained by 5 minutes boiling of Higuierilla (*Ricinus communis*) leaves as a bioreductive and stabilizing agent, the leaves were collected in the nearby of Tenancingo de degollado in the State of Mexico.

AgNO<sub>3</sub> and CuSO<sub>4</sub>•5H<sub>2</sub>O 10 mM solutions were prepared, Ag:Cu mixtures of the solutions were prepared with volume ratio (ml AgNO<sub>3</sub>: ml CuSO<sub>4</sub>•5H<sub>2</sub>O): 10:90, 25:75 and 50:50. A volume of 10 ml of diluted aqueous extract (1/10) was added for each ml of the corresponding Ag:Cu mixture to reduce metal ions.

The change of color when mixing the aqueous extract with the salts precursor solutions indicates the reduction of the metal ions. The nanoparticles were characterized by spectroscopic techniques: ultraviolet-visible and infrared (FTIR), scanning electron microscopy (SEM), transmission (TEM) and X-ray scattered energy spectroscopy (EDS) the results show a relationship between the increase in Ag concentration in the Ag: Cu systems and the spectra intensity signals, infrared signal around 1645 cm<sup>-1</sup> (NH, C=C) unfolds into two signals, the elementary analysis shows a different relationship of Ag:Cu that from the one expected, in similar investigations the formation of core-shell particles and other structures in which the Ag interferes in the Cu signals emission. The particles are smaller than 100 nm in all cases, the Ag: Cu 10:90 system has the best size and morphology control (spheroid), 10:90 with sizes of 10-25 nm ( $\bar{X}$ =18 nm,  $\sigma$ =9). The selected area electron diffraction agree with face-centered cubic crystalline structures (Fcc) when compared to JCPDF cards for silver (03-065-8428 Ag Fcc) and copper (01-070-3038 Cu Fcc).

Microbial sensitivity tests were evaluated in microorganisms strains of: *Staphylococcus aureus* ATCC25923 (gram +), *Escherichia coli* ATCC25922 (gram -) and an endemic strain of the fungus *Aspergillus niger*. The disc diffusion test, with the *E.coli* strain, confirmed the antimicrobial action of the Nps due to the presence of inhibitory halos with: 2.9, 2.5, 3.1 and 3.6 mm radius for samples 10:90, 25:75, 50: 50 and Ag respectively, the results of the Cu and the extract were negative. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum lethal concentration (CML) determinations present different sensitivities that were appreciated depending on the different Nps obtained and the strains, *R. communis* aqueous extract (1/10) and the copper Nps system presented negative results in all strains.

## RESUMEN

El presente trabajo de tesis propone la síntesis de nanopartículas bimetálicas Ag/Cu usando una dilución 1/10 del extracto acuoso obtenido por ebullición durante 5 minutos de las hojas de Higuera (*Ricinus communis*) como agente bio-reductor y estabilizante, las hojas se recolectaron en las inmediaciones de Tenancingo degollado en el Estado de México.

Se prepararon soluciones 10 mM de  $\text{AgNO}_3$  y  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , se prepararon mezclas Ag:Cu de las soluciones con relación de volumen (ml  $\text{AgNO}_3$  : ml  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ): 10:90, 25:75 y 50:50. Del extracto acuoso diluido (1/10), se añadió un volumen de 10 ml por cada ml de la mezcla de Ag:Cu correspondiente para reducir los iones metálicos.

El cambio de color al mezclar el extracto acuoso con las soluciones de las sales precursoras indica la reducción de los iones metálicos. Las nanopartículas se caracterizaron mediante espectroscopía ultravioleta-visible e infrarrojo (FTIR), microscopía electrónica de barrido (SEM), de transmisión (TEM) y espectroscopía de energía dispersa de rayos X (EDS). Los resultados muestran una relación entre el aumento en la concentración de Ag en los sistemas Ag:Cu y la intensidad de las señales en los espectros; en infrarrojo, la señal alrededor de  $1645 \text{ cm}^{-1}$  (N-H, C=C) se desdobra en dos señales. El análisis elemental muestra una relación de Ag:Cu diferente al esperado; en trabajos similares se señala la formación de partículas core-shell y otras estructuras en que la Ag interfiere en la emisión de señales del Cu. En todos los casos las partículas son menores a 100 nm, el sistema Ag:Cu 10:90 presenta el mejor control de tamaño y morfología (esferoide), 10:90 con tamaños de 10-25 nm ( $\bar{X}=18 \text{ nm}$ ,  $\sigma=9$ ). Los patrones de difracción de área selecta concuerdan con estructuras cristalinas cúbicas centradas en cara (Fcc) al comparar con las tarjetas JCPDF para plata (03-065-8428 Ag Fcc) y cobre (01-070-3038 Cu Fcc).

Las pruebas de sensibilidad microbiana se evaluaron en cepas de los microorganismos: *Staphylococcus aureus* ATCC25923 (Gram +), *Escherichia coli* ATCC25922 (Gram -) y una cepa endémica del hongo *Aspergillus niger*. El método de difusión en disco, con la cepa *E.coli* corroboró la acción antimicrobiana de las Nps por presencia de halos inhibitorios con: 2.9, 2.5, 3.1 y 3.6 mm de radio (alrededor del disco) para las muestras 10:90, 25:75, 50:50 (v/v) y Ag respectivamente, los resultados del Cu y el extracto fueron negativos. En las determinaciones de concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima letal (CML), se apreciaron distintas sensibilidades, en función de las distintas Nps obtenidas y las cepas, las Nps del sistema 10:90 presenta la menor concentración de Ag para CMI y CML con excepción de *S. aureus* donde no presenta CML, El extracto acuoso (1/10) y las nanopartículas de cobre presentaron resultados negativos en todas las cepas.

# INTRODUCCIÓN

La tesis se encuentra integrada por seis capítulos donde se desarrolla el trabajo de investigación para la síntesis propuesta de nanopartículas bimetálicas de Ag/Cu empleando el extracto acuoso de las hojas de la plata conocida como Higuierilla (*Ricinus Communis*) como el agente reductor y estabilizante biológico.

En el primer capítulo comprende los antecedentes o marco teórico que preceden y sirven de base al presente trabajo de investigación, se tratan conceptos básicos de la nanotecnología y el material nanoestructurado, explicando algunas características estructurales que dan orígenes a sus propiedades, así como métodos de obtención generales para estos materiales y la importancia del desarrollo de métodos sintéticos bajo los conceptos de la llamada química verde anteponiendo síntesis amigables con el medio ambiente, empleando recursos renovables y ejemplos de éstas síntesis. El marco teórico de la *Ricinus communis* y su empleo en la síntesis de Nps de Ag, así como las propiedades de los metales y las nanopartículas de Ag, Cu y bimetálicas de Ag/Cu, haciendo hincapié en sus propiedades antimicrobianas y ópticas. Por último se describe brevemente algunas de las propiedades de las cepas microbianas (*E.coli*, *S. aureus* y *A. Niger*) empleadas para evaluar la sensibilidad microbiológica de las Nps sintetizadas.

El segundo capítulo corresponde a los puntos del protocolo de la tesis, que sentaron las bases para el desarrollo de este trabajo, conteniendo: la justificación, hipótesis, objetivos: general y específicos, así como las metas que se plantearon.

A lo largo del tercer capítulo se presentan las bases teóricas que comprenden las distintas técnicas de caracterización (Uv-Vis, FTIR, SEM, TEM, EDS), así como los métodos para las diferentes pruebas de sensibilidad antimicrobiana de las Nps obtenidas (Difusión de halo inhibitorio, CMI, CML).

Durante el cuarto capítulo se desarrolla el material y la metodología a seguir, explicando las condiciones de trabajo, los pasos y cantidades empleadas en la síntesis del material, en las técnicas y métodos expuestos en el tercer capítulo, así como las marcas y características de los equipos empleados.

En el quinto capítulo se exponen y discuten los resultados obtenidos mediante las técnicas de caracterización empleadas en las nanopartículas que se sintetizaron. La identificación morfológica por microscopio óptico y confocal de las cepas empleadas, así como los resultados de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana.

El capítulo seis presenta las conclusiones de los resultados obtenidos en el trabajo de tesis.

Por último se presenta un apartado de anexos donde se incluye un anexo 1 con los cálculos realizados para obtener la concentración de Ag y Cu de las Nps a partir de la concentración de las sales correspondientes empleadas y el anexo 2 contiene un estudio que se realizó previamente empleando la misma metodología, pero cambiando los 10 g de hojas frescas por 1 g de hoja seca de *Ricinus communis*, obteniéndose Nps sin actividad antimicrobiana, en éste estudio se determinó la dilución adecuada para el extracto acuoso (1/10) en base a la estabilidad de las Nps formadas.

## PREFACIO

En la actualidad la ciencia e ingeniería de materiales está teniendo un gran auge, debido principalmente a la gran cantidad de materiales que pueden obtenerse variando los métodos sintéticos, lo cual puede modificar notablemente las propiedades del material. Siendo de interés los métodos de síntesis que emplean materiales de origen natural como son los extractos naturales de las partes de diversas plantas, el empleo de frutos e incluso el uso de microorganismos, entre otros, para obtener el material deseado, aprovechando la biomasa disponible.

Una de las áreas de los materiales de mayor interés es el de aquellos que se encuentran conformados por escalas nanométricas, ya que presentan propiedades diferentes a las de sus homólogos de mayor tamaño, como es el caso del cobre, donde se ha observado una mayor actividad antibacteriana cuando se encuentra como nanopartículas que en tamaños mayores [1].

Las aplicaciones de las nanopartículas y los nanomateriales se encuentran creciendo debido a su variación de propiedades, basadas en su distribución de tamaño, composición y morfología. Su uso se expande y renueva rápidamente en campos como: salud, cosméticos, biomédica, alimentación, liberación controlada de fármacos, medioambiente, mecánica, óptica, industria química, electrónicos, industria espacial, energía, catálisis, emisores de luz, transistores de electrón sencillo, dispositivos de óptica no lineal y aplicaciones electroquímicas, entre otros [2-4].

Las nanopartículas metálicas son consideradas como las que pueden tener las propiedades antibacteriales más remarcadas, debido a su gran relación de área superficial en relación con su volumen [2].

La plata es de especial interés debido a su estabilidad química, buena conductividad eléctrica y térmica, actividad catalítica y en especial por su actividad antibacterial, antiviral y antifúngica, en conjunto con su actividad antiinflamatoria, que pueden ser incorporadas dentro de fibras generando composites, para su uso como materiales criogénicos superconductores, cosméticos, alimentos industriales y componentes electrónicos, teniendo potenciales aplicaciones biomédicas [2, 5].

Un gran número de nanopartículas se han sintetizado tradicionalmente, por una variedad de métodos físicos o químicos, caros y potencialmente contaminantes para el medio ambiente [2]. Los métodos biológicos surgen como una alternativa ecoamigable y de bajo costo para la síntesis de nanopartículas mono y bimetálicas.

# CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

## 1.1. Nanotecnología

Disciplina de la tecnología que diseña, crea, caracteriza, controla, manipula y aplica dispositivos, sistemas y estructuras de los materiales en una escala nanométrica (una mil millonésima parte de un metro  $1 \times 10^{-9}$  m), generalmente dentro del rango de 1-100 nm. Las propiedades del material nanoestructurado cambian drásticamente con respecto al material molecular y la materia condensada, confiriéndole novedosas propiedades físicas, químicas, mecánicas, ópticas y magnéticas en función del tamaño, estructura y morfología de las partículas, ofreciendo grandes ventajas en el diseño de materiales con propiedades especializadas para aplicaciones específicas, además de reducir tanto la cantidad de materia, como la energía demandada, con aplicaciones potenciales en diversas áreas como: física, química y biología entre otras [6-11].

Noboru Takehuchi la define como: “el área de investigación que estudia, diseña y fabrica materiales o sistemas a escalas nanoscópicas y les da alguna aplicación práctica”, la US Foresight la define como: “la nanotecnología es una serie de tecnologías emergentes en las cuales la estructura de la materia en estudio es controlada en la escala nanométrica para producir nuevos materiales y dispositivos que ofrezcan usos y propiedades únicas” [11].

Tras los avances en el estudio e investigación de los materiales y el conocimiento de su estructura, se sabe que desde la antigüedad el hombre ya empleaba materiales con estructuras nanométricas sin tener conocimiento de ello, como es el caso del colorante azul maya empleado en diversos murales prehispánicos, el cual es un compuesto formado de partículas híbridas de material orgánico (indigo) e inorgánico (filosilicato) con gran resistencia a la decoloración por el medio ambiente. La copa de Lycurgus es otro ejemplo, ésta fue fabricada en torno al siglo IV a. C. en Roma y presenta diferente coloración si la luz es transmitida desde su interior o reflejada sobre su superficie, fenómeno que se debe a la presencia de nanopartículas de plata y oro con que está elaborada [12]. La fabricación de vitrales en catedrales, donde se obtenían diferentes tonos calentando y enfriando el vidrio de forma controlada, cambiando el tamaño de los cristales a nivel nanométrico y por tanto su color. En 1959 Richard Feynman plantea la idea de controlar átomos y moléculas para hacer nuevas estructuras y por ende nuevos materiales al margen de su conferencia “There is plenty of room at the bottom” (Hay mucho espacio en el fondo), a lo que posteriormente Drexler enuncia la posibilidad de construir diversas nanomáquinas con propiedades y aplicaciones específicas [6, 8].

## 1.2. Nanomateriales o materiales nanoestructurados

Son los materiales naturales, accidentales o fabricados, con partículas, agregados o aglomerados en el cual al menos el 50% de la granulometría numérica está comprendida entre un intervalo de tamaño de 1-100 nm (125-70000 átomos por partícula). Pueden tener diferentes tamaños, formas, naturaleza química y procedencia por lo que hay varias clasificaciones.

- Clasificación por sus dimensiones [8, 10, 13]:
  - 0 dimensiones (0D).- Agregados muy pequeños de unos cuantos átomos, estas nanoestructuras también se conocen como puntos cuánticos y comprenden nanopartículas menores a 10 nm.
  - 1 dimensión (1D).- Tienen una longitud variable y una dimensión en escala nanométrica como las estructuras de nanotubos y nanoalambres.
  - 2 dimensiones (2D).- Nanoestructuras que presentan áreas de tamaño indefinido con un espesor menor a 100 nm como son las películas delgadas.
  - 3 dimensiones (3D).- Sólidos tridimensionales formados por unidades nanométricas.

En la tabla 1 se muestran algunos ejemplos de éstas nanoestructuras, el tamaño que presentan y materiales con estas estructuras.

Tabla 1. Nanoestructuras y sus ensamblajes [13].

Nanoestructura	Tamaño	Material
Clusters, nanopartículas, puntos cuánticos.	Radio 1-10 nm	Aislantes, semiconductores, metales, materiales magnéticos.
Otras nanopartículas	Radio 1-100 nm	Cerámicos, óxidos.
Nanobiomateriales	Radio 5-10 nm	Membranas proteínicas
Nanocables	Diámetro 1-100 nm	Metales semiconductores, óxidos, sulfuros, nitruros.
Nanotubos	Diámetro 1-100 nm	Carbono, BN, GaN.
Nanobiorodillos	Diámetro 5 nm	ADN.
Arreglos bidimensionales de nanopartículas	Área varios $\text{nm}^2$ - $\mu\text{m}^2$	Metales, semiconductores, materiales magnéticos.
Superficies y partículas delgadas	Espesor 1-100 nm	Aislantes, metales, semiconductores.
Superredes tridimensionales de nanopartículas	Varios nm en tres dimensiones	Metales semiconductores, materiales magnéticos.

- Clasificación por su procedencia:
  - Natural: Producidos por árboles, pantas, volcanes, espumas marinas, etc.
  - Incidental: Producidos por combustión, procesos industriales, etc.
  - Artificial (sintética): Producidos por procesos de fabricación intencional.

- De acuerdo a su origen (Agencia del Medio Ambiente EPA EUA) :
  - Basados en carbono: Compuestos mayoritariamente por carbono, adoptan formas de esferas huecas, elipsoides o tubos, son los fullerenos y nanotubos.
  - Basados en metales: Incluyen puntos cuánticos, nanopartículas de metales y óxidos metálicos.
  - Dendrimeros: Estructuras poliméricas de tamaño manométrico construidos a partir de unidades ramificadas.
  - Compuestos o composites: Combinaciones de nanopartículas con otras nanopartículas o con materiales de mayor tamaño.
- Clasificación por su naturaleza química: Orgánica o Inorgánica.

### 1.2.1. Nanopartículas metálicas (NpsM)

Es todo aquel material metálico que presenta partículas con al menos el 50% de la granulometría numérica dentro de un intervalo de tamaño de 1-100 nm.

Las propiedades físicas y químicas de los materiales se deben a su estructura electrónica y a la interacción entre los átomos dentro del material (estructura del material). En materiales nanoestructurados se tiene un caso especial, debido a que por su tamaño los fenómenos en su superficie repercuten drásticamente en sus propiedades, motivo por el cual actualmente la preparación de NpsM ha cobrado gran interés.

Los metales son elementos químicos que se caracterizan por conducir calor y electricidad, presentan enlace metálico, en el cual los electrones de la última capa (electrones de valencia) están deslocalizados, formando una nube o mar de electrones en el material tridimensional como se puede apreciar en la figura 1. Los núcleos de los átomos con cargas positivas quedan enlazados por atracción mutua de las cargas.

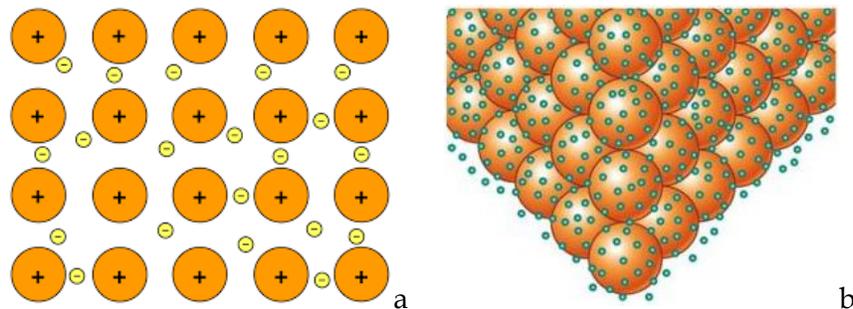


Fig. 1. Modelo del enlace metálico con las cargas (a) [14] y vista en 3D (b) [15].

Tomando el modelo del orbital molecular de la figura 2, en donde para el enlace metálico entre dos átomos de Li (Fig. 2a), en el que cada uno tiene un solo electrón de valencia, se tiene una zona de alta probabilidad de localizar los electrones (orbital de enlace  $\sigma$ ) y una zona con poca probabilidad de encontrar los electrones (orbital de antienlace  $\sigma^*$ ). A mayor cantidad de átomos en el material, hay una mayor superposición de estos orbitales, al aumentar el número de átomos en un metal de Li de 6 a 10 átomos (Fig. 2b y 2c), hasta llegar al caso en donde se tiene una cantidad infinita de estos orbitales para los metales microscópicos (Fig. 2(d)). Esta superposición de los orbitales moleculares en el material de enlace  $\sigma$  (HOMO) y antienlace  $\sigma^*$  (LUMO) forman las bandas de valencia y de conducción respectivamente [8, 10].

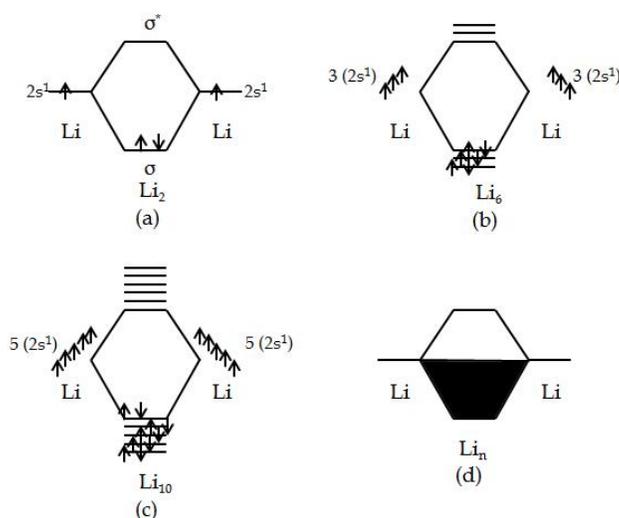


Fig. 2. Orbital molecular (OM) para uno (a), tres (b) y cinco (c) átomos de Li. OM para el enlace metálico de Li (d) [10].

La energía que un material adquiere del medio para promover un electrón de la banda de valencia a la de conducción, cambia con respecto al tamaño del material, debido a que la cantidad de átomos en la superficie, aumenta al disminuir el tamaño de las partículas (Fig. 3), lo que modifica sus propiedades ya que tanto el tamaño, conformación y morfología de las partículas, absorben y dispersan la energía de manera diferente cambiando sus propiedades ópticas, magnéticas, catalíticas y fisicoquímicas entre otras, como en el caso de las partículas metálicas [10, 16].

Totales de capas en el cluster		Numero total de atomos	Atomos en la superficie %
1 Capa		13	92
2 Capas		55	76
3 Capas		147	63
4 Capas		309	52
5 Capas		561	45
6 Capas		1415	35

Fig. 3. Correlación entre tamaño de partícula y átomos en la superficie [10].

*Ópticas.*- En un metal liso, la luz es totalmente reflejada por la alta densidad de electrones presentando una apariencia de espejo, mientras que en partículas finamente dispersadas la luz se absorbe por la reflexión repetida [10].

*Eléctricas.*- La conductividad se debe al movimiento de electrones excitados de la banda de valencia a la de conducción, produciendo huecos generados por dichos electrones [10, 17].

*Puntos de Fusión.*- Al tener la mayoría de los átomos en la superficie (partículas más pequeñas) la energía necesaria para separar estos átomos es menor que en agregados de mayor tamaño.

*Catalíticas.*- Están determinadas por el número de átomos o moléculas en la superficie, al tener una mayor área superficial de contacto se incrementa la actividad catalítica del material [16].

### 1.2.2. Métodos de síntesis de Nps

La síntesis de Nps se pueden agrupar principalmente en dos categorías dependiendo de las dimensiones del material a partir del cual se obtienen, se clasifican como [6, 18]:

*Top-Down (De la arriba hacia abajo).*- Se enfoca en obtener partículas de tamaño nanométrico a partir de un material macroscópico. Engloba principalmente métodos físicos y mecánicos para obtener las Nps agregando algún agente protector para

estabilizar la partícula obtenida. Entre algunos de los métodos empleados en éste apartado se encuentran: Molienda de bola o rompimiento mecánico, ablación laser, desbaste iónico, entre otros [18].

*Bottom-Up (Del abajo hacia arriba).*- Se hace la unión de las partículas a partir de átomos o iones individuales, haciéndolos crecer hasta el tamaño nanométrico, emplea reductores para generar las partículas y agentes estabilizantes para controlar el tamaño y morfología de las partículas . Abarca métodos químicos y biológicos, estos últimos han tomado una gran importancia por su bajo coste e impacto ambiental [6, 18].

En base a los procesos involucrados en la síntesis, se clasifican en métodos físicos, químicos y biológicos, los cuales llevan implícitos diversas ventajas y desventajas en el control de tamaño, morfología del material, cantidad obtenida y el impacto ambiental.

#### **1.2.2.1. Métodos físicos**

Las Nps no experimentan transformaciones químicas, son de rápido desarrollo, producen baja contaminación y no se obtienen subproductos, sin embargo, son procesos costosos y difíciles de realizar en comparación con los procesos químicos. Entre los principales procesos físicos se encuentran:

Molienda de bola (Ball milling) o rompimiento mecánico: Se rompe el material con ayuda de pequeñas esferas que se hacen rodar a gran velocidad dentro de tambores [8].

Ablación láser: Un rayo láser incide sobre una superficie del material de interés, dependiendo de la energía aplicada y la temperatura que se alcance se logra la remoción del material como vapor o plasma, para condensarlo sobre la superficie de un sustrato como Nps [8].

Arco de plasma: En atmosfera inerte o vacío se colocan dos electrodos a una distancia menor a 1 cm; al aplicar el potencial eléctrico se produce un arco de plasma que vaporiza el ánodo y deposita el material en el cátodo [16].

Deposición de vapor.- Se calientan los metales hasta formar el gas y depositar en una superficie sólida, generalmente se realiza al vacío para deposición directa o en atmosfera controlada para llevar a cabo reacciones químicas y obtener materiales diferentes a los volatilizados [16].

Desbaste iónico.- En cámara de vacío se bombardea una superficie con iones, para adelgazar el material en la cámara se colocan los sustratos para que las partículas devastadas se adhieran y formar Nps [16].

### 1.2.2.2. Métodos químicos

Involucran reacciones químicas, principalmente por medio de reducción de iones metálicos; existen una gran variedad de estos métodos y producen una cantidad considerable de Nps, permitiendo controlar el tamaño y la forma de las partículas de una manera eficiente. Algunos métodos tienen un fuerte impacto ambiental. Entre los principales métodos químicos se encuentran [13]:

Reducción química: Consiste en la reducción de iones metálicos presentes en una sal mediante un agente reductor como borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ), hidracina ( $\text{N}_2\text{H}_4$ ), dimetil formamida ( $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$ ), entre otros. Emplea agentes estabilizantes para recubrir las partículas controlando el tamaño y aglomeración de las partículas, éste proceso consta de tres etapas [19-22]:

Nucleación.- Tiene a lugar la reducción de la sal metálica donde los iones se reducen a valencia cero mediante reductores, formando núcleos metálicos que sirven de centros de nucleación o semillas.

Crecimiento.- Sobre los núcleos formados o semillas se depositan nuevos núcleos o se reducen iones metálicos, formando partículas de mayor tamaño hasta que se reducen todos los iones metálicos.

Estabilización.- Existe competencia nucleación- crecimiento que se puede favorecer mediante condiciones de síntesis, como es el uso de agentes pasivantes o estabilizantes, que además de ayudar a delimitar el crecimiento de las partículas, también previenen que las partículas ya formadas se aglomeren.

Método sol-gel.- Inicia con la síntesis de una suspensión coloidal de partículas sólidas o cúmulos en un líquido (sol) y la hidrólisis y condensación de éste sol para formar un material sólido lleno de solvente (gel). Para obtener NpsM generalmente se emplean soluciones metálicas para la generación de los soles [8, 16].

Emulsión inversa.- Emplea un solvente orgánico como medio dispersante y surfactantes para formar micelas con la fase acuosa del sistema, las cuales permiten el control de tamaño de las partículas. Al tener el sistema se agregan reductores para reducir los iones a metales [23].

### 1.2.2.3. Métodos biológicos

Al margen de la química verde, estos métodos emplean organismos naturales y renovables como microorganismos (bacterias, levaduras y hongos), partes de plantas o sus extractos para la síntesis de NpsM. Tiene la ventaja de tener bajo impacto ambiental, son económicos y no necesitan infraestructura costosa o compleja, ya que los agentes biológicos contienen agentes reductores y estabilizantes.

### 1.3. Química verde

Es una propuesta para reducir y/o eliminar los problemas ambientales derivados de actividades industriales. A principios de los noventa Paul Anastas y John Warner que laboraban para la EPA (US Environmental Protection Agency), proponen el concepto de Química Verde, que refiere a tecnologías químicas que buscan prevenir la contaminación. En 1998 publican en el libro "Green Chemistry: Theory and Practice" doce principios que debe cumplir esta "química amigable" con el ambiente.

Para la EPA, la química verde es el "uso de la química para la prevención de la contaminación, y el diseño de productos químicos y procesos benéficos para el ambiente" [24-28].

En Europa, la Organización Europea para la Cooperación Económica y Desarrollo (OECD) adopta en 1999 el nombre de Química Sustentable para referirse al mismo concepto de la Química Verde [26].

La química verde es aquella que busca procesos que permitan obtener los mismos productos que la química tradicional, pero generando menos contaminación. Se basa en los 12 principios para conseguir sus objetivos [26, 29-33].

1. *Prevención:* Es más útil evitar o reducir la producción de un residuo que tratar de limpiarlo una vez que se haya formado.
2. *Maximizar la economía atómica:* Los métodos de síntesis deberán diseñarse de manera que maximicen la incorporación de todos los materiales involucrados durante el proceso en el producto final.
3. *Uso de metodologías que generen productos con toxicidad reducida o síntesis menos peligrosas:* Los métodos de síntesis deberán diseñarse para utilizar y generar sustancias que tengan poca o ninguna toxicidad, para el hombre como y el medio ambiente.
4. *Generación de productos eficaces pero no tóxicos:* Los productos químicos deberán mantener la eficacia a la vez que reduzcan su toxicidad.
5. *Reducción del uso de sustancias auxiliares:* Se evitará, en lo posible, el uso de sustancias que no sean imprescindibles (disolventes, reactivos para llevar a cabo separaciones,

- etcétera), en el caso de que se utilicen que sean lo más inocuos posible y en la menor cantidad permitida.
6. *Disminución del consumo energético*: Los requerimientos energéticos serán catalogados por su impacto medioambiental y económico, reduciéndose todo lo posible. Se intentará llevar a cabo los métodos de síntesis a temperatura y presión ambiente.
  7. *Utilización de materias primas renovables*: La materia prima ha de ser preferiblemente renovable en vez de agotable, siempre que sea técnica y económicamente viable.
  8. *Evitar la derivatización innecesaria*: Se evitará en lo posible la formación de derivados (grupos de bloqueo, de protección/desprotección, modificación temporal de procesos físicos/químicos).
  9. *Potenciación de la catálisis*: Se emplearán catalizadores (lo más selectivos posible), reutilizables en lo posible, en lugar de reactivos estequiométricos.
  10. *Generación de productos biodegradables*: Los productos químicos se diseñarán de tal manera que al finalizar su función no persistan en el medio ambiente, sino que se transformen en productos de degradación inocuos.
  11. *Desarrollo de metodologías analíticas para la monitorización en tiempo real para evitar la contaminación*: Las metodologías analíticas serán desarrolladas para permitir una monitorización y control en tiempo real del proceso para prevenir a la formación de sustancias peligrosas.
  12. *Prevenir y minimizar del potencial de accidentes químicos*: Elegir las sustancias empleadas en los procesos químicos de forma que se minimice el riesgo de accidentes químicos, incluidas las emanaciones, explosiones e incendios, minimizando los daños cuando se produzca un accidente.

La química verde ha influenciado en los procesos industriales utilizando materiales compatibles con el entorno, desarrollando procesos que reducen o eliminan la generación de sustancias peligrosas y residuos tóxicos [28, 31, 34, 35]. La aplicación de tecnologías catalíticas que maximizan la economía atómica (ej. Obtención de macrolactonas en proceso catalítico con Pd [36]), reduzcan la generación de residuos (líquidos o sólidos), faciliten la separación y disminuyan el consumo energético [37]. El uso de solventes no inflamables, tóxicos y que no produzcan emisiones derivadas de su uso como medio de reacción en la industria química y farmacéutica, minimizando la producción de contaminantes y subproductos [38]. El empleo de sustancias naturales como agentes reductores (bioreductores) en síntesis químicas evitando el empleo de materiales tóxicos y la generación de residuos peligrosos [3, 39-44].

### 1.3.1. Bioreducción

La reducción de iones metálicos a partir de sus sales es uno de los métodos sintéticos más empleados para la obtención de Nps (reducción química pág. 25), permite obtener una gran cantidad de Nps en poco tiempo, habitualmente se emplean químicos tóxicos como reductores y estabilizantes de las partículas. Las biosíntesis o síntesis verdes utilizan entidades biológicas como microorganismo (bacterias, levaduras y hongos), extractos o biomásas de plantas o frutos (árnica, té limón, té verde, toronja, epazote, *ricinus communis*, *aloe vera*, *camellia sinensis*, etc.) como agentes reductores y estabiizantes para la obtención de Nps, siendo una alternativa ecológica a los métodos físicos y químicos [2-4, 42, 45].

Los métodos de síntesis verde son amigables con el medio ambiente, económicos, sencillos de lleva a cabo, con gran rendimiento de Nps; se evita el uso y generación de químicos tóxicos, no requieren gran demanda de energía ni necesitan altas temperaturas o presiones [2, 3, 19, 45].

Las plantas y sus extractos contienen agentes que realizan la reducción y estabilización de los iones metálicos, por medio de una combinación de biomoléculas como: flavonoides, proteínas, aminoácidos, enzimas, polisacáridos, alcaloides, taninos, fenoles, saponinas, terpenoides y vitaminas. Las propiedades de las Nps como polidispersidad y morfología varían con diferentes componentes biológicos como se observa en la tabla 2, donde se presentan bioreducciones con diferentes plantas, así como la forma y tamaño de las Nps obtenidas [2].

Tabla 2. Relación entre el tamaño y forma de Nps de Ag con respecto a la planta con que se sintetizaron.

Plantas	Tamaño (nm)	Parte de la planta	Forma
<i>Alternanthera dentate</i> [46]	50-100	Hojas	Esférica
<i>Boerhaavia diffusa</i> [47]	25	Planta	Esférica
Té verde [48]	20-90	Hojas	Esférica
<i>Tribulus terrestres</i> [49]	16-28	Frutas	Esférica
<i>Pistacia atlántica</i> [50]	10-50	Semillas	Esférica
<i>Premna herbácea</i> [51]	10-30	Hojas	Esférica
<i>Calotropis procera</i> [52]	19-45	Planta	Esférica
<i>Centella asiática</i> [53]	30-50	Hojas	Esférica
<i>Eclipta prostrate</i> [54]	35-60	Hojas	Triángulo, pentágono, hexágono
<i>Nelumbo nucifera</i> [55]	25-80	Hojas	Esférica, triangular
<i>Aloe vera</i> [56]	50-350	Hojas	Esférica, triangular
<i>Memecylon edule</i> [57]	20-50	Hojas	Triangular, circular, hexagonal
<i>Datura metel</i> [58]	16-40	Hojas	Cuasilinear

La síntesis de Nps a partir de extractos de plantas consta de los siguientes pasos generales: [2, 3]

- Recolección de la parte de la planta de interés.
- Lavado con agua deionizada estéril y secado de la hoja.
- Masa Seca: La parte de interés se corta y dejan secar por un periodo aproximado de 10 a 15 días, para pulverizarla posteriormente.
- Masa Húmeda: La parte de interés se tritura o corta.
- Se toma una masa conocida de la biomasa y se hierve en un volumen de agua deionizada (100mL aproximadamente).
- La infusión se filtra para retirar sedimentos y obtener el extracto.
- Se agregan pocos mL del extracto a una solución que contiene el precursor del metal a concentraciones menores de  $10^{-3}M$  para reducir los iones metálicos  $M^+$  y obtener las partículas metálicas  $M^0$ .

La biosíntesis a partir de extractos de plantas por lo general produce nanopartículas esféricas, dependiendo del extracto y método de síntesis, el tamaño oscila entre 6 a 100 nm para el caso de la plata [2].

#### ***1.4. Ricinus Communis***

Conocida también como la planta del aceite de castor, es un arbusto que crece en climas tropicales y cálidos, en países como la India, Sur África, Brasil y Rusia entre otros [59]. En México se encuentra en abundancia en varios sectores del país, principalmente se explota su semilla para obtener el llamado aceite de castor. En India se usan las hojas, la raíz y el aceite de la semilla para el tratamiento de la inflamación y desordenes del hígado, hipoglucemia y como laxante [3, 4, 60].

##### Morfología

Es un arbusto perenne de crecimiento rápido, como se ve en la figura 4a tiene tallo grueso leñoso, es hueco y crece unos 6 metros. Las hojas son de color verde o rojizo y de unos 30-60 cm de diámetro, tienen de 5 a 12 lóbulos con segmentos gruesos y palmados. Los tallos varían en la pigmentación, el fruto (Fig. 4b) es una capsula espinosa de tres celdas. Las semillas (Fig. 4c) presentan diferencia en tamaño y color, son ovaladas de 8-18 mm de largo y 4-12 mm de ancho [61].



Fig. 4 *Ricinus communis*. Hojas y tallo (a), fruto (b), semilla (c) [61].

#### Clasificación taxonómica

Reino: plantae. Orden: Malpighiales. Familia: Euphorbiaceae. Subfamilia: Acalyphoideae. Tribu: Acalipheae. Subtribu: Ricininae. Género: Ricinus. Especie: R. Communis [61].

#### Fitoconstituyentes:

Hojas.- contienen constituyentes bioactivos como: alcaloides (Ricinina, N-demetilricinina), cumarina, fenoles, taninos, flobataninas, flavonoides, terpenoides y glucósidos [4, 59-61].

Fruta.- La cascara contiene alcaloides y ricinina [59].

Semillas.- Contienen tres proteínas tóxicas Ricin A, B y C y una aglutinina ricinus. 45% de aceite que consiste glucósidos de ácidos dihidroxi esteáricos, esteáricos, ricinoleico, isoricinoleico, lipasas y alcaloides cristalinos [59, 61].

Raíces.- Ácido indol-3-acético [59, 61].

Aceite de ricino.- muestra la presencia de ésteres de ácidos palmítico (1.2%), esteárico (0.7%), araquídico (0.3%), hexadecenoico (0.2%), oleico (3.2%), linoleico (3.4%), linolénico (0.2%), ricinoleico (89.4%) y ácidos dihidroxi esteáricos [61].

#### Actividad farmacológica

Los extractos de diferentes partes de la planta tienen diferentes efectos, entre los usos más importantes destacan: Actividad antidiabética, antioxidante, antiasmático, antihistamínico, ayuda al sistema inmune, antiinflamatorio, hepatoprotector, cicatrizante, insecticida y larvicida, tratamiento de úlceras, analgésico, estimulación en la regeneración de huesos [59, 61].

Su actividad antimicrobiana y antifúngica, varía dependiendo del solvente que se emplee para obtener el extracto, así, en cepas de *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*,

*Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* en una prueba por difusión de disco, los extractos con éter de petróleo y acetona presentan una mayor zona de inhibición que los extractos en etanol, los cuales solo tienen actividad antimicrobiana a concentraciones muy altas. En el caso de extractos de la raíz evaluados en cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus Vulgaris*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* y *Aspergillus niger*, los extractos en hexano y metanol muestran una actividad antimicrobiana importante, mientras que los extractos en agua no tienen una actividad antimicrobiana significativa [61]. En la tabla 3 se muestran los resultados para dos extractos obtenidos de las hojas en una misma planta con diferentes solventes, presentando propiedades microbianas diferentes.

**Tabla 3. Pruebas microbianas de extracto en acetato de metilo y Metanol de *Ricinus communis* [60].**

Microorganismo	Halo inhibitorio (mm)		CMI ( $\mu\text{g/L}$ )	
	Acetato de etilo	Metanol	Acetato de etilo	Metanol
Gram positivo				
<i>B. algicola</i> Acc.13/5	10.40 $\pm$ 0.55	12.80 $\pm$ 1.31	25.00	1.80
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	9.00 $\pm$ 0.00	8.00 $\pm$ 0.00	75.00	75.00
<i>L. innocua</i> ATCC 33090	11.20 $\pm$ 0.84	14.00 $\pm$ 1.73	3.60	19.75
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	6.00 $\pm$ 0.00	6.00 $\pm$ 0.00	7.25	50.00
<i>S. epidermis</i> ATCC 12228	9.00 $\pm$ 0.00	8.40 $\pm$ 0.89	100.00	100.00
<i>V. arenosi strain</i> LMG 22166	9.00 $\pm$ 0.71	11.40 $\pm$ 0.55	75.00	100.00
Gram negative				
<i>E. coli</i> ATCC 2592	13.00 $\pm$ 1.41	12.40 $\pm$ 2.07	3.60	2.70
<i>E. coli</i> 0145:H28 Acc.	14.00 $\pm$ 1.23	14.00 $\pm$ 0.71	25.00	7.25
No.CP006027.1				
<i>K. oxytoca</i> ATCC 43086	11.00 $\pm$ 0.00	10.00 $\pm$ 0.00	3.60	9.05
<i>P. mirabilis strain</i> NCTC 11938	13.00 $\pm$ 0.00	11.00 $\pm$ 0.00	100.00	7.25
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	6.00 $\pm$ 0.00	11.00 $\pm$ 0.00	8.15	4.52
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	6.00 $\pm$ 0.00	6.00 $\pm$ 0.00	100.00	100.00

*Ricinus communis* como bioreductor.

Se ha empleado como bioreductor para obtener Nps de Ag, Uthirappan Mani reporta la obtención de Nps esféricas con un rango de tamaño entre los 20-30 nm a partir de hojas secas de la planta [4]. También se ha reportado actividad antimicrobiana para este tipo de partículas en cepas de *Bacillus fusiformis* y *E. coli*, en el primer microorganismo se tiene mayor efecto antimicrobiano con Nps de Ag, mientras que en *E. coli* el efecto con el extracto de la hoja solo y con las Nps son iguales [3].

## 1.5. Plata (Ag)

Es un metal precioso de color blanquecino lustroso, que se encuentra en todo el mundo en minerales tales como la argentita ( $\text{Ag}_2\text{S}$ ). Tiene número atómico de 47 y masa atómica de 107 g/mol, presenta una alta conductividad eléctrica y térmica, es insoluble en agua y soluble en ácido nítrico. Se ha explotado desde la antigüedad con fines metalúrgicos, joyeros, médicos y como biocida, se sabe que tiene efecto sobre más de 650 microorganismos de diferentes clases como las bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, hongos y virus [2]. Las concentraciones del ion de plata muestran actividades antibacterianas con aproximadamente 0.1  $\mu\text{g/L}$  y para actividad fungicida con 1.9  $\mu\text{g/L}$  [62].

La plata y sus derivados corresponden al tipo de biocidas que actúan fuertemente mediante su unión con grupos sulfhidrilos o tioles de las proteínas. Los grupos tioles, que derivan de los residuos de cisteína, son vitales para la actividad de algunas enzimas. La reacción o la oxidación de estos grupos esenciales producen la inhibición celular o inactivación celular [63].

### 1.5.1. Nps de Ag

La síntesis de Nps de plata tiene gran interés ya que al controlar las condiciones de síntesis se controlan la dispersidad y morfología, lo cual permite controlar las propiedades del material, siendo las propiedades medicinales y antimicrobianas las de mayor interés, por su aplicación a productos como ropa, medicamentos, cosméticos, accesorios electrónicos y productos para bebés, entre otros.

Las propiedades bactericidas de la plata aumentan considerablemente cuando se encuentra en escala nanométrica debido al aumento de su área superficial, presentando además nuevas propiedades ópticas [12], térmicas, eléctricas y químicas.

La bio-reducción con extractos de plantas es uno de los métodos más investigados, debido a que, al margen de la química verde, es amigable con el medio ambiente, un método de producción más seguro, barato y menos contaminante, que permite controlar el tamaño y forma de las Nps de plata, como se observa en las síntesis mostradas en la tabla 2 (pg. 28) [2-4, 20, 41, 64, 65]. Las Nps de plata obtenidas por extractos de plantas han probado diferente actividad antimicrobiana en diversos microorganismos (Tabla4) [2].

Tabla 4. Actividad antimicrobiana de algunas nanopartículas de plata sintetizadas con extracto de plantas.

Extracto con el que se obtienen las nanopartículas.	Cepas que presentan sensibilidad a las nanopartículas de Ag.
<i>Alternanthera dentate</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> and, <i>Enterococcus faecalis</i> [46].
<i>Boerhaavia diffusa</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> and <i>Flavobacterium branchiophilum</i> [66].
<i>Tea</i>	<i>E. coli</i> [48].
<i>Cocous nucifer</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Salmonella paratyphi</i> [49].
<i>Aloe vera</i>	<i>E. coli</i> [67].

## 1.6. Cobre (Cu)

El cobre tiene símbolo químico Cu, número atómico 29, masa atómica de 63.54 g/mol, presenta alta conductividad térmica y eléctrica. Se encuentra principalmente en forma de compuestos minerales en los que el <sup>63</sup>Cu constituye el 69,1 % y el <sup>65</sup>Cu el 30,9 % del elemento, está ampliamente distribuido en el planeta, generalmente se extrae en forma de sulfuros (covelita (CuS), calcocita (Cu<sub>2</sub>S), etc) o de óxidos (ej. calcopirita (CuFeS<sub>2</sub>) y la bornita (Cu<sub>3</sub>FeS<sub>3</sub>)).

Junto con el oro, el cobre fue uno de los primeros metales empleados por el hombre hace más de 9000 años. Por ser buen conductor eléctrico, más del 75 % del cobre que se produce se utiliza en la industria eléctrica, así como en informática y telecomunicaciones. Entre otros usos, se encuentra la fabricación de tuberías, pigmentos, equipos químicos, farmacéuticos y producción de aleaciones de cobre. Sus sales se ocupan como alguicida y molusquicida, fungicida vegetal, curtido del cuero y la conservación de pieles, entre otros [68].

Desde la antigüedad eran conocidas en forma empírica las propiedades higiénicas, que hoy, sabemos responden a las propiedades antimicrobianas del cobre. Los griegos, romanos, egipcios, aztecas y mayas, utilizaban el cobre en la fabricación de vasijas para preservar agua y alimentos, fabricaban instrumentos quirúrgicos y se empleaba en la curación de heridas. En el siglo XVII se descubrió la capacidad del cobre para combatir plagas en la agricultura, específicamente para controlar infecciones por hongos en plantaciones de trigo. Actualmente se utilizan pesticidas que contienen cobre en diversas formulaciones químicas. Se utiliza en pinturas y recubrimientos para evitar la adherencia de microorganismos. Se ha demostrado que el efecto bactericida de la superficie del Cobre metálico es del 99.9% y se mantiene en aleaciones con al menos el 70% de cobre [68].

### 1.6.1. Nps de Cu

Al tener propiedades similares a las del oro y plata, con un costo menor es de interés en la producción de materiales bactericidas más económicos. Las Nps de Cu son muy reactivas y tienden a oxidarse, por lo que se han propuesto la estabilización de Nps de cobre con capas de moléculas orgánicas, materiales semiconductores y metales [69]. Se han sintetizado Nps esféricas de Cu con tamaño de 3 nm empleando bioreductores como el té de hierva de limón [70].

### 1.7. Nps de Ag y Cu

Los compuestos bimetálicos presentan propiedades de ambos metales. Se han sintetizado Nps de Ag-Cu por diversos métodos, uno de los más empleados involucra la reducción química de una solución que contiene la mezcla de precursores con los iones de ambos metales junto con un estabilizante para controlar las características de las Nps. Se han empleado extractos de origen vegetal como el chicozapote para reducir las soluciones y controlar el tamaño las partículas metálicas [40, 42, 71, 72].

Se han reportado diferentes efectos antimicrobianos del cobre y la plata, teniendo cepas en las que alguno de los dos metales solos tiene una menor o ninguna acción microbicida respecto al otro. El efecto antimicrobiano potenciado de compuestos bimetálicos se puede observar en la tabla 5, donde para la cepa *Bacillus Subtilis* la plata tiene una acción bactericida mayor a la del cobre, aumentando cuando se emplea una mezcla de ambos metales por separado (Ag+Cu), incrementándose de una forma drástica al reducir los dos metales juntos (Ag/Cu), disminuyendo considerablemente la Concentración Mínima Inhibidora (CMI), así como la Concentración Mínima Bactericida (MBC) [1, 5, 40, 44, 73].

Tabla 5. Pruebas de CMI y CML para nanopartículas de Ag, Cu, Ag+Cu y Ag/Cu (ácido ascórbico y quitosano) con 200 nm de tamaño, en cepas de *B. subtilis* y *E. coli* [40].

Bacteria	CMI (mg/L)				CML (mg/L)			
	Ag	Cu	Ag+Cu	Ag/Cu	Ag	Cu	Ag+Cu	Ag/Cu
<i>B. subtilis</i>	0.172	0.320	0.262	0.054	0.189	0.387	0.336	0.061
<i>E. coli</i>	0.199	0.433	0.327	0.076	0.199	0.470	0.379	0.081

El mecanismo concreto del efecto antimicrobiano de las Nps bimetálicas es debatible, ya que en la literatura aún se discute el mecanismo concreto para las partículas de cada metal por separado, aunado a que en este tipo de material depende la forma en que se unen los metales.

### 1.7.1. Efecto bactericida de las Nps

Los materiales pueden ser bacteriostáticos o bactericidas si pueden reducir o eliminar microorganismos patógenos. Si la concentración del material genera una lesión metabólica de los patógenos que es reversible al eliminar o neutralizar el material el efecto se conoce como bacteriostático, pero si el daño es irreversible afectando estructuras celulares vitales o la función de la misma se nombra efecto bactericida.[74]

En general las propiedades antimicrobianas dependen principalmente del tamaño, condiciones ambientales (pH y fuerza iónica), así como del agente estabilizante contenido en el extracto y en el caso de compuestos bimetálicos también interviene la composición del material.

La plata es el agente antimicrobiano más estudiado, por lo que se tiene mayor información en cuanto a su mecanismo de actividad microbiana, que engloba bacterias Gram-negativas (*E. coli*) y Gram-positivas (*S. aureus*). Los mecanismos de acción de la plata no se conocen muy bien, debido a que pueden ser una gran cantidad de mecanismos los que interactúan con los agentes microbianos para eliminar las células, algunas de las interacciones propuestas son [43, 74]:

- Interacción de las Nps de plata al penetrar la pared celular e interactuando con macromoléculas como enzimas y ADN a través de la liberación de electrones, liberación gradual de iones de plata o por la producción de radicales libres que impiden la producción de adenosín trifosfato (ATP) evitando que el ADN se duplique.
- Acción de iones de plata ( $Ag^+$ ) que por atracción electrostática se adhieren en la superficie de átomos o moléculas de la membrana celular cargadas electronegativamente (grupos fosfato, grupos tiol y ácidos nucleicos), formando complejos que inhiben la respiración y permeabilidad de la membrana, matando la célula.
- Acción directa de las Nps para dañar la membrana celular.
- Generación de especies reactivas de oxígeno que generan estrés oxidativo y la muerte celular.

Se ha reportado que el efecto bactericida de Nps de plata decrece cuando se incrementa el tamaño de la partícula. La forma de las Nps afecta esta propiedad como se apreció en un estudio donde las partículas de forma triangular truncadas tuvieron un efecto bactericida mucho mayor al de partículas de forma esférica y de rodillo. También se ha observado que éste efecto depende del tipo de microorganismo estudiado [43].

En el caso de cobre, se ha debatido si las Nps presentan actividad antimicrobiana solamente por suministrar iones de cobre o por presentar una toxicidad específica de la nanopartícula [1], puede proponer mecanismos similares a los de la plata. Sin embargo

varios autores describen que su mecanismo microbiano es provocado por la liberación de iones  $\text{Cu}^{2+}$ , que pueden dañar la membrana celular bacteriana, entrar en la célula y alterar su función enzimática, provocando muerte celular, aunado a que su baja solubilidad proporciona una liberación sostenida de  $\text{Cu}^{2+}$  [74].

Estudios recientes indican que la actividad antifúngica del cobre ocurre por un proceso denominado “muerte por contacto” en el que se afecta a lípidos y proteínas de la membrana, facilitando el paso de iones cobre a la célula, amplificando el daño. También se tiene un aumento de estrés oxidativo y no se ve daño aparente en el ADN celular [68].

La actividad antiviral del cobre se debe a la inactivación de una enzima proteasa que es importante para la replicación viral y daño de la envoltura fosfolipídica. Un ejemplo es la capacidad de destruir virus como el de la influenza A y el VIH en concentraciones tan pequeñas como 0.16-1.6 mM [68].

### 1.7.2. Propiedades ópticas de NpsM – Resonancia de plasmón superficial (RPS)

Las propiedades ópticas en las NpsM dependen de la composición del material. En la figura 5 se observa que la concentración de Au en una aleación Au-Ag (5d), el tipo de morfología (Fig. 5a ,5b, 6c) y tamaño (Fig. 5c, 5f), repercuten en la coloración que presenta la solución coloidal (Fig. 5d, e, f), pasando por una diversidad de colores, desde el azul al rojo en el caso del Au, mientras que en materiales microscópicos siempre presentan una coloración amarilla debida a la reflexión de la luz en su superficie. Este efecto en las nanopartículas es conocido como resonancia de plasmón superficial (RPS) [12].

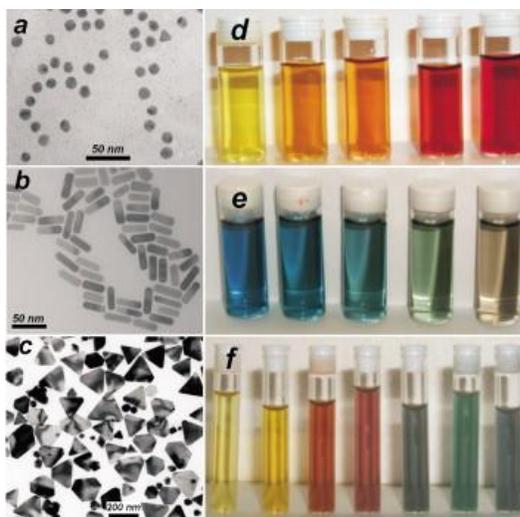


Fig. 5. Micrografía electrónica de transmisión de nanoesferas y nanorodillos (a, b) de Au y nanoprismas triangulares de Ag (c). Fotografías de nanopartículas de Au-Ag con incremento de concentración de Au (d), nanorodillos de Au con incremento en su relación de aspecto (e) y nanoprismas de Ag con incremento de tamaño (f) [12].

El “plasmón” es un fenómeno de oscilación colectiva de los electrones en la superficie del material, también se puede ver como un fenómeno vibratorio típico de los plasmas, en el que un gas fuertemente ionizado (plasma) tiene portadores de carga libres, que pueden interactuar fácilmente con radiación electromagnética de baja frecuencia, oscilando en resonancia con ésta [75].

Debido a la naturaleza de los metales, donde se tienen superposiciones de los orbitales discretos para formar bandas de conducción y valencia (Figs. 1 y 2), el interior se puede considerar como un “plasma sólido”, en que los átomos se pueden considerar puntos masivos fijos con carga positiva, rodeada de electrones libres que se mueven a través de las bandas de conducción, y de los huecos formados por los electrones promovidos desde las bandas de valencia. Los plasmones masivos son ondas cuantizadas de una colección de electrones móviles, que son producidas cuando una gran cantidad de estos son perturbados respecto de sus posiciones de equilibrio y vibran [75].

Cuando la frecuencia de la radiación incidente es igual a la frecuencia del plasmón la radiación se absorbe, si es menor que la frecuencia del plasmón, los electrones tienen tiempo de seguir perfectamente las oscilaciones del campo eléctrico oscilante de la radiación, y la onda es reflejada totalmente. Cuando la frecuencia de la radiación es mayor que la del plasmón, las cargas son incapaces de seguir la oscilación del campo eléctrico y entonces la onda es transmitida [75].

Los plasmones superficiales son plasmones asociados a la superficie de metales con frecuencias y energías menores a los masivos y que puede interactuar con radiación electromagnética produciendo el fenómeno conocido como resonancia de plasmón de superficie (SPR).

Los plasmones de superficie localizados, son oscilaciones colectivas de electrones restringidos en pequeños volúmenes metálicos (Nps). Para que el fenómeno ocurra se debe tener una partícula de tamaño mucho menor que la longitud de onda de la luz incidente. El campo eléctrico oscilante de la radiación incidente induce un dipolo eléctrico en la partícula, desplazando a una parte de los electrones móviles deslocalizados, en una dirección lejos del resto de la partícula metálica, generando una carga negativa en un lado de la partícula. Como el resto de los núcleos y sus electrones internos no se han desplazado, constituyen una carga opuesta positiva. En partículas pequeñas se produce un dipolo, pero en partículas grandes (a partir de 30 nm) se produce un cuadrupolo y en general multipolos [75], como los que se pueden observar en la figura 6 para partículas esféricas. En base a lo anterior, de acuerdo al tamaño y composición de estas partículas, así como a la interacción con su medio, cambiará el plasmón resultante; lo mismo ocurre cuando se tiene diferentes formas como barras o nanorodillos, donde las interacciones en la superficie son diferentes a otras formas del mismo tamaño, dando diferente coloración (Fig. 4)

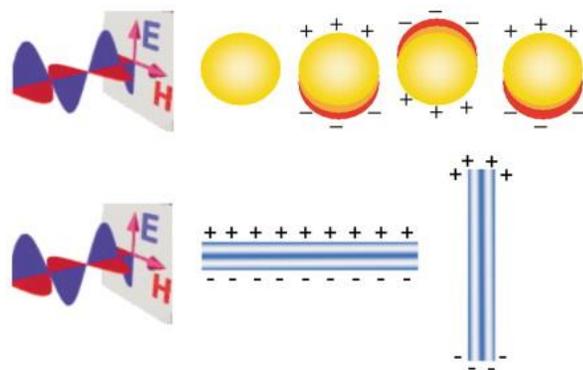


Fig. 6. Esquema de la interacción de radiación electromagnética con NPsM esféricas. Oscilaciones transversales y longitudinales de electrones en nanorodillos [75].

### 1.7.3. Composición de las Nps bimetálicas y propiedades ópticas

La naturaleza, forma y el medio de síntesis de las Nps les confieren sus propiedades ópticas, repercutiendo en el espectro Uv-vis. En los espectros de la figura 7 para Nps obtenidas mediante quitosano y ácido ascórbico, se presenta absorción a 415-450 nm para las partículas de Ag y entre 500-600 nm para cobre. Al mezclar ambas Nps el espectro presenta ambas señales (Fig. 7a Ag + Cu), las partículas bimetálicas presentan plasmones en un rango comprendido entre las señales de cada metal, acercándose a la señal de cada metal en la medida en que su concentración aumenta, como se aprecia en los espectros B, C y D de la figura 7b [40, 44]. En partículas de 50 nm con núcleo de Cu y coraza de Ag sintetizadas mediante ácido ascórbico, alcohol etílico,  $\beta$ -CDs (beta ciclo dextrina), solución de amonio e hidróxido de sodio, se tienen los espectros de la figura 8. Puede verse que tiende a aumentar la absorbancia para las partículas de Ag y Cu-Ag, presentando tendencias de absorción similares y que difieren de la curva de absorción del Cu, lo cual indica partículas con una superficie formada en su mayoría por Ag (Cu@Ag) [71].

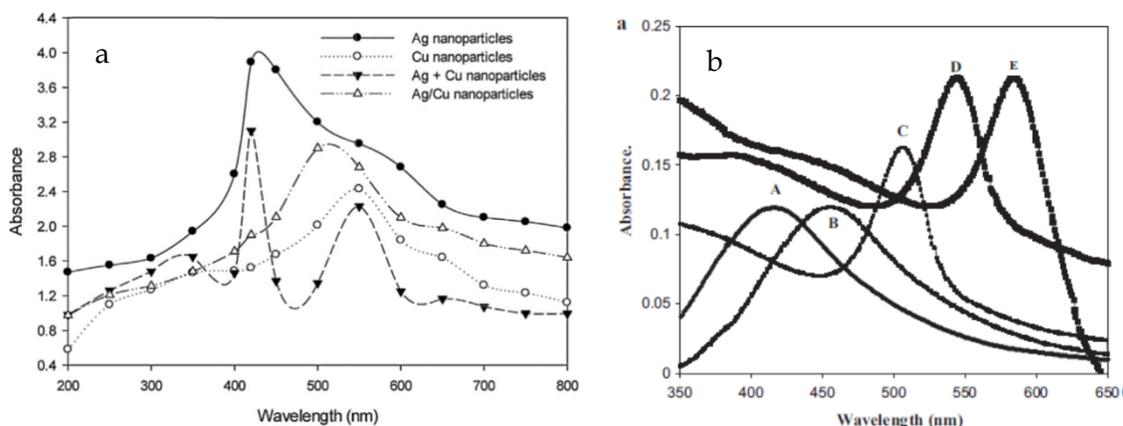


Fig. 7. Espectros Uv-vis. de nanopartículas sintetizadas con ácido ascórbico y quitosano compuestas por: a) Ag, Cu, Ag+Cu, Ag/Cu [40]. b) Relación molar Ag/Cu: A) 1:0; B) 0.75:0.25; C) 0.5:0.5; D) 0.75:0.25; E) 0:1 [44].

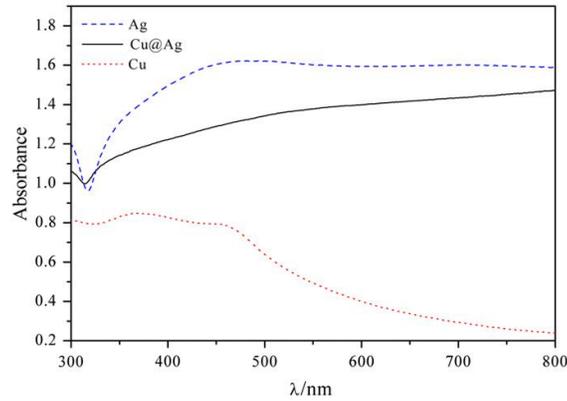


Fig. 8. Espectro Uv-vis. de nanopartículas obtenidas mediante ácido ascórbico, alcohol etílico,  $\beta$ -CDs (beta ciclo dextrina), solución de amonio e hidróxido de sodio [71].

En estudios más detallados para Nps bimetálicas se relaciona la forma en que se constituye la partícula y las propiedades en el espectro. En las figuras 9a y 9b, se observan imágenes TEM-EDS y espectros Uv-vis, respectivamente, de una síntesis  $\text{Ag}/\text{Cu}=0.25$ . En la figura 9 se observa la evolución en la composición de las partículas en el tiempo, en el espectro en 1.5 min se tiene una sola señal alrededor de 430 nm, a los 5 minutos se tienen dos señales alrededor de 430 nm y 540 nm que en la imagen TEM-EDS corresponden a las Nps de Ag (color verde) y la estructura de Ag/Cu (color amarillo) respectivamente, a los 17.5 minutos se observa la formación de núcleos Ag/Cu con una capa o coraza de Cu en color rojo (Ag/Cu@Cu) identificado en el espectro al presentar una señal pequeña cerca de los 600 nm para el núcleo bimetálico y una señal cerca de 900 nm para la coraza de Cu. En la imagen 10 se observa el cambio de coloración que sufren las muestras en éste proceso [72].

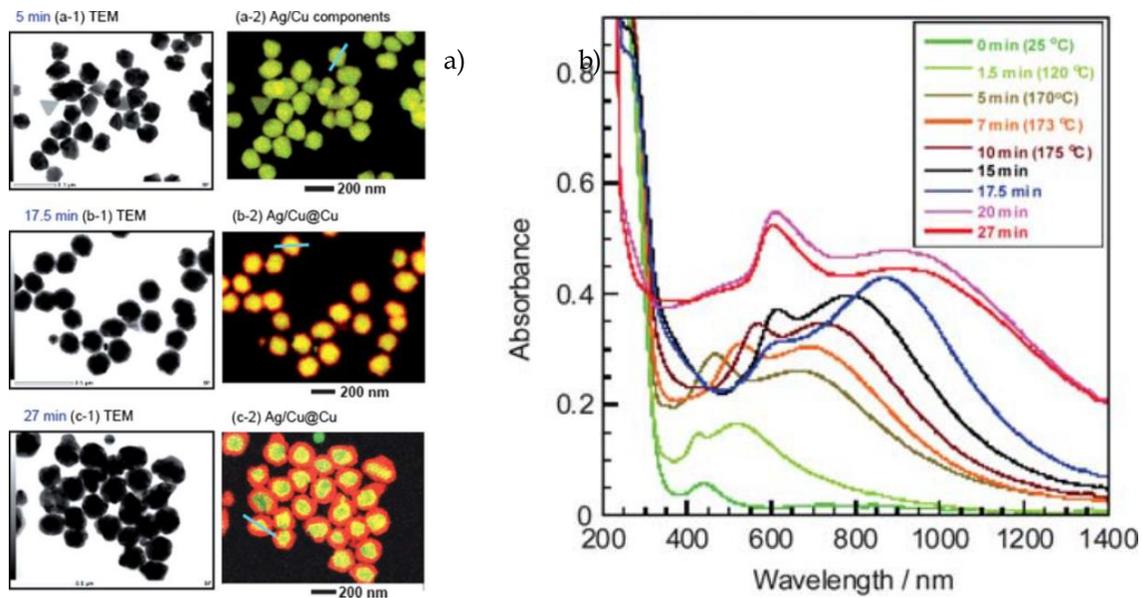


Fig. 9. a) Imagen TEM y TEM-EDS compuesta (verde para Ag y rojo para Cu) para nanopartículas bimetálicas Ag-Cu sintetizadas a partir de  $\text{AgNO}_3/\text{Cu}(\text{OAc})_2+\text{H}_2\text{O}/\text{PVP}$  mezclados en EG a una relación molar  $[\text{Ag}]/[\text{Cu}]=0.25$ . b) Espectro Uv-Vis de la cinética de crecimiento de las nanopartículas [72].

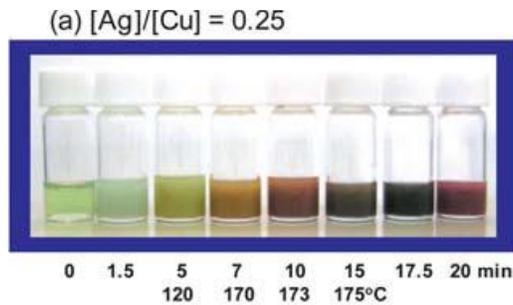
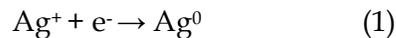


Fig. 10. Imagen de las partículas Ag/Cu=0.25 [72].

Algunos mecanismos de formación para las Nps bimetálicas que se presentan en el esquema de la figura 11 son [72]:

- a) No hay formación de semillas de alguno de los metales solos, sino que se forma la aleación, formándose una capa de Cu por el exceso del mismo. Formando un núcleo de Ag/Cu recubierto de una coraza de Cobre (Ag/Cu@Cu).
- b) No se forman semillas, pero por la naturaleza de los iones de plata y cobre, los primeros se aglomeran y reducen, formando las NPs de Ag, que posteriormente se cubre con las partículas de iones que se van reduciendo en su superficie, formando un núcleo de plata y una coraza de Cobre (Ag@Cu).
- c) Se forman semillas de plata y en partes de su superficie se forman las Nps de cobre.
- d) Se forman semillas de cobre, mientras las reacciones 1 y 2 están ocurriendo, además de que al mismo tiempo puede haber una reacción de remplazo (3) en el que al tener Nps de cobre este reduce 2 iones de plata y se oxida de  $\text{Cu}^0$  a  $\text{Cu}^{+2}$ .



- e) Se forman las Nps de cobre formando semillas sobre estas semillas se empiezan a depositar los átomos metálicos de plata, formando un núcleo de cobre y una coraza de plata.

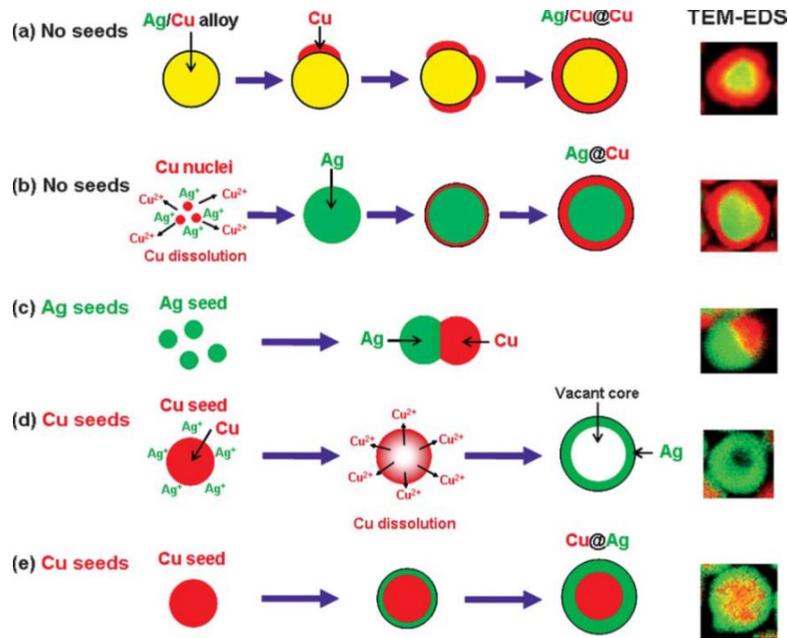


Fig. 11. Mecanismos de crecimientos para a)aleación Ag/Cu, b)núcleo Ag coraza Cu (Ag@Cu), c)Ag/Cu bicompartida, d)huecas y e)núcleo Cu coraza Ag (Cu@Ag), empleando métodos sintéticos a base de polioles [72].

## 1.8. Microorganismos

Son un grupo heterogéneo de seres vivos que solo pueden observarse a través de un microscopio, presentan estructuras unicelulares, ya sea aislados o en grupos de células; también comprende a los virus, que son microscópicos pero no son celulares. Los microorganismos influyen fuertemente en la vida y constitución tanto física como química del planeta. Se encargan de los ciclos de los elementos químicos necesarios para la vida, algunos microorganismos son responsables del deterioro de alimentos o de enfermedades, otros resultan beneficiosos y se utilizan para modificar las propiedades de los alimentos (fermentaciones), así como en la investigación y desarrollo de medicamentos o en aplicaciones ecológicas, agropecuarias y tecnológicas entre otras. El 90% de las células en el cuerpo humano corresponden a microbios[76].

La diversidad microbiana se aprecia en la variedad estructural y funcional de los microorganismos, sus variaciones en el tamaño celular, en la morfología, en la división celular, o bien en la capacidad metabólica y de adaptación. Actualmente, el estudio del material genético (ADN y ARN) revela la existencia de miles de millones de especies microbianas [77].

### **1.8.1. Bacterias**

Son microorganismos procariotas que generalmente presentan tamaños entre 0.5-5  $\mu\text{m}$  de longitud y diversas formas incluyendo filamentos, esferas (cocos), barras (bacilos), sacacorchos (vibrios) y hélices (espirilos). A diferencia de las células eucariotas (animales, plantas, hongos, etc.), no tienen el núcleo definido, generalmente no presentan orgánulos membranosos internos. La mayoría posee una pared celular compuesta de peptidoglicano. Muchas bacterias son móviles y disponen de flagelos o de otros sistemas de desplazamiento. El sistema inmunológico permite que la mayoría de bacterias sea inofensiva o beneficiosa, algunas bacterias patógenas pueden causar enfermedades infecciosas.

Son los organismos más abundantes del planeta, se encuentran en todos los hábitats terrestres y acuáticos. Son imprescindibles en el reciclaje de los elementos ya que pasos importantes de los ciclos biogeoquímicos como la fijación del nitrógeno atmosférico dependen de bacterias.

### **1.8.2. Bacterias Gram-positivas**

Son bacterias que se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram. Su pared celular se compone de una capa gruesa de peptidoglicano rodeando la membrana citoplasmática, como se aprecia en el esquema de la figura 12. La capa de peptidoglicano confiere una gran resistencia a estas bacterias y retiene el tinte Cristal Violeta durante la tinción de Gram.

Incluyen especies móviles (vía flagelos) e inmóviles con forma de bacilo (*Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Listeria*) o coco (*Staphylococcus*, *Streptococcus*); pueden presentar paredes gruesas o no, como el género *Mycoplasma*. La mayoría son heterótrofas, aunque hay especies fotosintéticas. Tienen a formar endosporas en condiciones desfavorables, como *Bacillus* y *Clostridium* [78].

### **1.8.3. Bacterias Gram-negativo**

Tienen una capa delgada de peptidoglucano y presentan una segunda membrana lipídica externa a la pared celular (Fig. 12). La pared fina de peptidoglucano no retiene el colorante, tiñéndose de rosa (Safranina) [78].

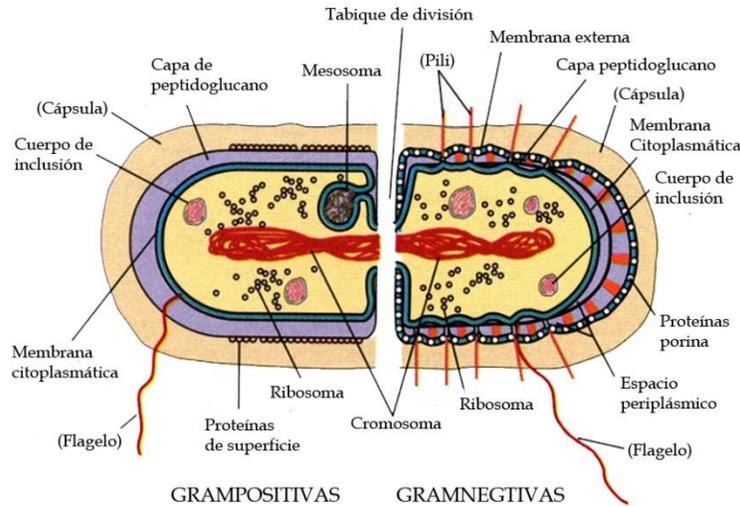


Fig. 12. Esquema de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas [79].

#### 1.8.4. *Staphylococcus aureus*

Bacteria presente en el hombre y animales de sangre caliente en la mucosa nasal, piel, alimentos y agua. Provoca desde pequeñas infecciones en la piel que causan forúnculos, ampollas, vejigas y abscesos cutáneos; hasta enfermedades como neumonía, meningitis, endocarditis, síndrome de Shock tóxico (SST) y sepsis. La dosis infectiva mínima (DIM) es de 1µg que equivale a 1 000 000 de células viables[80].

El género *Staphylococcus* está formado por cocos Gram positivos, con diámetro de 0.5-1.5 µm, agrupados como células únicas, en pares o tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uva. Ogston introdujo el termino *Staphylococcus* del griego staphyle que significa racimo de uvas, para describir a los cocos responsables de inflamación y supuración. Son bacterias no móviles, no esporuladas, no poseen cápsula aunque existen algunas cepas que desarrollan una cápsula de limo, son anaerobias facultativas. La mayoría de los *Staphylococcus* producen catalasa (enzima capaz de desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre); característica que se utiliza para diferenciar el género *Staphylococcus* de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* que son catalasa negativos, son coagulasa positivo y oxidasa negativo, fermenta glucosa, lactosa y maltosa[80].

En los medios de cultivo tradicionales la mayoría de las especies crecen después de incubarse durante 18-24 horas, formando colonias de 0.5-1.5 mm de diámetro. Las colonias de *S. aureus* son grandes, lisas, enteras, brillantes, convexas presentan consistencia cremosa, suelen estar pigmentadas con colores que van del gris al amarillo o naranja porcelana debido a la producción de carotenoides; en condiciones anaerobias o en caldos

no produce pigmento. Algunas cepas de *S. aureus* presentan  $\beta$ -hemólisis o hemólisis total alrededor de las colonias cuando se cultivan en agar sangre, se diferencia de las demás especies por producir coagulasa que se manifiesta por su capacidad para coagular el plasma, es resistente al calor a la desecación y crece en medios con grandes cantidades de NaCl (7.5%). Crece en un amplio rango de temperaturas que van desde los 6.5-50°C, siendo lo óptimo 30-40°C [80].

### **1.8.5. *Escherichia coli***

Descrita por primera vez en 1885 por Theodore Von Escherich, son bacterias que se encuentran en los intestinos de todos los animales y humanos por lo que está en aguas negras. El proceso digestivo del ser humano necesita de cepas inocuas.

Es un bacilo corto Gram-Negativos, pertenecen a la familia de Enterobacterias, no forma esporas, móviles (flagelos peritricos), mide 0.5x3  $\mu$ m de largo, catalasa positivos, oxidasa negativos, reduce nitratos a nitritos, producen vitamina B y K, fermenta lactosa, glucosa y lactosa con producción de gas, anaerobio facultativo, puede presentar plásmidos o no y sobrevivir sin estos [81, 82].

Para aislar e identificar la *E. coli* se debe de tomar una muestra a 37 °C en medio selectivo y condiciones aeróbicas. Las colonias de *E. coli* en agar E.M.B. (eosina y azul de metileno) tienen de 2-4 mm de diámetro, un centro grande de color oscuro e incluso negro y tiene brillo verde metálico cuando se observan con luz reflejada. En agar MacConkey las colonias son guindas con halo turbio[82].

Existen muchas cepas de *E. coli* que son inofensivas, pero hay una variedad que produce una potente exotoxina (Shiga) y puede provocar enfermedades graves. Actualmente mediante técnicas de identificación genética se clasifican según el factor genético que define su virulencia y cuadro clínico asociado, aunque aún se realizan pruebas bioquímicas para evidenciar el mecanismo de patogenicidad. Las cepas de *E. coli* poseen numerosas adhesinas muy especializadas por lo que permanece en el aparato urinario y digestivo [81, 83].

Los brotes epidémicos se producen cuando la bacteria llega a los alimentos como carne de ganado vacuno y leche no pasteurizada, vegetales lavados con agua contaminada, falta de higiene al ir al baño.

### 1.8.6. *Aspergillus niger*

Hongo que produce un moho negro en vegetales como lechuga, tomate y acelga.

*Aspergillus niger* es un hongo micelial ambiental, formado por hifas hialinas tabicadas.

Taxonomía:

Reino: Fungi, Phylum: Ascomycota, Clase: Eurotiomycetes, Orden: Eurotiales, Familia: Aspergillaceae, Género: *Aspergillus*, Especie: *niger*.

La colonia presenta un diámetro de 60 mm en una semana, es liso a menudo con pliegues radiales, tiene textura arenosa, el micelo es de color blanco o amarillo, cubriéndose paulatinamente de cabezas esporuladas de color negro a negro púrpura (Fig. 13a). El reverso de la colonia parece una tela gamuzada de color gris-amarillento, lo que distingue la *A. niger* de otros hongos con colonias oscuras [84, 85].

Al observar en microscopio se tiene un hongo micelial formado por hifas hialinas tabicadas, las partes del *A. niger* se muestran en el esquema de la figura 13b, posee un conidióforo liso o ligeramente granular que mide 1,5 a 3 mm de largo, con una pared gruesa. Suelen ser hialinos o pardos, se puede observar abundantes conidios con aspecto variable: entre ellos globosas, subglobosas, elípticas, lisas, equinuladas, verrugosas o con estrías longitudinales, todas de color negro. Las vesículas son globosas, hialinas o manchadas de pardo oscuro, que miden 75  $\mu\text{m}$  de diámetro. Por lo general no son observables, debido a lo denso de la acumulación de los conidios negros. Las fiálides se presentan en dos series radiadas [84].

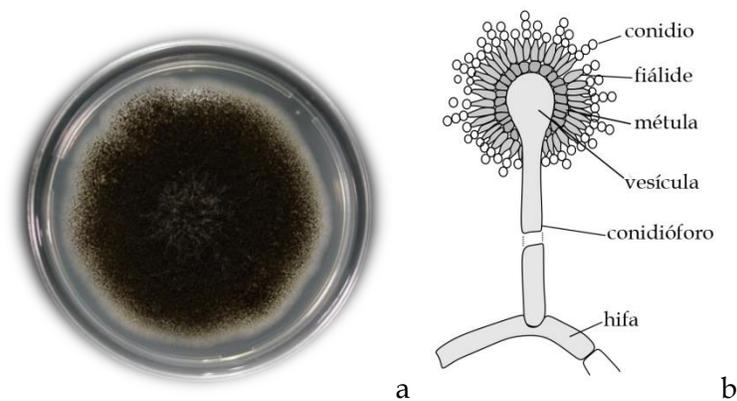


Fig. 13. Cepa del *Aspegilua niger* en PDA (a) y esquema del hongo (b) [86].

## CAPÍTULO II

### 2.1. JUSTIFICACIÓN

En la bibliografía consultada se ha reportado la eficiencia antimicrobiana de nanopartículas bimetálicas Ag/Cu, la cual es mayor que las partículas metálicas de sus componentes por separado. De igual manera, se registra información sobre la síntesis de nanopartículas de Ag por el método de bio-reducción con el extracto de la planta *Ricinus communis*. Debido a ello, la síntesis de las nanopartículas bimetálicas Ag/Cu por éste método resulta de interés ya que la planta citada se encuentra ampliamente diseminada en la república mexicana, lo que permite aprovechar los recursos naturales y aprovechar la sinergia debido a las propiedades antimicrobianas reportadas para el extracto de la hoja de la planta y las nanopartículas bimetálicas.

### 2.2. HIPÓTESIS

Mediante el extracto acuoso de *Ricinus communis* como agente bio-reductor se logrará obtener nanopartículas bimetálicas Ag /Cu menores a 100 nm, con propiedades antibacteriales y antifúngicas.

### 2.3. OBJETIVO GENERAL

Obtener por biosíntesis con el agente reductor *Ricinus communis*, nanopartículas bimetálicas de Ag/Cu para la determinación de sus propiedades antibacterianas y antifúngicas.

### 2.4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener nanopartículas bimetálicas de Ag/Cu mediante el extracto acuoso de *Ricinus communis*.
- Caracterizar las nanopartículas bimetálicas Ag/Cu por: UV-VIS, SEM, TEM, EDS, IR.
- Evaluar las propiedades antibacterianas y antifúngicas de las nanopartículas bimetálicas Ag/Cu.

## 2.5. METAS

- Encontrar las concentraciones idóneas del extracto de *Ricinus communis*, así como de las soluciones de Ag y Cu, para la obtención de nanopartículas bimetálicas.
- Llevar a cabo la cinética de reducción mediante espectroscopia Uv-Vis, para encontrar el mejor tiempo de reducción, tamaño y distribución de tamaño de partícula.
- Determinar la forma, tamaño y distribución de tamaño mediante TEM.
- Caracterizar muestras por: SEM, EDS, IR.
- Evaluar las propiedades microbiológicas, mediante la determinación de la CMI y CML.

## CAPÍTULO III. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

### 3.1. Técnicas espectroscópicas moleculares

Se basan en la medición de los fenómenos resultantes entre la interacción de las moléculas que constituyen la materia y la radiación del espectro electromagnético de determinadas energías (Fig. 14). Las técnicas muestran graficas de barridos (espectros) que indican la interacción de una determinada onda electromagnética de energía característica, expresadas como longitud de onda ( $\lambda$ ), número de onda ( $\tilde{\nu}$ ) o frecuencia ( $f$ ), con la muestra, midiendo la absorción, transmisión o reflexión entre otras (Fig. 15), según la técnica en específico [87].

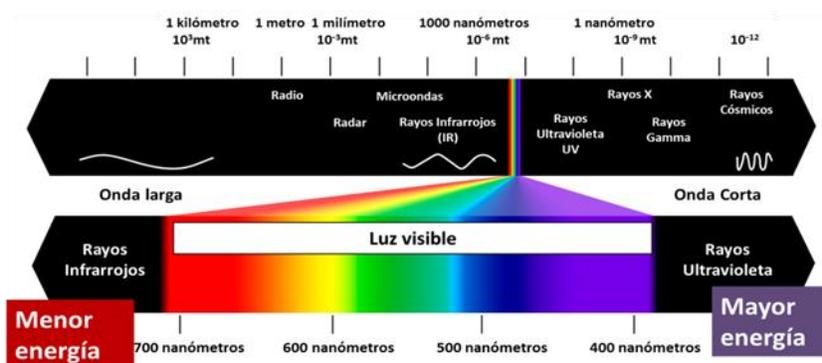


Fig. 14. Espectro electromagnético [88].

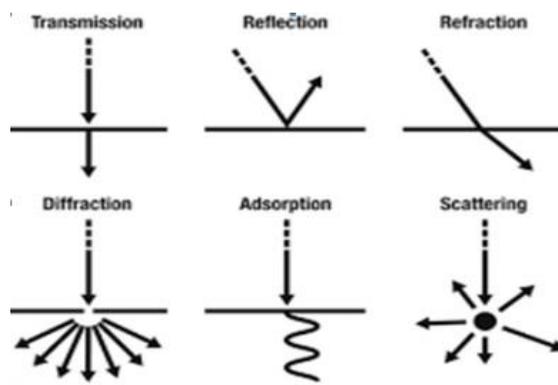


Fig. 15. Interacciones del espectro electromagnético con la materia [87].

#### 3.1.1. Espectroscopia ultravioleta-visible (uv-vis)

La técnica mide la absorción de energía electromagnética por los átomos o moléculas que constituyen la muestra; como resultado, estas partículas pasan del estado de más baja energía a estados de mayor energía, o estados excitados.

Los átomos, moléculas o iones tienen un número limitado de niveles de energía cuantizada discreta; para que se produzca absorción de radiación, la energía del fotón excitante debe igualar a la diferencia de energía entre el estado fundamental y uno de los estados excitados de la especie absorbente [89].

En la figura 16 se esquematizan las facilidades relativas con las que se puede excitar a las moléculas, siendo el de mayor excitación el cambio de  $\sigma$  a  $\sigma^*$  [90].

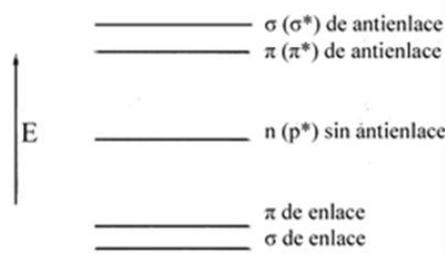


Fig. 16. Diagrama de excitaciones en moléculas al absorber energía radiante UV-VIS [90].

La espectroscopia ultravioleta comprende transiciones electrónicas ocurridas por la absorción de energía de ondas electromagnéticas en la región entre 200-380 nm, la región del espectro visible es de 380-800 nm [91].

#### Instrumentación:

El equipo hace incidir un haz de luz monocromático (una sola longitud de onda) a través de un cuerpo (celdas), el cual absorbe o deja pasar una cantidad de la luz incidente, generando una señal de absorbancia o de transmitancia en el detector debida a la diferencia de la intensidad del haz entrante y la intensidad del haz resultante. El proceso se lleva a cabo con diferentes longitudes de onda desde el rango del ultravioleta al visible, generando un espectro de transmisión u absorción para la muestra [92].

Espectrómetro de registro de haz doble.

El diagrama de la figura 17 ilustra un espectrofotómetro de “doble haz en el tiempo”. La fuente de radiación electromagnética está conformada por lámparas de tungsteno (radiación visible) y de hidrógeno (radiación uv). El haz se monocromatiza y se separa mediante un disco rodante con espejos y espacios vacíos, que dirige el haz de forma intermitente a la celda de referencia y la celda de la muestra. Los impulsos de la radiación son recombinados por un espejo de red, que transmite el haz de referencia y refleja el haz de la muestra al detector, comparando ambas intensidades de luz para obtener una lectura [93]. Solo unos cuantos milisegundos separan los haces que pasan por las dos celdas. El método compensa las pequeñas fluctuaciones en la radiación emitida [91].

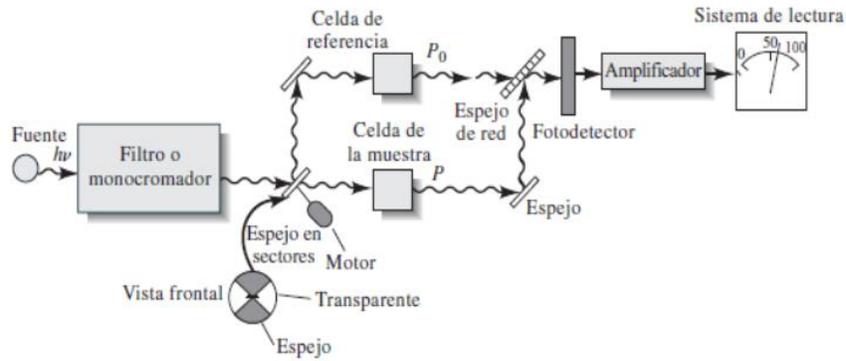


Fig. 17. Espectrofotómetro de “doble haz en el tiempo” [93].

El esquema de la figura 18 pertenece al sistema óptico de un espectrofotómetro de “haz doble alternado” del modelo Cary 16, similar al equipo utilizado experimentalmente en la presente tesis. El funcionamiento difiere al diagrama anterior por contar con dos lentes que enfocan la alternancia del haz sobre el detector en lugar del espejo enrejado [91].

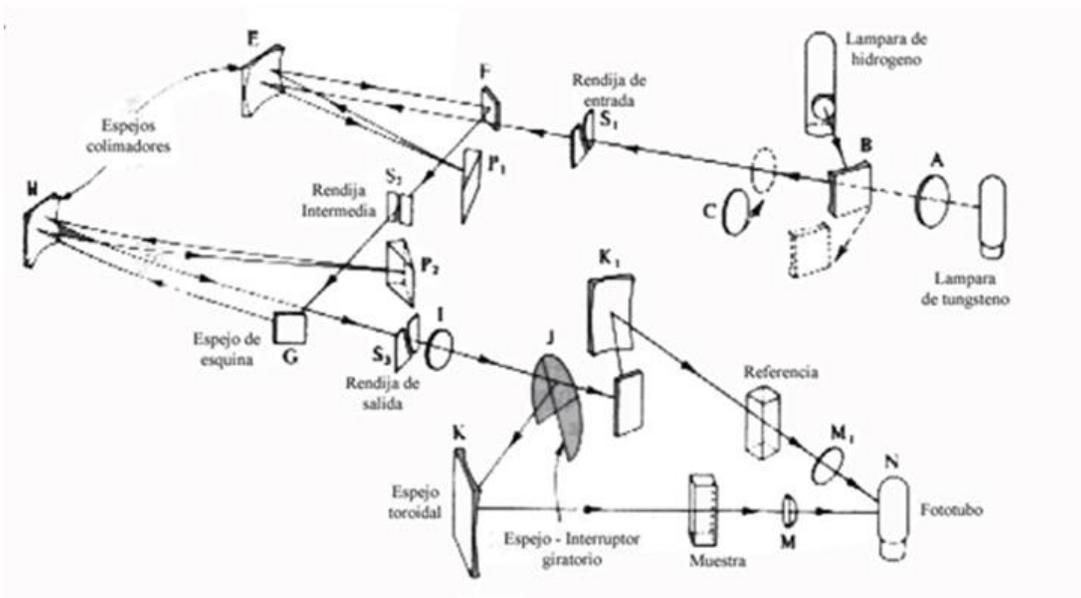


Fig. 18. Espectrofotómetro de haz doble alternado Cary 16 [93].

*Utilidad:*

Debido a que los electrones están limitados a modos específicos de transiciones en partículas nanométricas metálicas de acuerdo a su tamaño y forma, permite observar el fenómeno de absorción conocido como plasmón, en las nanopartículas de plata y de cobre. En Nps bimetalicas Ag-Cu, se esperan señales entre 425 nm (Ag) a 580 nm (Cu), como se ve en los espectros de las figuras 7 y 8 [40]. La absorción varía de acuerdo al medio, el

crecimiento, morfología y cantidad de las partículas con respecto al tiempo, permitiendo estudiar la cinética de la reacción como se aprecia en la figura 19 [4].

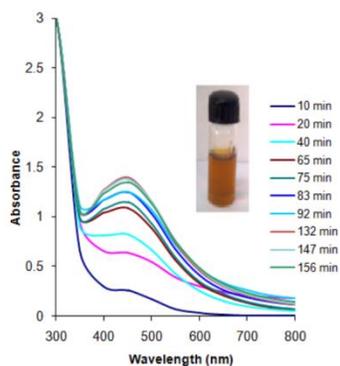


Fig. 19. Espectro Uv-Vis para nanopartículas sintetizadas a partir de  $\text{AgNO}_3$  (1mM) con extracto de hoja de *Ricinus communis* a lo largo de 3 horas [4].

### 3.1.2. Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

Técnica que hace incidir un haz de radiación electromagnética con longitud de onda comprendida en el rango del Infrarrojo en una muestra, generando cambios energéticos vibracionales y rotacionales (Fig. 20) para cada longitud de onda, que se expresa como frecuencia o número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) [92].

La espectroscopia infrarroja muestra bandas de absorción resultantes de las transiciones vibracionales debidas a que la molécula tiene multitud de niveles de energía cuantizados (estados vibracionales), directamente asociado con los enlaces que mantienen juntas a las moléculas. En el proceso de absorción, la fuente debe de emitir radiación a frecuencias que correspondan exactamente a las energías indicadas por las longitudes de onda que se absorbieron [89, 93].

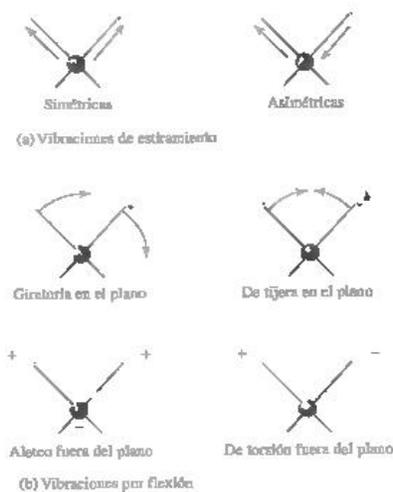


Fig. 20. Izquierda. Tipos de vibración molecular en el Infrarrojo. [93].

Las vibraciones moleculares varían de acuerdo a las longitudes de onda que tienen el efecto energético necesario para llevar a cabo dichas vibraciones. Para separar las longitudes de onda de la fuente emisora, es necesario modular la señal de la fuente y pasarla a través de la muestra mediante un camino que permita guardarla como un interferograma, que es decodificado subsecuentemente por una transformada de Fourier [92].

### Instrumentación

La tabla 6 muestra las tres zonas en las que se divide la región infrarroja y con las cuales se identifica la capacidad de lectura de los equipos [94].

Tabla 6. Regiones del espectro infrarrojo [94].

	Región del Espectro Electromagnético			
	Infrarrojo cercano		Infrarrojo medio	Infrarrojo lejano
Número de ondas, $\text{cm}^{-1}$	12500	4000	200	10
Longitud de onda, $\mu\text{m}$	0.8	2.5	50	1000
Fuente de radiación	Lámpara de filamento de tungsteno	Lámpara de Nernst, Global, o bobina de alambre de Nichrome	Lámpara de arco de mercurio de alta presión	
Detector	Sulfuro de plomo fotoconductor	Termopar, bolómetro Golay	Golay, piroeléctrico	

La figura 22 muestra el diagrama y el esquema de espectrofotómetro infrarrojo con transformada de Fourier, sus partes constan de:

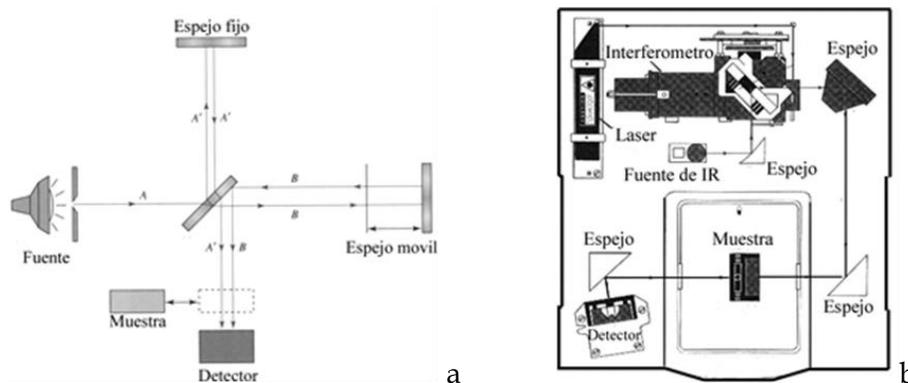


Fig. 21. Diagrama (a) [93] y esquema (b) [92] de la configuración óptica de un espectrofotómetro IRTF.

Fuente: Proporciona la radiación.

Interferómetro: Divide en dos el haz de la fuente para lograr una interferencia constructiva y destructiva de uno de los haces formados [89], modulando la radiación infrarroja antes de llegar a la muestra mediante el movimiento de un espejo en la parte izquierda [93].

Láser: Proporciona una luz roja proveniente de un láser de He-Ne, que permite una señal de referencia para los datos adquiridos del detector [91].

Detector: Permite transformar la radiación incidente en señales electrónicas, de las que se obtiene el interferograma [90].

En el equipo de la figura 21 la radiación con todas las frecuencias de la fuente de IR es reflejada en el interferómetro, entonces la radiación modulada es reflectada con los espejos a través de la muestra. Y se hace incidir en el detector. Un sistema de adquisición de datos conectado al detector guarda la señal en la memoria de la computadora como un interferograma, los datos se tratan mediante la transformada de Fourier para obtener el espectro [93]. Actualmente, los equipos implementan el principio de la reflectancia total atenuada, ya que permite colocar la muestra, directamente en la superficie de un sólido con alto índice de refracción, haciendo el proceso más económico y rápido.

### Espectrometría de reflectancia total atenuada (ATR)

Cuando un haz de radiación pasa de un medio denso a uno menos denso, hay reflexión. La fracción del haz incidente que se refleja es mayor a medida que aumenta el ángulo de incidencia; más allá de un cierto ángulo crítico, la reflexión es completa. En el proceso de reflexión el haz penetra una cierta distancia en el medio menos denso antes de reflejarse, profundidad puede variar y depende de la longitud de onda, del índice de refracción de los dos materiales y del ángulo que forma el haz incidente con la interface. La radiación que penetra se denomina onda evanescente. A longitudes de onda en las que el medio menos denso absorbe la radiación evanescente, ocurre atenuación del haz, lo cual se conoce como reflectancia total atenuada (ATR, por sus siglas en inglés). El espectro de resultante es semejante al espectro infrarrojo [92].

### Instrumentación ATR

En la figura 22a se muestra un aditamento para la medición de la reflectancia total atenuada. La muestra, en este caso, un sólido, se coloca sobre las caras opuestas de un material cristalino transparente con un alto índice de refracción. Al efectuar ajustes adecuados del ángulo incidente, la radiación experimenta múltiples reflexiones internas antes de pasar del cristal al detector. En cada una de esas reflexiones, tiene lugar la absorción y la atenuación. En la figura 22b se muestra un esquema óptico de un adaptador

que se instala dentro del área de la muestra, en la mayoría de los espectrómetros de infrarrojo y permite medir la reflectancia total atenuada. En equipos actuales la parte del porta muestras solo tiene una superficie del sólido con alto índice de refracción (normalmente diamante) expuesta, sobre la que se coloca el material a analizar.

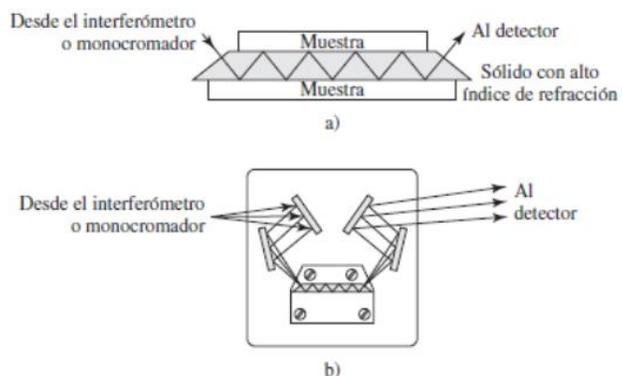


Fig. 22. Diagrama del camino óptico (a) y esquema (b) de un aditamento ATR [92].

### Utilidad

Permite observar las vibraciones en los enlaces de las moléculas orgánicas, lo que conlleva a un estudio estructural al identificar grupos funcionales en las moléculas del extracto acuoso.

## 3.2. Microscopía electrónica

Un microscopio es un instrumento que permite magnificar el tamaño de las muestras para observar detalles con dimensiones menores al límite de resolución del ojo humano.

En la microscopía electrónica se estudia la interacción de los electrones con la materia para obtener información estructural y conformacional. El microscopio óptico emplea luz visible que tiene una longitud de onda muy grande ( $\lambda \sim 0.5 \mu\text{m}$ ) como para observar la estructura de la materia, el microscopio electrónico emplea electrones acelerados con  $\lambda$  asociada bastante menor de  $1 \text{ \AA}$ , obteniendo resoluciones atómicas.

Las partes fundamentales de un microscopio electrónico son en general las mismas que aquellas presentes en un microscopio óptico, ambos incluyen lentes condensadoras, objetivas, intermedias y proyectoras. La diferencia radica en el sistema de iluminación, el primero utiliza electrones, mientras que el segundo utiliza luz (Fig. 23).

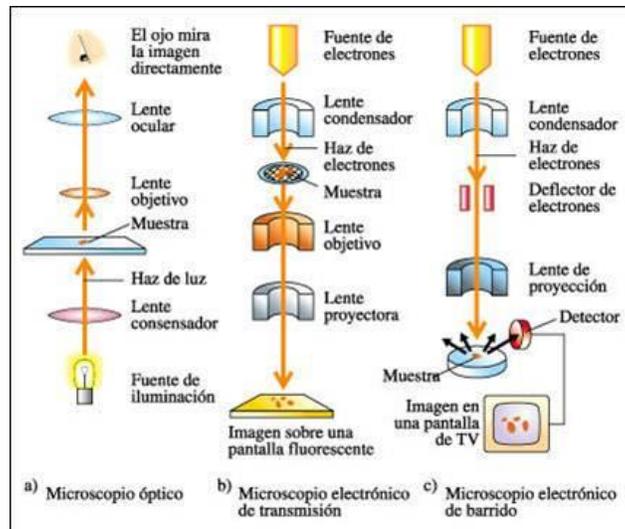


Fig. 23. Formación de imagen en microscopio óptico (a), electrónico de transmisión (b) y electrónico de barrido (c) [95].

### 3.2.1. Conceptos básicos de microscopía electrónica

Los electrones en el microscopio electrónico (ME) se generan por efecto termo-iónico en un filamento (cátodo) que es generalmente wolframio, y se monocromatizan acelerándolos a través de un potencial (E) en un sistema sometido a vacío. Para un voltaje de 100 kV, la longitud de onda asociada a los electrones es  $0.037 \text{ \AA}$  ( $0.01 \text{ \AA}$  para 1 MV). La interacción entre los electrones y la materia es tan fuerte que no se cumple la teoría cinemática (fenómenos de difracción múltiples), obteniendo diferentes fenómenos a partir de los que se obtiene diferente información del material (Fig. 24).

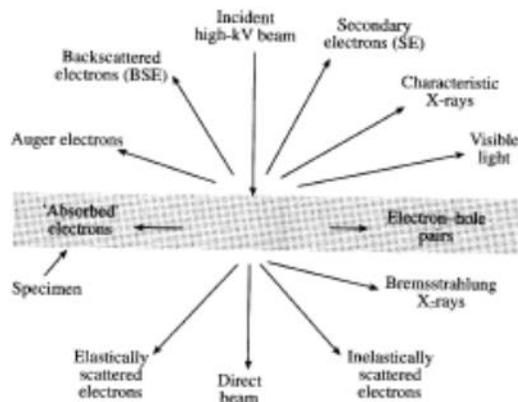


Fig. 24. Señales generadas por la interacción de un haz de electrones de alta energía y la muestra [96].

Con la postulación de los conceptos cuánticos y el establecimiento del carácter ondulatorio de las partículas se dio lugar al desarrollo de los microscopios electrónicos de barrido y de transmisión, dado que los electrones son partículas cargadas, las lentes son bobinas electromagnéticas, los dispositivos diseñados para dirigir y enfocar haces de partículas

cargadas obedecen las leyes de la óptica desarrollada para lentes de vidrio, de ahí su denominación “lentes”. Una lente electromagnética típica se diseña para proveer un campo magnético prácticamente paralelo a la dirección en que viajan los electrones que al entrar al campo de la lente (Fig. 25) experimenta un campo magnético  $B$ , así la trayectoria helicoidal del haz sigue un radio cada vez más estrecho causando que el haz de electrones que entra a la lente converja en un punto. En el caso de lentes electromagnéticas sólo se emplean lentes convergentes [94].

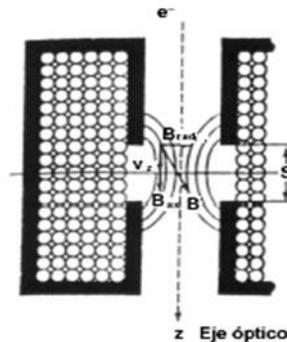


Fig. 25. Interacción de lente electromagnética con el haz de electrones [96].

La fuente de iluminación (“cañón electrónico”) es un cátodo de filamento metálico caliente, del que los electrones emitidos son atraídos a través de una apertura en el ánodo y entonces se enfocan por un condensador anular “lente”, para converger sobre la muestra. La calidad e intensidad de la imagen es afectada por la temperatura del filamento, la corriente, voltaje, y otros ajustes del cañón.

Las cámaras del microscopio electrónico rodean el haz de electrones para enfocarlos. Se emplean campos electromagnéticos. Variando la fuerza de los campos de estas lentes se varía su magnificación, así la constancia de los controles eléctricos es esencial [96].

Los instrumentos operando bajo alto vacío, debido a que los electrones no pueden viajar lejos en el aire.

### 3.2.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

En la figura 26 se muestra el diagrama de un microscopio electrónico de barrido donde a partir de una fuente de emisión de electrones, localizada en la parte superior, se genera un haz de electrones acelerados con energías del orden de KeV, que viaja a lo largo de la columna de vacío. El haz se focaliza con la muestra a través de lentes electromagnéticas ubicadas en la parte media superior de la columna (lentes condensadoras de objetivo) y es barrido a lo largo de la muestra por las bobinas de barrido, cuando el haz primario entra en contacto con la superficie de la muestra, parte de los electrones es reflejada y otra parte penetra unas pocas capas atómicas, siguiendo una trayectoria complicada antes de volver

a emerger a la superficie. La intensidad de estas dos emisiones varía en función del ángulo que forma el haz incidente con la superficie del material, es decir, depende de la topografía de la muestra. Las señales emitidas se recogen mediante un detector y se amplifican. Los electrones dispersados y secundarios son registrados por un detector de electrones, el haz se recorre sobre la superficie de la muestra para que con ayuda el detector la computadora genere una imagen [97].

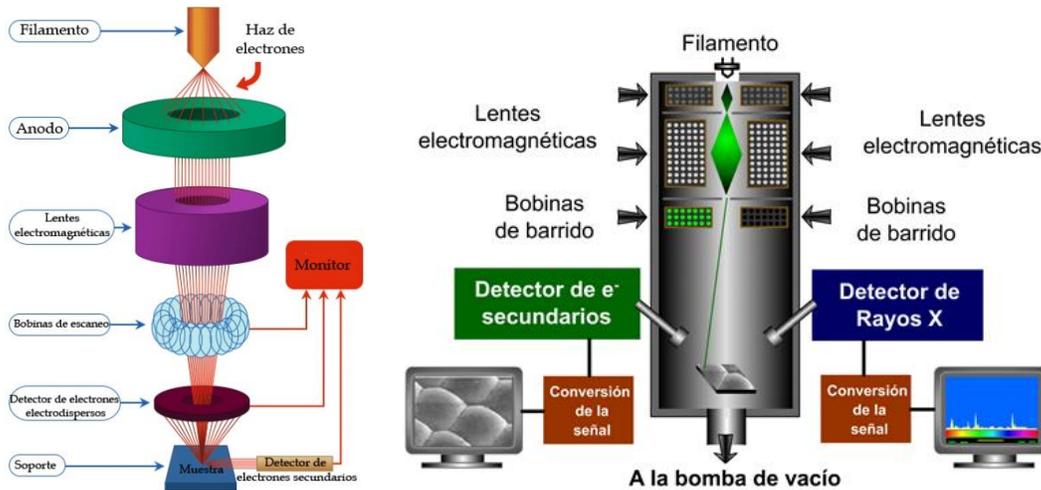


Fig. 26. Diagrama óptico del Microscopio electrónico de barrido [98] y localización de los instrumentos [99].

### Utilidad

Las imágenes formadas por electrones retrodispersados dan información de la composición química ya que el brillo de la imagen depende del número atómico del material que los retrodispersó.

Las imágenes de electrones secundarios dan información sobre la topografía de la muestra.

### 3.2.3. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Técnica en que en una columna al vacío se genera un haz de electrones focalizado de una fuente localizada en la parte superior de la columna, que se hace incidir mediante lentes electromagnéticas sobre una muestra que se encuentra en una rejilla localizada en la parte media baja de la columna. Cuando el haz atraviesa la muestra proyecta sobre una pantalla fluorescente localizada en la parte inferior de la columna, la sombra generada por los electrones procedentes de la muestra la cual depende de la densidad y conformación química de la muestra (Fig. 27). Los instrumentos completos incluyen: filamento, lentes, zona de muestras, y pantalla o plato fotográfico operando bajo alto vacío.

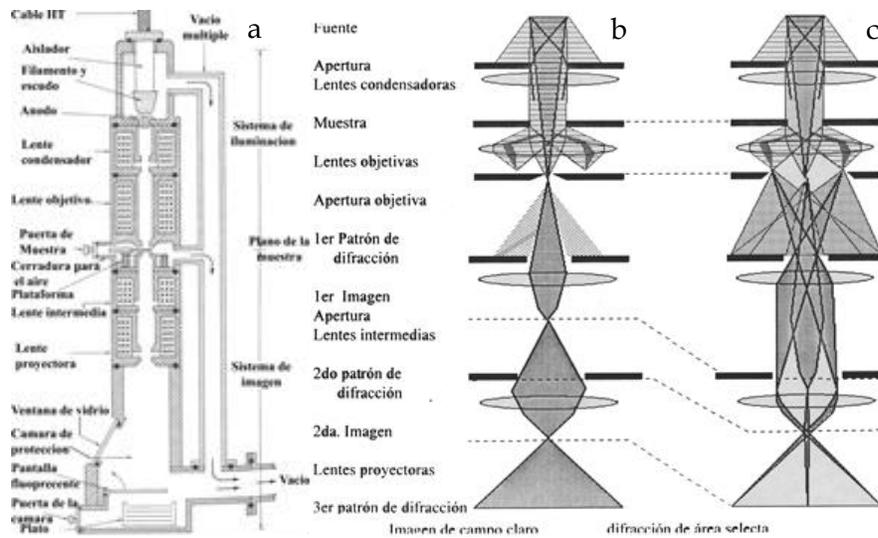


Fig. 27. Esquema del microscopio de transmisión electrónica (a). Esquema óptico de la formación de imagen de campo claro (b) y del patrón de difracción de electrones (c) en el TEM [96].

## PATRÓN DE DIFRACCIÓN ELECTRÓNICA

Si la estructura de un material está formada por una serie de espacios regulares ó enrejados de átomos como en un cristal, un haz de electrones que pasa a través de él, será dispersado en haces discretos por ser reflejado en los enrejados de las estructuras. Si el haz luminoso es coherente, los rayos reflejados pueden interferir uno con otro, formando un patrón de puntos o anillos de electrones (Fig. 27). Las dimensiones y espacios de los puntos y anillos se utilizan para calcular las dimensiones de las celdas de las especies cristalinas. El patrón de difracción se forma sobre la pantalla final si no se usan lentes [100].

## CAMPO OSCURO

Una imagen en el campo oscuro puede ser obtenida por el desplazamiento de la abertura objetiva de modo que el rayo central de electrones no desviado es parado, y los únicos electrones usados en la formación de la imagen son aquellos dispersados por el objeto por tal ángulo que ellos pueden pasar por la abertura como se muestra en la figura 28.

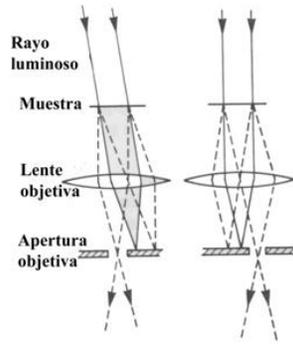


Fig. 28. Esquema óptico para la formación de imágenes de campo oscuro por haz inclinado (izquierda) y apertura fuera de centro (derecha) en el TEM [96].

El método de haz inclinado (Fig. 28 izquierda) inclina el haz para interceptar el punto directo y el método de apertura fuera de centro (Fig. 28 derecha) mueve la apertura objetivo para interceptar el haz directo. La imagen se forma por un punto dispersado en el extremo de la periferia [100].

## ALTA RESOLUCIÓN

Cuando la lente objetivo está fuera de foco, da a lugar un falso detalle de estructuras finas. La presencia del borde rodeando un objeto puede causar un detalle fino duplicado o triplicado. Por ejemplo, la imagen de una línea simple puede dar la impresión de tres líneas espaciadas muy cerradas. La línea de un objeto de  $10 \text{ \AA}$  de ancho puede aparecer como tres líneas paralelas espaciadas a  $5 \text{ \AA}$ . De forma similar, la periodicidad de una estructura enrejada regularmente espaciada puede ser duplicada por la formación de bordes entre las imágenes de las líneas. Este falso “duplicado” de la periodicidad de un enrejado es conocido en la microscopía óptica y se llama efecto de “contraste de fase”. En la microscopía electrónica se le conoce como “desenfoque granular” [100].

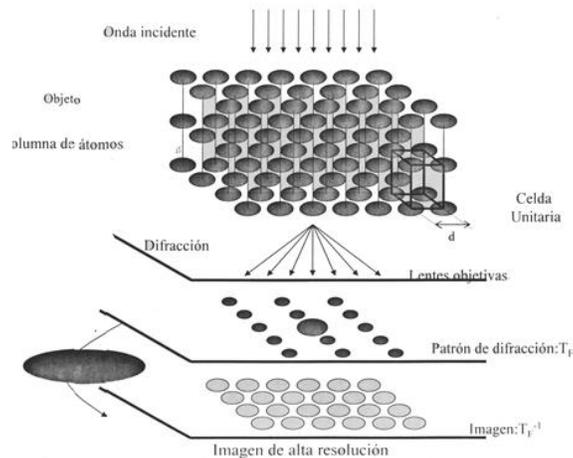


Fig. 29. Esquema de la formación de imágenes de alta resolución en el TEM [96].

*Utilidad:*

Gracias a la resolución de la técnica permite caracterizar la forma, tamaño, dispersidad y fase cristalina de las nanopartículas.

### 3.2.4. Espectroscopia de energía dispersa de rayos X (EDS)

El equipo detector se encuentra acoplado al microscopio electrónico (TEM o SEM), al hacer incidir un haz de electrones sobre una muestra se genera la emisión de Rayos X debido al siguiente mecanismo:

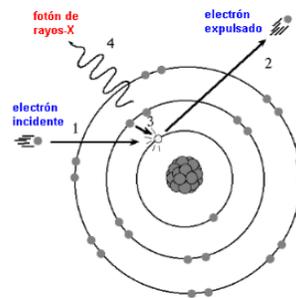


Fig. 30 Izquierda Emisión de rayos X [101].

Como se observa en la figura 30, después de una excitación en la capa interna un átomo tiene una energía por encima de su estado base. Éste se puede relajar, perdiendo energía por medio de un electrón externo que ocupa el lugar del electrón excitado en la capa inferior, la energía se emite como un fotón de Rayos X característico para cada elemento que se mide en el detector [102].

El espectrómetro de energía dispersa se compone principalmente de tres partes:

- El detector.
- El procesamiento electrónico.
- Visor del analizador multicanal.

El funcionamiento es el siguiente:

- El detector genera un pulso de carga proporcional a la Energía del Rayo X.
- Este pulso se convierte en voltaje.
- La señal es amplificada a través de un transistor de efecto de campo, separándolo de otros pulsos, identificando electrónicamente el rayo X de energía específica.
- Finalmente, una señal digitalizada es mostrada en un canal asignado a esta energía en el MCA (analizador multicanal) [103].

### 3.3. Métodos de prueba a la sensibilidad antimicrobiana

Tienen la finalidad de evaluar la respuesta de un microorganismo a uno o varios agentes antimicrobianos in-vitro, con el fin de observar su sensibilidad o resistencia a los mismos y por ende su capacidad de inhibir o matar a los microorganismos. Los resultados de las pruebas a la sensibilidad a antibióticos o antibiogramas, guían en la selección apropiada de regímenes clínicos iniciales y antibióticos adecuados en el tratamiento de pacientes para cada caso en específico [104, 105].

Los métodos de sensibilidad antimicrobiana pueden ser cualitativos o cuantitativos, se pueden dividir en dos tipos basándose en el principio aplicado en cada sistema, estos incluyen [104, 105]:

Difusión: Método de Stokes, Método Kirby-Bauer.

Dilución: Concentración mínima inhibitoria (CMI) por:

- Dilución en caldo.
- Dilución en agar.

Difusión y Dilución: Método Epsilon-Test

#### 3.3.1. Método de difusión: Método del antibiograma disco-placa (Prueba de difusión por disco o halo inhibitorio)

El antibiograma disco plata es cualitativo y se basa en el trabajo de Bauer, Kirby y colaboradores, se encuentra recomendado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), anteriormente National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), para evaluar la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos.

Consiste en depositar, en la superficie de una caja de Petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con diferentes antibióticos. Al depositar el disco impregnado con el antibiótico sobre la superficie del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico se difunde radialmente a través del agar a partir del disco, formando un gradiente de concentración, al incubarse las placas por un tiempo aproximado de 18-24 horas los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición.

La concentración del antibiótico en la interface entre bacterias en crecimiento e inhibidas, es la concentración crítica y se aproxima a la CMI, por lo que si se tiene un gran número de cepas de CMI conocidas se puede deducir la CMI del antimicrobiano, existiendo tablas con diámetros de inhibición en mm, estandarizadas para cada antimicrobiano. La lectura de los discos se interpreta como sensible (S), Intermedia (I) o resistente (R) según la CLSI [104, 105].

Método:

- *Preparación del inóculo por medio de suspensión directa de colonias.*  
Con un asa se toman 4 a 5 colonias iguales de la placa de cultivo de 18 a 24 horas y se suspende en 5ml de suero fisiológico estéril (solución salina 0.85%), se ajusta la turbidez al tubo con 0.5 de la escala de MacFarland.
- *Inoculación de las placas.*  
Antes de transcurrir 15 minutos de haber ajustado el inóculo, introducir un hisopo dentro de la suspensión y al retirarlo rotar varias veces contra la pared del tubo por encima del líquido para eliminar el exceso de inóculo.  
Inocular las placas de Mueller-Hinton deslizando el hisopo por la superficie del agar 3 veces, rotando la placa 60° en cada ocasión, pasándola por última en la periferia del agar y se deja secar por 3 a 5 minutos.
- *Dispensación de los discos.*  
Colocar los discos con dispensadores o pinzas estériles. Se presionan ligeramente sobre la superficie del agar, situándolos a no menos de 15mm del borde de la placa para evitar superposición de los halos de inhibición. En cajas de 150mm no se pueden colocar más de 12 discos y en las de 100mm no más de 6.  
Incubar las placas invertidas (agar en la parte superior) por espacio de 16 a 18 horas (24 para estafilococos sensibles a las meticilinas).
- *Lectura de Resultados.*  
Con regla se miden los halos sobre el reverso de la placa y si el medio contiene sangre sobre la superficie del agar. Cuando hay colonias dentro del halo pueden ser mutantes resistentes, cultivos mixtos o contaminaciones.

### **3.3.2. Método por dilución: Concentración mínima inhibitoria (CMI)**

La cuantificación de la actividad in vitro de antimicrobianos generalmente se evalúa mediante una variante de los métodos de dilución, que se basan en el crecimiento de microorganismos en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que está diluido en el medio de cultivo. Inicialmente se empleaban baterías de tubos con caldo de cultivo con un rango determinado del antimicrobiano (macrodilución). El empleo de micropipetas y de placas de microtitulación facilitó el método de microdilución. Tradicionalmente se ocupan para determinar la CMI y la concentración mínima bactericida (CMB) de los antimicrobianos [105].

La CMI de un agente antimicrobiano es la mínima concentración a la cual se inhibe la multiplicación y producción de un crecimiento visible para una cepa bacteriana.

## Método de microdilución

Se emplean placas de microtitulación o policubetas de poliestireno con pocillos o celdas de fondo en "U", la mayoría tienen 96 pocillos (12x8) para 12 diluciones y 8 agentes microbianos, el caldo de Muller-Hinton es el medio recomendado para pruebas de organismos comúnmente aislados, aeróbicos o facultativos de rápido crecimiento [105, 106].

Se preparan diluciones del antimicrobiano en progresión geométrica en base 2 en agua estéril o un medio de cultivo adecuado; posteriormente se inocula el medio y tras la correspondiente incubación del microorganismo se realiza la lectura [105].

Debe tenerse en cuenta, a la hora de calcular la concentración inicial más alta, que tras añadir el inóculo la concentración de antimicrobiano se diluirá a la mitad. Dependiendo, pues, del volumen de inóculo final, las placas se rellenan utilizando una pipeta multicanal con 100 ó 200µl de la solución más alta de antimicrobiano en la columna 1. Posteriormente se añade un volumen de 50 o 100µl de caldo sin antimicrobiano en los pocillos de las columnas 2 a 11 y se realiza la dilución en la forma habitual empleando la pipeta multicanal, dejando los pocillos de la última columna como controles (positivos o de crecimiento - sin antimicrobiano y negativos - caldo sin inocular).

Procedimiento para las pruebas CMI por microdilución en caldo [104-107].

- Inoculación  
Las colonias aisladas deben de ser de placa de cultivo 18 a 24 horas.
- Suspensión del inóculo  
Se puede preparar por método de crecimiento o el método de suspensión directa de colonias.
- Mezclar la suspensión antes de diluirlo  
Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo a 0.5 de MacFarland ( $1 \times 10^8$  UFC/ml) se mezcla la solución y se diluye con suero fisiológico estéril para que la concentración final en cada celdilla sea de  $5 \times 10^5$  UFC/ml ( $5 \times 10^4$  UFC/celdilla).
- Deshidratación en la incubación  
Para evitar la deshidratación de los paneles: Colocar un sello plástico sobre la placa, colocar la placa en funda plástica.
- Incubación
- Lectura  
La lectura se lleva a cabo después de 16-20 horas, sin embargo, para detectar resistencia a ciertos agentes antimicrobianos el procedimiento puede modificarse hasta a 48 horas) Se observa la presencia de turbidez en los controles positivos y la ausencia de ésta en los controles negativos para poder leer las placas.

### 3.3.2.1. Concentración mínima Letal (CML)

Si se realiza un subcultivo en medio sin antimicrobiano de los medios sembrados previamente en la determinación de CMI se puede determinar la concentración mínima bactericida [105], que es la concentración mínima a la cual el antimicrobiano elimina al microorganismo.

En el esquema de la figura 31 se realizan cultivos para las diluciones que no presentan turbidez en la prueba de CMI, se incuban y en el primer cultivo donde no hay crecimiento se considera la CML.

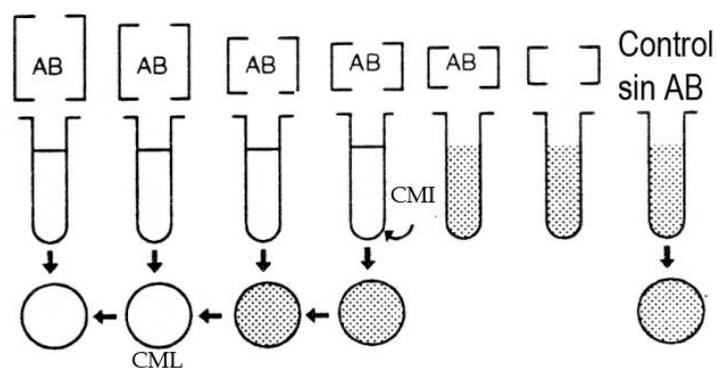


Fig. 31. Esquema de la CML y de la CMI en concentraciones crecientes del antimicrobiano [AB] [108].

## CAPÍTULO IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Materiales

#### *Síntesis de Nps*

La síntesis de Nps se llevó a cabo en el Laboratorio de Nanomateriales del Centro Conjunto de Investigaciones en Química Sustentable UAEM-UNAM (CCIQS UAEM-UNAM).

Precursores: Las soluciones 10 mM, empleadas en las síntesis de precursores 10:90, 25:75 y 50:50, se prepararon con nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) (Sigma Aldrich, México) y sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) (Productos químicos Monterrey)

Bioreductor: Las hojas de *Ricinus Communis* (*Higuerilla*) se recolectaron a las afueras de Tenancingo de degollado, Estado de México. Latitud  $18^\circ 58' 09.4''$ , longitud  $99^\circ 35' 11.0''$ .

#### *Pruebas de sensibilidad antimicrobiana*

Para las pruebas de sensibilidad antimicrobiana, los experimentos se llevaron a cabo en las instalaciones de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM).

Los microorganismos se manipularon dentro de una cabina de flujo laminar.

Se emplearon cepas representativas y de uso frecuente en la literatura reportada en diversos estudios, *S. aureus*, *E. coli* y *A. niger*, que se sembraron en tubos de ensaye, con medio de cultivo infusión de corazón cerebro (BHI), eosina azul de metileno (EMB) y agar de papa dextrosa (PDA), respectivamente, a partir de cepas *S. aureus* ATCC25923, *E. coli* ATCC25922 y *A. niger* endémica, en donde también se llevaron a cabo todas las incubaciones. Las cepas de bacterias se incubaron a  $38^\circ\text{C}$  por 48 Horas y el hongo a  $25^\circ\text{C}$ .

Las pruebas de difusión o halo inhibitorio se llevaron a cabo con agar Mueller-Hinton (BD. Bixon), los ensayos de microdilución con caldo Mueller-Hinton (BD. Bixon) para todas las cepas.

## 4.2. Metodología

El esquema de la figura 32 muestra la metodología experimental:



Fig. 32. Metodología general para la obtención de Nps metálicas, su caracterización y evaluación microbiológica.

## 4.3. Síntesis de Nps bimetálicas

### 1. Extracto acuoso de *Ricinus communis*.

Se lavaron las hojas frescas de *Ricinus Communis* con agua abundante para remover polvo y contaminantes; se dejaron secar y posteriormente se cortaron en piezas pequeñas.

En un matraz Herlen Meyer de 250 ml se colocaron 100 ml de agua desionizada, se llevó a ebullición en placa de calentamiento y se agregan 10g de la hoja trozada, manteniendo ebullición por 5 minutos; posterior a ello, se retira el matraz hasta que alcanza temperatura ambiente. A continuación, se filtró el extracto, diluyéndolo a razón de 100 ml de agua por 10 ml (1/10) de extracto para obtener el extracto bioreductor. La dilución obtenida, se consideró como la adecuada para llevar a cabo la síntesis y análisis de las nanopartículas, en base a resultados obtenidos previamente con la evaluación del extracto directamente y en dilución de 1/100 en diversas muestras con el sistema Ag:Cu (ANEXO 2).

### 2. Precursores.

Se prepararon soluciones de  $\text{AgNO}_3$  10 mM (0.01M) y  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  10 mM (0.01M). Las mezclas precursoras se prepararon de acuerdo a las relaciones en volumen de Ag:Cu como se indica en la tabla 7:

Tabla 7. Relación en volumen de solución acuosa de  $\text{AgNO}_3$  y  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  10mM.

Ag	Cu
10	90
25	75
50	50

3. Síntesis de Nps por bioreducción.

Para obtener las Nps bimetalicas se evaluaron relaciones de volumen de mezclas precursoras con respecto al bioreductor. En diversos viales se agregaron volúmenes de soluciones precursoras (Ag:Cu) y se añadieron volúmenes de la dilución (1/10) del extracto acuoso de *Ricinus Communis*, las relación volumétricas de solución precursora y dilución del extracto estudiadas se muestran en la tabla 8 son:

Tabla 8. Relaciones volumétricas de solución acuosa por ml de extracto acuoso (1/10).

Solución AgNO <sub>3</sub> :CuSO <sub>4</sub> ml	Extracto <i>Ricinus Communis</i> (1/10) ml
1	0.25
1	0.5
1	1
1	5
1	10

El número de muestras y las relaciones volumétricas experimentales que las constituyen se muestran en la tabla 9:

Tabla 9. Lista de experimentos para los diversos sistemas de síntesis Ag:Cu.

No. de muestra	Relación Ag : Cu	Relación Precursor : Extracto
1	10 : 90	1 : 0.25
2	25 : 75	
3	50 : 50	
4	10 : 90	1 : 0.5
5	25 : 75	
6	50 : 50	
7	10 : 90	1 : 1
8	25 : 75	
9	50 : 50	
10	10 : 90	1 : 5
11	25 : 75	
12	50 : 50	
13	10 : 90	1 : 10
14	25 : 75	
15	50 : 50	

#### 4.4. Caracterización Instrumental

##### 1. Espectroscopia UV-VIS.

Se utilizaron tres diferentes equipos durante el desarrollo del presente proyecto:

- Genesys 10s UV-Vis localizado en el laboratorio 10 de la facultad de química.
- Cary 5000 NIR-UV-Vis, marca Variant, localizado en LIDMA.
- Cary 100 UV-Vis, marca Variant, Localizado en el CCIQS.

Para la caracterización de las muestras, en el equipo se tomaron las alícuotas directamente de los viales donde se llevaron a cabo las reducciones, vertiendo en las celdas a temperatura ambiente.

Se empleó el método de lectura por corrección de línea base, empleando la modalidad de doble haz en un rango de 370-800 nm. Se utilizaron celdas de cuarzo y celdas plásticas con paso óptico de 1cm.

La celda de referencia contiene la dilución del extracto de *Ricinus communis*, mismo que está presente en las muestras a leer para evitar interferencias en la señal.

##### 2. Espectroscopia de IR.

Se empleó el espectrómetro de infrarrojo con transformada de Fourier modelo Prestige-21 Shimadzu, localizado en LIDMA. Se colocó la alícuota de la muestra sobre un porta objetos de vidrio, al secarse, se raspa y coloca el polvo sobre el accesorio ATR del equipo, para obtener el espectro.

##### 3. Microscopía electrónica de barrido (SEM).

Se empleó el microscopio electrónico de barrido, JEOL JSM-6510LV, localizado en el CCIQS. Sobre un porta muestras cilíndrico de aluminio se coloca cinta de carbón de doble faz. La muestra a caracterizar se sónica por 5 minutos y se colocan gotas sobre la cinta, permitiendo su evaporación, esto se repitió hasta obtener una película adecuada para su estudio en el microscopio electrónico de barrido.

##### 4. Microscopía electrónica de transmisión (TEM).

El equipo utilizado fue un microscopio de transmisión modelo JEOL-2100 de 200 kV, con filamento de LaB<sub>6</sub> como fuente termoiónica de electrones y cámara CCD digital marca Gatán, modelo SC200, Modalidad para STEM (BR y ADF), localizado en el CCIQS. La muestra se sónico por espacio de 15 minutos, se depositó una gota de la muestra sobre la rejilla, se permitió el secado y se introdujo en el porta muestras del microscopio.

En el caso de muestras con exceso de bioreductor que no permitió la observación de las Nps, se realizó un centrifugado de la solución resultante por 15 minutos a 9000 rpm con curva de subida de 9 y curva de bajada de 7, limpiando y redispersando en agua desionizada para lavar, por varias ocasiones.

Las mediciones para el conteo de partículas y generación de histogramas del tamaño de partícula se realizaron con el programa "ImageJ"

5. Espectroscopía de energía dispersa de rayos X (EDS).

Se empleó el equipo acoplado al microscopio de barrido JEOL JSM-6510LV localizado en el CCIQS para identificar los elementos químicos en la muestra observada. Como técnica acoplada, el análisis se realizó en las muestras que fueron preparadas para su observación en el microscopio electrónico de barrido.

#### 4.5. Métodos de prueba a la sensibilidad antimicrobiana

Las manipulaciones de los microorganismos se llevaron a cabo en cabina de flujo laminar.

Identificación de microorganismos

Bacterias:

Se emplearon las cepas bacterianas de *S. aureus* ATCC25923 (Fig. 33a) y *E. coli* ATCC25922 (Fig. 33c), que se sembraron en tubos de ensaye con medio de BHI y EMB respectivamente y se colocaron en incubadora a 36°C por 48 Horas. De estos tubos, con un asa bacteriológica se tomó una muestra y se estrió en cajas Petri con el medio adecuado para cada cepa. Para siembra e incubación (36°C por 48H), de estas cajas Petri (Fig. 33 b y d) se tomaron algunas colonias para realizar un frotis.

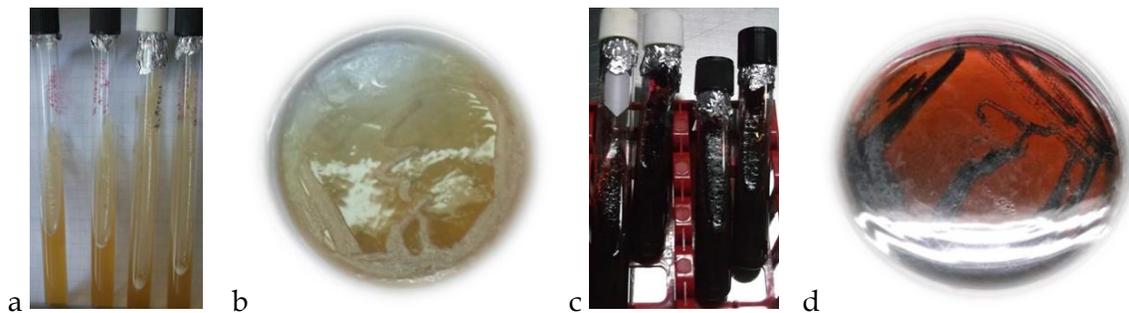


Fig. 33. Cepas bacterianas de *S. aureus* (BHI) (a, b) y *E. coli* (EMB) (c, d) en tubo y sembrado por estría en caja.

- Extensión y fijación de bacterias (frotis).

Cerca de un mechero de bunsen se colocó el portaobjetos y se depositó una gota de agua esterilizada, se llevó a flama un asa esterilizada de cultivo y se tomó una colonia de la bacteria, extendiéndola en el porta objetos con la gota de agua; a continuación, la muestra se fija al calor, pasándola 3 veces por la flama del mechero, como se ve en el la figura 34.

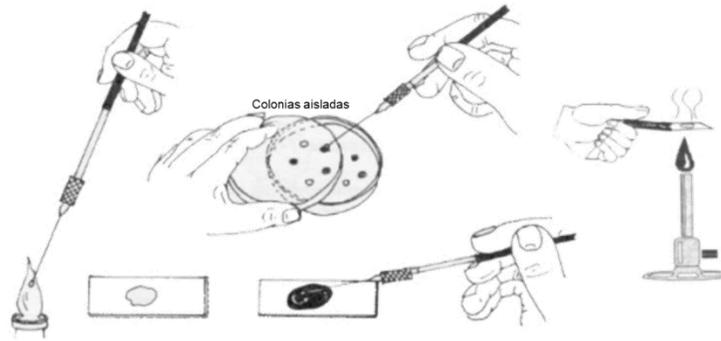


Fig. 34. Esquema de frotis bacteriano [109].

- Tinción de Gram.

Con ayuda de un soporte de varillas de vidrio sobre un recipiente se colocaron los portaobjetos con las bacterias fijadas. Como se muestra en la figura 35, se colocó unas gotas del colorante cristal violeta por un minuto, se lavó con agua destilada, se añadió una gota de lugol por un minuto, se lavó. A continuación, se agregó alcohol-acetona por treinta segundos y se volvió a lavar. Por último, se agregó safranina por un minuto, se lavó y dejó secar, en la muestra teñida se observó en azul o violeta las bacterias Gram-positivas y en rosa las Gram-negativas.

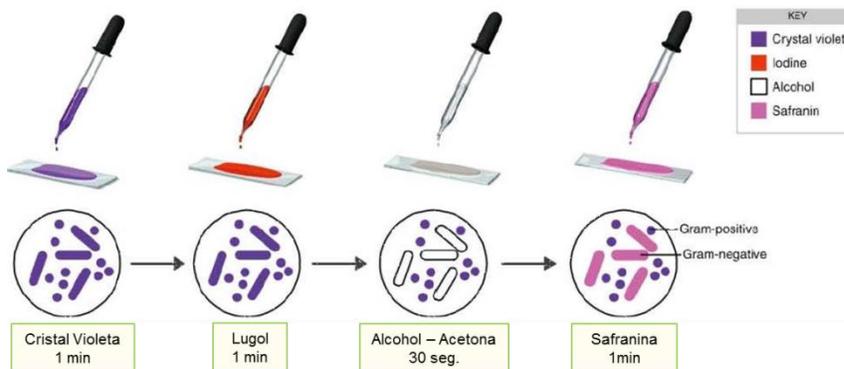


Fig. 35. Esquema de la tinción de Gram [110].

Preparación de la muestra fúngica:

Con un asa se toma una muestra de *A. niger* de los tubos sembrados (25°C por 48 horas) y se siembra en agar papa dextrosa, se incuba a 25°C por 48 horas. Para preparar la muestra, cerca del mechero bunsen se colocó una gota de reactivo azul algodón de lactofenol y se colocó una muestra del hongo con ayuda de dos azas para sembrar esterilizadas y se colocó un cubre objetos como se puede ver en la figura 36.

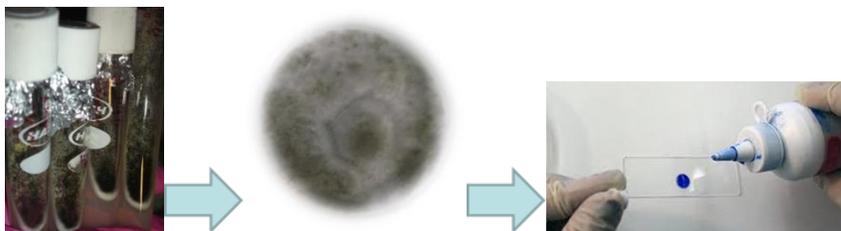


Fig. 36. Preparación de *A. niger* con azul algodón de lactofenol para observar en microscopio.

#### 4.5.1. Método de difusión: KIRBY-BAUER (Prueba de difusión por disco o halo inhibitorio)

Los pasos de este método se pueden observar en la figura 37 y consisten en:

##### *Preparación de los discos*

Se prepararon discos de papel filtro Whatman No. 42 con 6 mm de diámetro, se agregan a los viales donde se sintetizaron las Nps, se sónica por 15 minutos, se dejan secar y guardan en bolsa para su uso posterior.

##### *Preparación del inóculo*

Se emplearon cepas de *E. coli* ATCC25922 después de 48Hrs de siembra en cajas Petri. Con un asa se tomaron tres colonias, se dispersaron con ayuda de un vortex en un tubo de ensaye con solución salina estéril (0.85%), la solución se diluyó hasta tener una turbidez de 0.5 MacFarland ( $1 \times 10^8$  UFC/ml), obtenido mediante la lectura de las soluciones con un espectrofotómetro de uv-visible leyendo a 625 nm en celdas de plástico.

### Inoculación de las placas (agar Müller-Hinton)

Con un hisopo se tomó un inóculo de la suspensión, y se quitó el exceso de suspensión rodando el hisopo en las paredes interiores del tubo, se descargó sobre estriado en las cajas Petri con agar MH procurando no dejar espacio entre líneas, se giró 60° y se volvió a estriar, se repitió una vez más el procedimiento anterior, se dejó secar por 5 min. Se colocaron los discos con las soluciones de Nps (Cu, 10:90, 25:75, 50:50 y Ag). Se incubaron las muestras a 36°C por 48 horas y se midió el diámetro del halo en el que no crecieron los microorganismos [106].

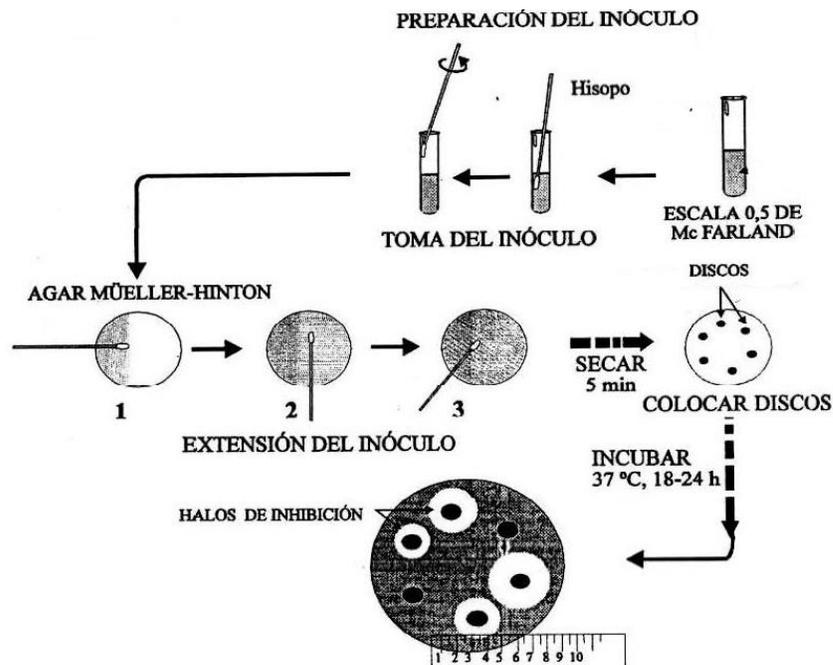


Fig. 37 Esquema del tratamiento de muestra para la prueba de difusión de disco [111].

#### 4.5.2. Microdilución en caldo (CMI)

Se emplearon placas estériles de poliestireno con 8x12 (96) micropocillos y capacidad de trabajo para 200µl/pozo (Fig. 38), que se abrieron hasta el momento de las pruebas microbiológicas en la cabina de flujo laminar. En la figura 38 se muestra cómo se empleó la caja para los experimentos, en la columna 1 se colocó el control negativo (C-), ya que solo contenía caldo y en el que no debe haber crecimiento, en la columna 2 se colocó la alícuota de las soluciones donde están las Nps, a partir de la columna 3 a 11 se identificaron las diluciones secuenciales (D1-D9), por último en la columna 12 se colocó el control de crecimiento positivo (C+). Esto para cada cepa y por triplicado.

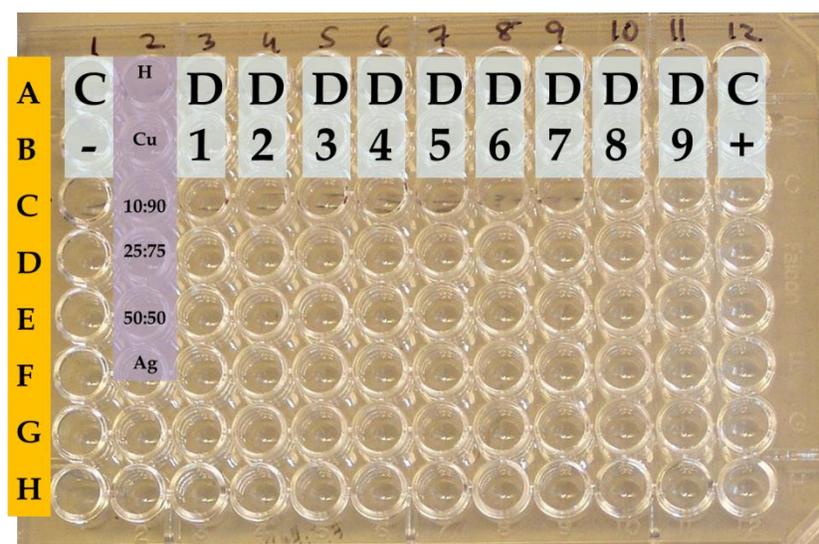


Fig. 38 Esquema de la placa de micropozos empleada, donde: C- es control negativo, C+ control positivo, D diluciones y la columna morada indica las alícuotas de nanopartículas empleadas para el test de CMI.

Se preparó caldo de Müller Hinton según las instrucciones del fabricante. Con ayuda de una micropipeta de 100 µl y puntas esterilizadas se vertió esta cantidad en cada uno de los pocillos excepto los de la columna número 2, colocando 200 µl en los pocillos de la columna 1 (control negativo que no lleva cepa).

En la columna número 2 se vertieron 200 µl de las muestras a evaluar, es decir: extracto de higuera (1/10), soluciones de la biosíntesis para las muestras de Cu, Ag; Cu 10:90, 25:75, 50:50 y Ag, cambiando la punta de micropipeta en cada alícuota de las muestras.

Para cada fila correspondiente, se tomaron 100 µl del pocillo 2, se vertieron en el pocillo 3 y homogenizó con la micropipeta (primera dilución al 50%), se cambió la punta en la micropipeta, se tomaron 100 µl del pocillo de la columna 3 y se continuó sucesivamente con estos pasos hasta llegar a la columna 11, columna a la que se retiraron 100 µl, para que todos los pocillos con excepción de los de la columna 1 tuvieran 100 µl de volumen.

Con un estándar de laboratorio y un espectrofotómetro se preparó una suspensión a 0.5 MacFarland ( $1 \times 10^8$  UFC/ml) de la cepa a evaluar. Antes de pasar 15min, se realizaron diluciones con agua salina estéril, hasta obtener una solución  $1 \times 10^6$  UFC/ml se adicionaron 100  $\mu$ l de la solución a todos los pocillos a partir de la columna 2 hasta el número 12 (control positivo del microorganismo con caldo, sin ninguna muestra), con el objetivo de tener un volumen final en cada pocillo de 200  $\mu$ l, con lo cual cada pocillo queda con una concentración final de  $5 \times 10^5$  UFC/ml debido a que:

$$1 \times 10^6 \text{ UFC/ml (100 } \mu\text{l alícuota/200} \mu\text{l volumen final) = } 5 \times 10^5 \text{ UFC/ml}$$

Que es lo que piden las metodologías también expresado como:

$$5 \times 10^5 \text{ UFC/ml = } 5 \times 10^4 \text{ UFC/100} \mu\text{l = } 5 \times 10^4 \text{ UFC/celda.}$$

Éste último referenciado a volúmenes finales de 100  $\mu$ l en las técnicas de referencia [105, 107].

Se taparon las placas y se incubaron por 24-48 horas a 25 °C para el *A. niger*, mientras que en el caso de las bacterias se incubaron a 38 °C.

La presencia de turbidez indica crecimiento bacteriano, por lo que los pocillos que la presentaron no tienen inhibición. Si la columna 1 (solo caldo) presenta turbidez la prueba es errónea pues hay contaminación. Si la columna 12 no presenta turbidez se descarta la prueba pues no hay crecimiento de los microorganismos (alícuota). La CMI corresponde al último micropocillo que no presentó turbidez en cada muestra [106, 107].

En base a la concentración de las Nps expuesta en el anexo 1, se calcula la concentración de microgramos en cada pocillo, la información se ordena en base al esquema de la figura 38, señalando en rojo, las columnas y las filas de la placa:

**Tabla 10. Concentración de Ag y Cu ( $\mu$ g/ml), para las Nps, en las disoluciones sucesivas, en placas de micropozos.**

			Nps	1 <sup>a</sup> D	2 <sup>a</sup> D	3 <sup>a</sup> D	4 <sup>a</sup> D	5 <sup>a</sup> D	6 <sup>a</sup> D	7 <sup>a</sup> D	8 <sup>a</sup> D	9 <sup>a</sup> D
Nps :			2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Cu ( $\mu$ g/ml)		B	28.88	14.44	7.22	3.61	1.81	0.90	0.45	0.23	0.11	0.06
10:90 ( $\mu$ g/ml)	Ag	C	4.90	2.45	1.23	0.61	0.31	0.15	0.08	0.04	0.02	0.01
	Cu		26.00	13.00	6.50	3.25	1.62	0.81	0.41	0.20	0.10	0.05
25:75 ( $\mu$ g/ml)	Ag	D	12.26	6.13	3.06	1.53	0.77	0.38	0.19	0.10	0.05	0.02
	Cu		21.66	10.83	5.42	2.71	1.35	0.68	0.34	0.17	0.08	0.04
50:50 ( $\mu$ g/ml)	Ag	E	24.52	12.26	6.13	3.06	1.53	0.77	0.38	0.19	0.10	0.05
	Cu		14.44	7.22	3.61	1.81	0.90	0.45	0.23	0.11	0.06	0.03
Ag ( $\mu$ g/ml)		F	49.03	24.52	12.26	6.13	3.06	1.53	0.77	0.38	0.19	0.10

### 4.5.3. Concentración mínima letal (CML)

Se dividió una caja Petri con agar Mueller-Hinton en seis secciones, como se aprecia en la figura 39 y se marcaron como control (control positivo de la CMI), blanco (solamente agar) y el número correspondiente a los últimos 4 pocillos, que no presentaron turbidez en la prueba de CMI, comenzando por ésta. Con ayuda de puntas estériles se tomó una alícuota de los pocillos (una punta por pocillo) de la prueba de CMI, se colocó una pequeña cantidad de la muestra, en la sección del agar correspondiente y se estrió, de la periferia al centro, con ayuda de un asa microbiológica, esterilizando el asa entre cada uso, para un total de 4 muestras. Una sección se empleó para extender una alícuota del control correspondiente (columna 12 de la caja de CMI) y otra se dejó sin inocular, como blanco, para corroborar que no hay contaminación presente, como se muestra en la figura 39. Entre cada cepa se cambió de asa. Las cajas Petri se incubaron por 24-48 h a 25 °C para el *A. niger* y 38 °C para las bacterias. Para que el resultado se considere válido debió de haber crecimiento en el control y la parte que se deja sin sembrar debe permanecer sin turbidez, la CML fue aquella en la que no hay crecimiento en las muestras sembradas [105, 108]. Esta operación se repitió para cada sistema de Nps: Cu, 10:90, 25:75, 50:50 y Ag, con las tres cepas de microorganismos empleados.

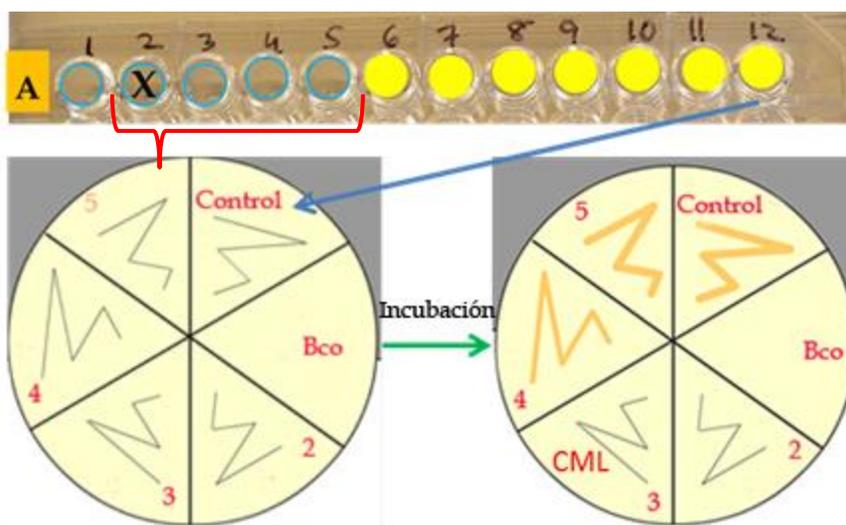


Fig. 39 Esquema de la prueba de CML a partir de la evaluación de CMI.

## CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Determinación de la concentración adecuada del extracto acuoso de *Ricinus communis* y la relación de volumen precursor:bioreductor.

Se sintetizaron nanopartículas usando una dilución 1/10 del extracto acuoso de las hojas de *Ricinus communis* fresca y soluciones molares 10 mM de  $\text{AgNO}_3$  y  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , en una relación de volumen Ag:Cu de 10:90, 25:75, 50:50 y 100:0. La relación de volumen entre cada una de estas soluciones y la dilución del extracto acuoso (1/10) es de 1:10, obteniendo Nps estables que no precipitan. Estos parámetros se determinaron en los resultados obtenidos en la investigación previa con síntesis de Nps utilizando el extracto de la hoja seca del anexo 2, las cuales no presentaron actividad antimicrobiana. El cambio de coloración al verter la dilución del extracto en los viales con las soluciones precursoras de los metales y su paulatina intensificación, indica la reducción de los iones metálicos, formando Nps desde los primeros minutos de reacción, como se aprecia en la figura 40, que muestra los viales con el extracto de *Ricinus comunis* 1/10 (Rc), así como las Nps de los diversos sistemas a los 15 minutos y 3 horas de iniciar la reacción de reducción, donde se puede apreciar una clara diferencia entre las Nps de los sistemas Ag:Cu y las Nps de Ag.

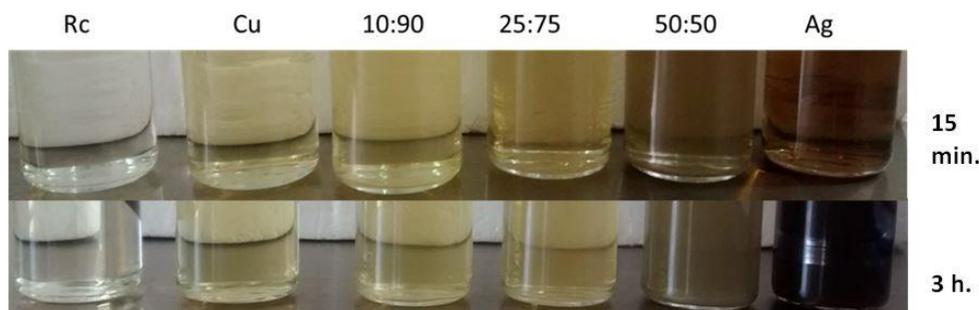


Fig. 40. Muestras de Nps obtenidas por el extracto de *Ricinus comunis* (Rc) (1/10) en los sistemas precursor: bioreductor 1:10, para los precursores de: Rc (extracto dilución 1/10), Cu ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), 10:90 (Ag:Cu), 25:75 (Ag:Cu), 50:50 (10:90 (Ag:Cu) y Ag ( $\text{AgNO}_3$ ), a los 15 minutos y 3 horas de reacción.

### 5.2. Espectroscopia ultravioleta-visible.

Los espectros de Uv-vis se realizaron empleando, en la celda de referencia el mismo extracto (1/10) que se empleó en la síntesis para evitar las señales que puedan presentarse por la presencia del bioreductor. Así mismo, se corrieron blancos con el mismo bioreductor (extracto 1/10), con el objetivo de corroborar la ausencia de señales, evitando interferencias en la adquisición de los espectros. Los tiempos de lectura se establecieron en 5, 15, 30 y 45 minutos, posteriormente cada hora durante 6 horas (Fig. 41 a, b y c), con

excepción del sistema de Ag, que a los 15 minutos excedió la escala de absorbancia de los sistemas Ag:Cu (Fig. 41d), que después de las 3 horas saturó la capacidad de lectura del equipo (Fig. 41e). En el caso de la muestra 25:75 (Fig. 41b) se monitoreo por 20 horas (Fig. 41f), para analizar y discutir el espectro de ésta muestra se realizó un acercamiento del espectro (Fig. 42b) para apreciar el máximo de absorción, haciendo lo propio con la muestra 10:90 (Fig. 42a).

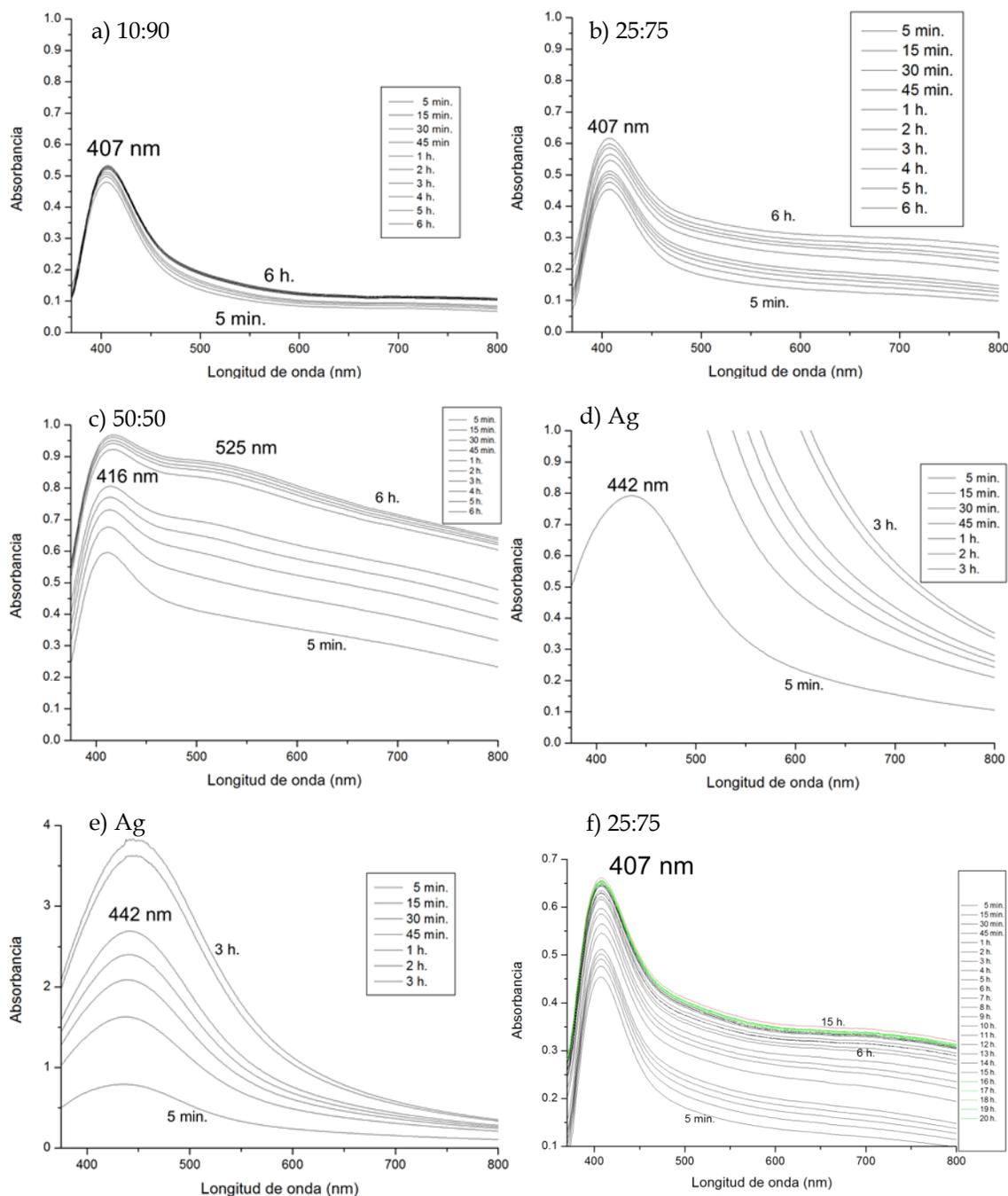


Fig. 41. Espectros uv-vis de los sistemas “precursor:extracto diluido” 1:10 a 5 min, 15 min, 30 min, 45 min y 1-6 horas, para los precursores Ag:Cu: a) 10:90, b) 25:75, c) 50:50, d) Ag (5min.), e) Ag (3 horas), f) 25:75 (20 horas).

Todos los sistemas, presentaron una señal entre 407 y 442 nm, en la lectura que se registró a los 5 minutos, que pude adjudicarse a la formación de nanopartículas de Ag. Se observó que, las señales se recorrieron a longitudes de onda mayor, aumentando la velocidad con que se incrementa la intensidad de absorción al aumentar la concentración de Ag en el sistema. La muestra de Ag (Fig. 41e) con señal en 442 nm, corresponde al plasmón clásico reportado para nanopartículas esféricas de Ag [3, 4].

Se observó una correlación entre el incremento de la concentración de plata en los sistemas Ag:Cu 10:90 (Fig. 41a), 25:75 (Fig. 41b), 50:50 (Fig. 41c) y el aumento en las absorbancias de las señales a lo largo del espectro, presentando un cambio en la pendiente de los espectros entre 500-800 nm, lo cual sugiere la formación de especies de Nps Ag:Cu de diferentes composiciones, tamaños y formas, de acuerdo a señales referenciadas, en espectros de síntesis con polioles [72].

El sistema 10:90 (Fig. 41a) presentó una señal perfilada en 407 nm. El sistema 25:75 (Fig. 41b) presenta un aumento considerable en la absorción de 500 a 800 nm, la cinética de reducción a lo largo de 20 horas (Fig. 41f) muestra que la pendiente de las señales no presenta cambios significativos después de seis horas, el cambio en la pendiente sugiere la presencia de Nps de diferentes formas y tamaños. En la figura 42b se aprecia que presenta absorción máxima a las 15 horas (señal roja) disminuyendo la absorción y manteniéndose estable las siguientes cuatro horas (señales en verde). El sistema 50:50 aumentó la absorbancia de todo el espectro, una señal sobresale a 525 nm, que podría deberse a la formación mayoritaria un solo tipo de Nps Ag:Cu como se reporta en referencias, debido a que la señal es intermedia a la esperada para Ag y Cu por separado [40, 44, 72].

Los espectros de las figuras 41a y 41b correspondientes a los sistemas con mayor concentración de Cu (10:90 y 25:75), se ampliaron digitalmente en la figura 42 mostrando las señales alrededor 645 nm y 700 nm que infieren la presencia de Cu, debido a que se han reportado señales entre 550-600 nm, asociadas a Nps de Cu [40, 44], así como señales a más de 800 nm en síntesis de Cu con polioles [72], incluso se ha reportado la ausencia de señales para el Cu en síntesis con Nps de Cu menores a 5 nm [70]. Estas señales desaparecen en el sistema 50:50 (Fig. 41c) donde se tiene mayor concentración de Ag y no están presentes en Nps de Ag (41d).

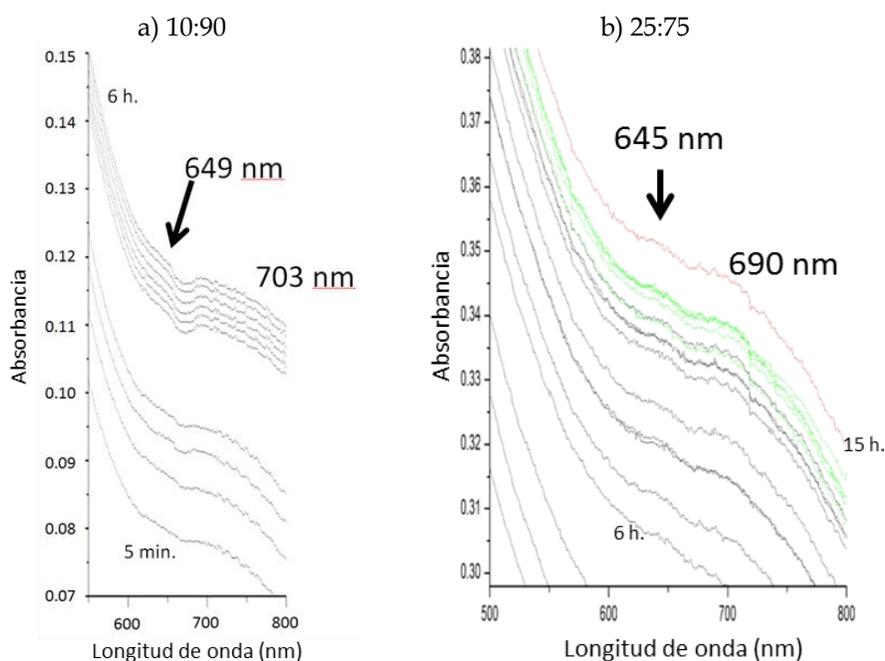


Fig. 42. Espectros uv-vis contraídos de los sistemas Ag:Cu a) 10:90 y b) 25:75 de las figuras 41a y 41b respectivamente.

### 5.3. Espectroscopia infrarroja (FTIR).

El estudio de Infrarrojo se llevó a cabo solamente en las muestras sintetizadas con el extracto de la hoja fresca, ya que son las que presentaron acción antimicrobiana.

Las señales del espectro FTIR del extracto de la hoja de *Ricinus communis* en la figura 43 (línea negra) se identificaron como:

La banda en  $3286\text{ cm}^{-1}$  corresponde al movimiento de alargamiento O-H para los H asociados a azúcares, fenoles y alcoholes [3]. Las bandas entre  $2993$  y  $2850\text{ cm}^{-1}$  corresponden al movimiento de estiramiento C-H de cadenas hidrocarbonadas. En  $1747\text{ cm}^{-1}$  se encuentran los alargamientos asimétricos del  $\text{NO}_2$ . La señal en  $1643\text{ cm}^{-1}$  corresponde al movimiento de balanceo de enlace N-H de las aminas primarias. Las señales en  $1457$  y  $1373\text{ cm}^{-1}$  a los estiramientos del C-H. La señal en  $1318\text{ cm}^{-1}$  se asocia al balanceo -O-H. La señal en  $1266$  y  $1046\text{ cm}^{-1}$  corresponde a enlaces éter [4]. Según reportes previos, la presencia de estas bandas sugiere la presencia de flavonoides y terpenoides absorbidos en la superficie de las partículas metálicas. Otros reportan que el grupo carbonilo del aminoácido y las proteínas tienen una fuerte habilidad de enlazar el metal, indicando que la proteína puede formar las nanopartículas metálicas para prevenir la aglomeración y así estabilizar el medio. Esto sugiere que la biomolécula posiblemente efectúa las dos funciones de formación y estabilización de las Nps en el medio acuoso [3, 70].

En otros trabajos sobre estudios de terpenoides en la síntesis de Nps, se atribuyen las señales de  $1636\text{ cm}^{-1}$ ,  $1608\text{ cm}^{-1}$  y  $1500\text{ cm}^{-1}$  a vibraciones de elongación C=C de anillos aromáticos, la identificada en  $1432\text{ cm}^{-1}$  a deformaciones OH que se corren a  $1382$  al formarse Nps de Ag. La señal en  $1384\text{ cm}^{-1}$  a metilos terminales y la señales de  $1300\text{ cm}^{-1}$  a  $885\text{ cm}^{-1}$  a vibraciones de elongación C-O de alcoholes, éteres y esterres, sugiriendo la presencia de terpenoides y algunos flavonoides en la superficie de las Nps. Se ha reportado que la reducción y estabilización de las Nps está dada por acción de los grupos funcionales en terpenoides, entre los se encuentran: C=C, C-C, C-o, -C=O, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>, -OH, C-H, CH<sub>3</sub>-C-CH<sub>3</sub>, -C-O-C- y -C-N. Los alcoholes, cetonas aldehídos y lactonas de los terpenoides realizan la reducción y estabilización de las Nps. En concentraciones suficientes, los terpenoides se adsorben en la superficie vía la interacción de electrones  $\pi$  o grupos carbonilo en ausencia de agentes ligantes más fuertes [112, 113].

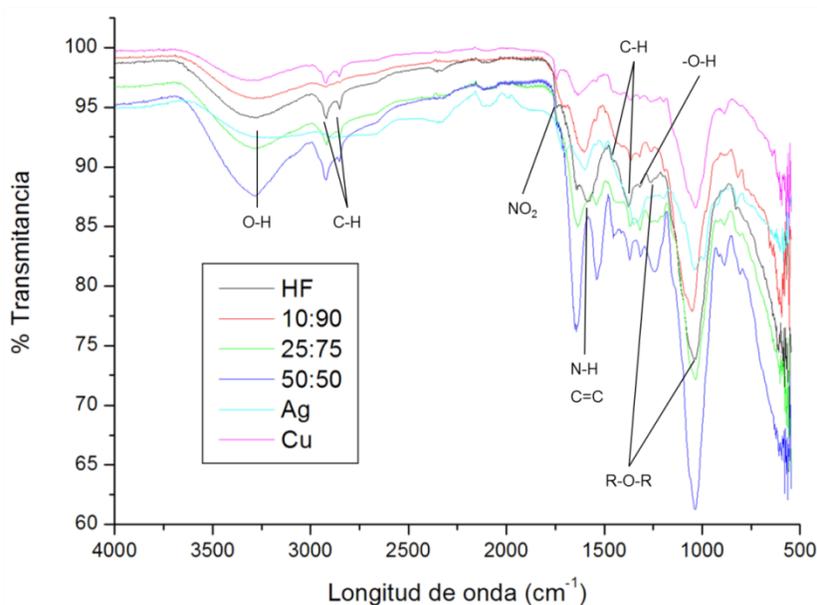


Fig. 43. Espectros FTIR de nanopartículas sintetizadas a partir de la hoja fresca de *Ricinus communis*. HF- extracto de la hoja fresca, Nps Ag:Cu 10:90, 25:75, 50:50, Ag y Cu.

Se observó que en las señales de los sistemas Ag:Cu: 10:90, 25:75 y 50:50, la intensidad de las bandas se incrementó a medida que aumenta el volumen relativo de plata en las soluciones precursoras. Así mismo, fue evidente como la señal en  $1643\text{ cm}^{-1}$  (N-H ó C=C de anillos aromáticos) del extracto de *Ricinus communis*, se desdobló en dos bandas bien definidas, mientras que, en las Nps de Ag y Cu, solo se presentó una señal. Esto sugiere una interacción con los metales ya que se obtuvo un igual número de bandas como de especies en el sistema, intensificándose, al aumentar la concentración relativa entre las dos especies. En las señales de  $1266\text{ cm}^{-1}$  (R-O-R'), se observó que la señal se ensancha y alarga a medida que aumentaba la cantidad de plata. En la banda ubicada en  $1046\text{ cm}^{-1}$ , además del incremento en la intensidad de la señal, se observó que en las Nps de plata y cobre las señales se desplazan a campos menores.

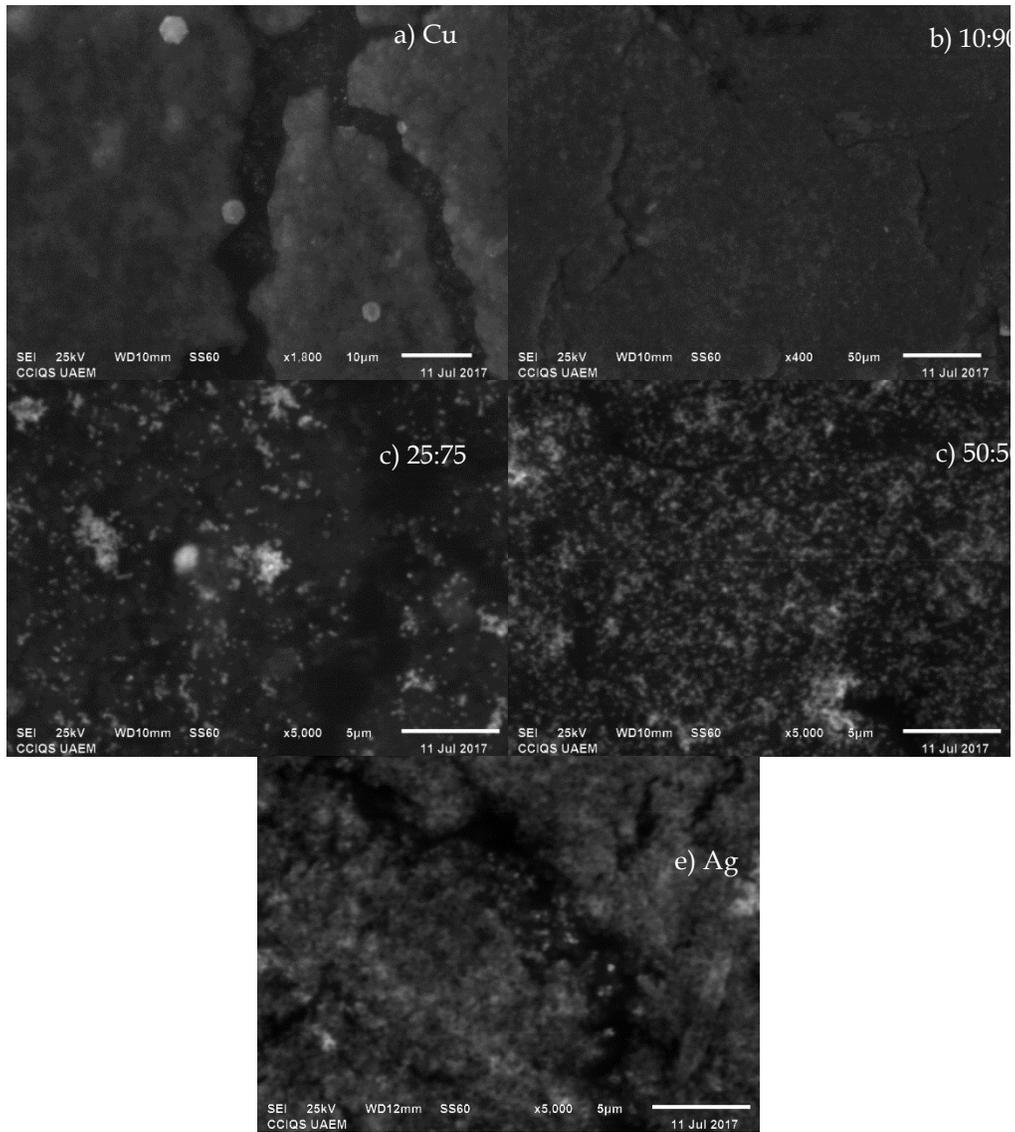
#### 5.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se empleó para observar los agregados que forman las partículas y analizar la composición química mediante EDS y ratificar la presencia de los metales en las muestras sintetizadas.

La figura 44 muestra micrografías de SEM obtenidas por electrones secundarios, se aprecia como a medida que se aumenta la cantidad de Ag en el sistema se presentan cúmulos de partículas cada vez más abundantes.

La presencia de los elementos Cu y Ag se corroboraron mediante la técnica de EDS, en donde los espectros y la cuantificación medida por el equipo en la figura 45 permitieron corroborar la correlación en el aumento de concentración de Ag en el sistema de síntesis y en las Nps. Sin embargo, la concentración de Ag registrada en las Nps fue mayor a la relación de Ag que se agrega al sistema, siendo el valor más cercano el del sistema 10:90 (18.36 : 81.67) y cambiando drásticamente en el sistema 50:50 (87:13).

Esto se puede deber a que en sistemas en los que se forman Nps con núcleos de Cu y corazas de Ag [71, 72, 114], se establece que, al ser más densa la Ag que el Cu, puede interferir con las señales del mismo, disminuyendo la cantidad de señales para el Cu [71]. Otra razón que justifica estos resultados, es que el  $\text{Cu}^0$  reduce iones de  $\text{Ag}^+$ , formando iones  $\text{Cu}^{2+}$  en solución que se vuelven a reducir [71, 72] y son cubiertos por Ag y el  $\text{Cu}^{2+}$  restante se reduce en un cristal grande de  $\text{Cu}^0$  [71].



**Fig. 44.** Micrografías de electrones secundarios correspondientes a síntesis con relación en volumen 1:10 precursor : extracto acuoso (1/10) de hoja fresca, para Nps de: Cu (a), Ag (e), sistemas Ag:Cu 10:90 (b), 25:75 (c), 50:50 (c).

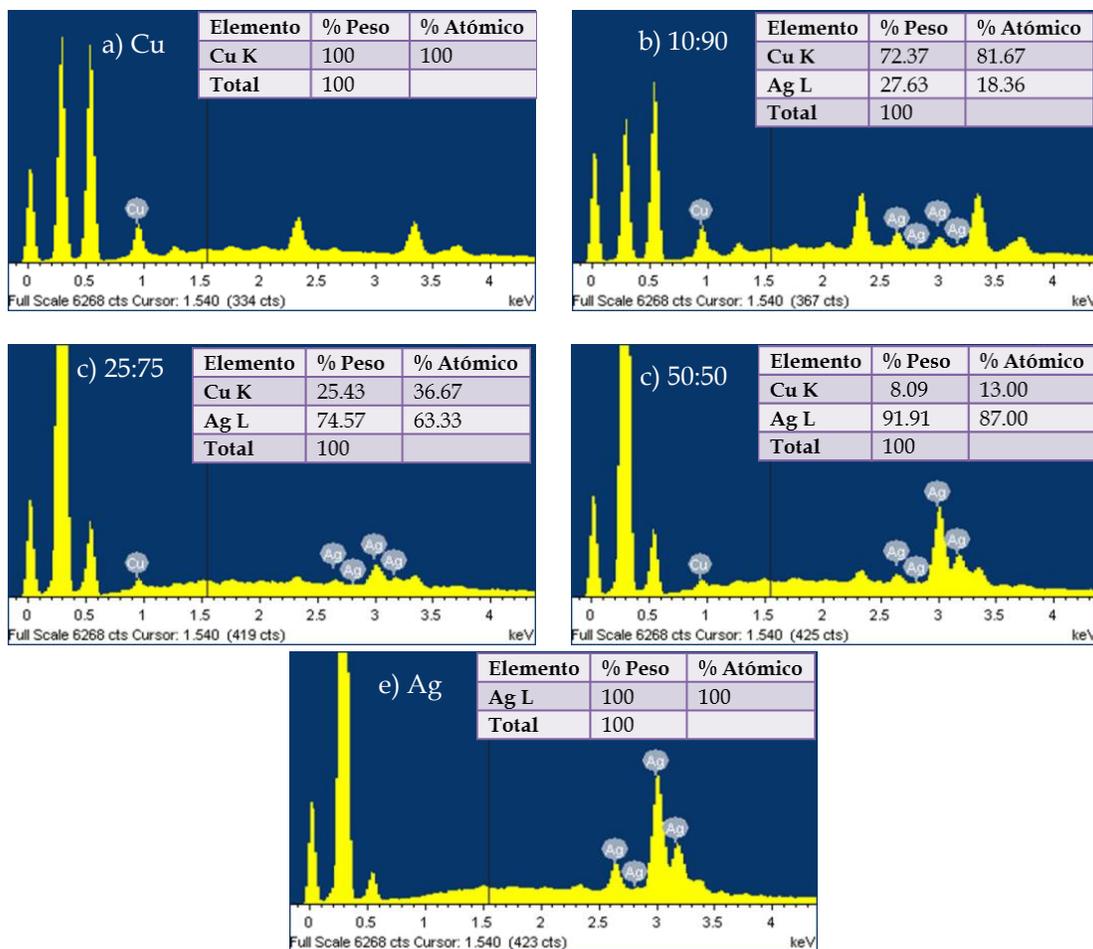


Fig. 45. Espectros EDS y porcentos en peso y atómico, para Nps de: Cu (a), Ag (e), sistemas Ag:Cu 10:90 (b), 25:75 (c), 50:50 (c), de la Figura 51.

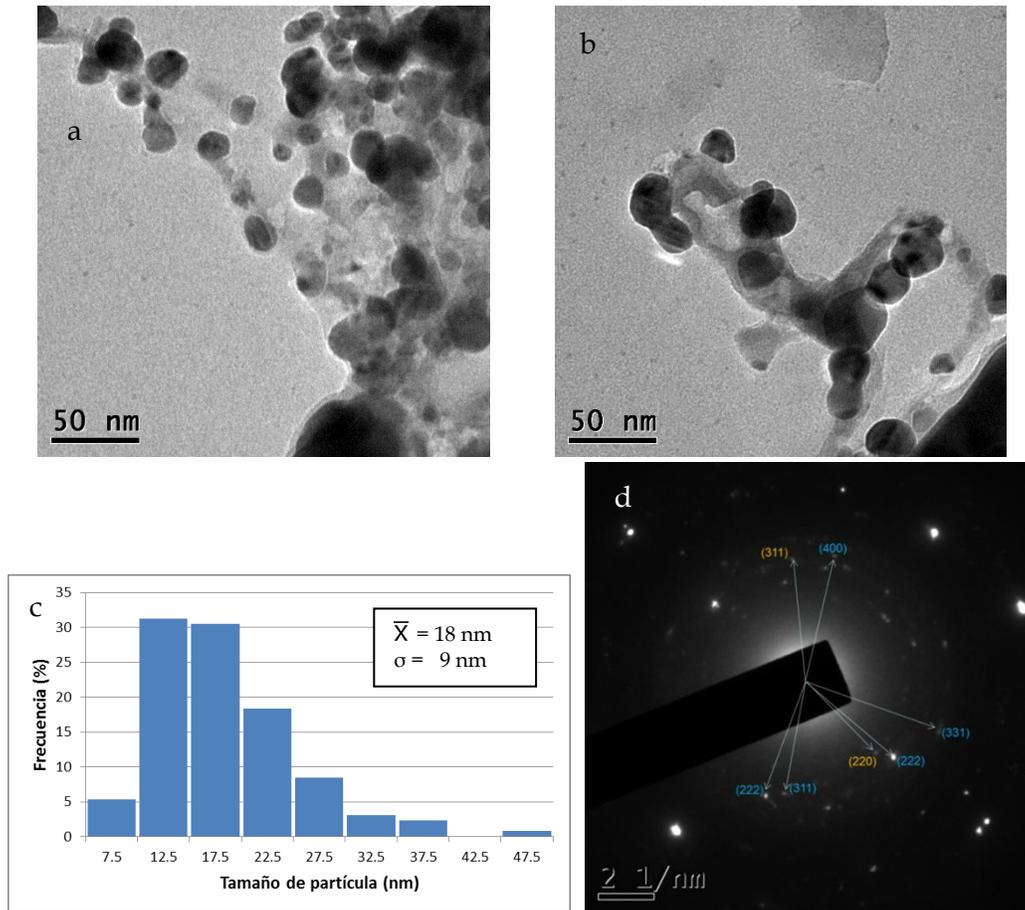
## 5.5. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Ésta técnica permitió observar la morfología, tamaño y composición de las partículas (patrón de difracción). Las partículas en las micrografías y las distancias interplanares en los patrones de difracción se midieron con el programa Image J. Las distancias en los patrones de difracción se cotejaron con las tarjetas de difracción 03-065-8428 para plata y 01-070-3038 para cobre (Anexo 3, páginas 110 y 111).

### 5.5.1. Microanálisis 10:90.

En la imagen y el histograma de la figura 46, se apreció que el tamaño de partícula promedio, es de 18 nm ( $\sigma=9$  nm) (Fig. 46c), con más del 75% de las partículas en un rango de tamaño de 10-25 nm, y poco más del 5 % son partículas mayores a 30 nm, llegando

hasta un tamaño máximo de 48 nm (1%). También se observaron partículas menores a 5 nm (5%), mostrando que el sistema presenta un control de tamaño que favorece la formación de partículas de 10 a 25 nm. De las imágenes se puede inferir la influencia del sistema en el control de tamaño y la morfología, ya que las partículas observadas presentan tendencia a una morfología esférica.



**Fig. 46.** Micrografías de nanopartículas sistema Ag:Cu 10:90 (a,b). Histograma de frecuencias (c) y patrón de difracción (d) del sistema mencionado, los planos de las partículas de Ag en azul y del Cu en naranja.

Al indexar el patrón de difracción de la imagen 46d se identificaron distancias interplanares referenciadas para la red cúbica centrada en cara (fcc, por sus siglas en inglés: face-centered cubic) del cobre, identificando los planos (311) y (220), así como los planos (311), (222), (331) y (400) para la plata fcc.

### 5.5.2. Microanálisis 25:75.

En el histograma de la figura 47c se observó polimorfismo y generación de partículas de mayor tamaño que en la muestra 10:90, con un tamaño promedio de 64 nm ( $\sigma=17 \text{ nm}$ ), el 30% de las partículas se encuentran en un rango de 60-70 nm, alcanzando tamaños de

hasta 98 nm (5%). La similitud de los valores en el histograma, muestra una mayor polidispersidad respecto a la muestra 10:90. Las partículas de mayor tamaño presentaron formas irregulares, mientras que aquellas menores a 70 nm tienden a formas esféricas alargadas como se puede apreciar en la figura 47<sup>a</sup>. Así mismo, se observó que existe aglomeración en partículas de alrededor de 35 nm.

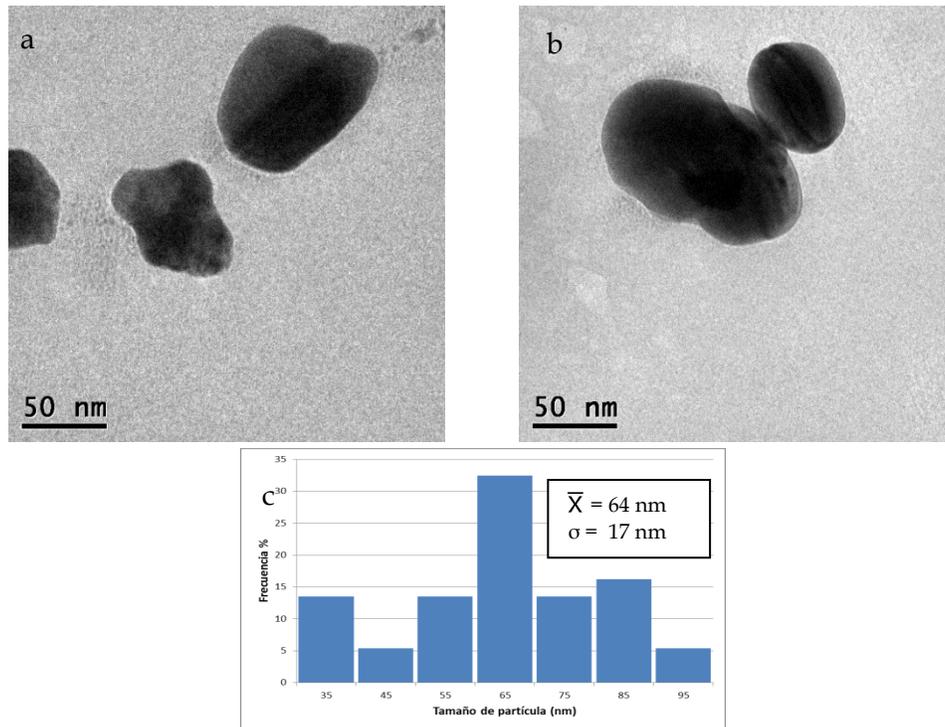


Fig. 47. Micrografías de nanopartículas sistema Ag:Cu 25:75 (a,b). Histograma de frecuencias para el sistema mencionado (c).

En el patrón de difracción de la figura 48, se empleó una herramienta digital del programa Image J para generar una circunferencia y observar las señales pertenecientes al plano (400) de la plata y el plano (311) del Cu.

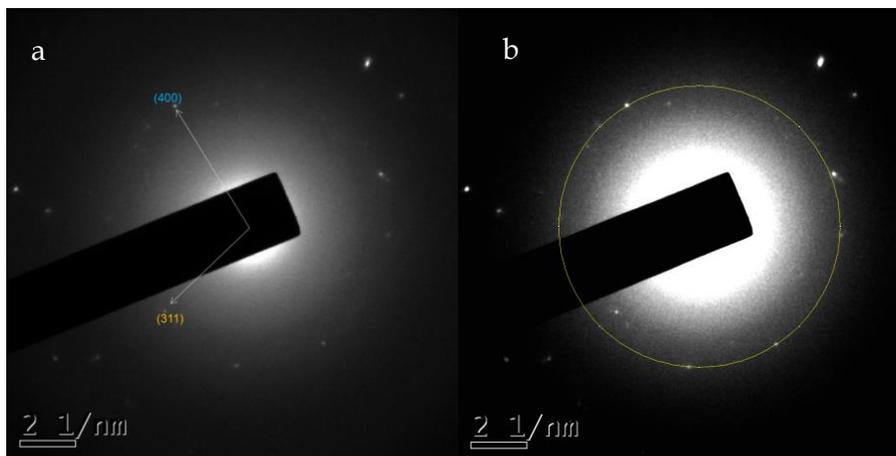


Fig. 48. Patrón de difracción de nanopartículas sistema Ag:Cu 25:75, los planos que corresponden a las partículas de Ag se encuentran en azul y los que corresponden al Cu en naranja (a). Patrón de difracción tratado digitalmente para observar las señales correspondientes al plano (400) de Ag.

### 5.5.3. Microanálisis 50:50.

En las figuras 49a y 49b, se muestran las micrografías de esta síntesis, se puede apreciar la formación de partículas de gran tamaño (hasta 90 nm), así como una gran cantidad de partículas al rededor 5 nm. Debido a la marcada diferencia de tamaño y frecuencias, el histograma se dividió en dos poblaciones para realizar los cálculos de la desviación estándar. En el histograma de la figura 49c se observó que, las partículas con tamaño menor a 40 nm tienen un tamaño promedio de 7.8 nm con  $\sigma=9$  nm, más del 60% de las partículas tienen un tamaño menor a 5 nm. El histograma de la figura 49d, el rango de 50-90 nm presentó un tamaño medio de 73 nm con  $\sigma=10$  nm, con poco más del 55% en partículas de 70 a 85 nm.

Las partículas de mayor tamaño tienden a formar partículas irregulares, mientras que las más pequeñas, tienden a una forma esférica. El polimorfismo, la diversidad en tamaños y composición de las partículas presentes, así como la cantidad de partículas pequeñas presentes se correlacionan con en el aumento tan drástico de absorbancia para la zona de 500-800 nm, así como la aparición de la señal a 525 nm.

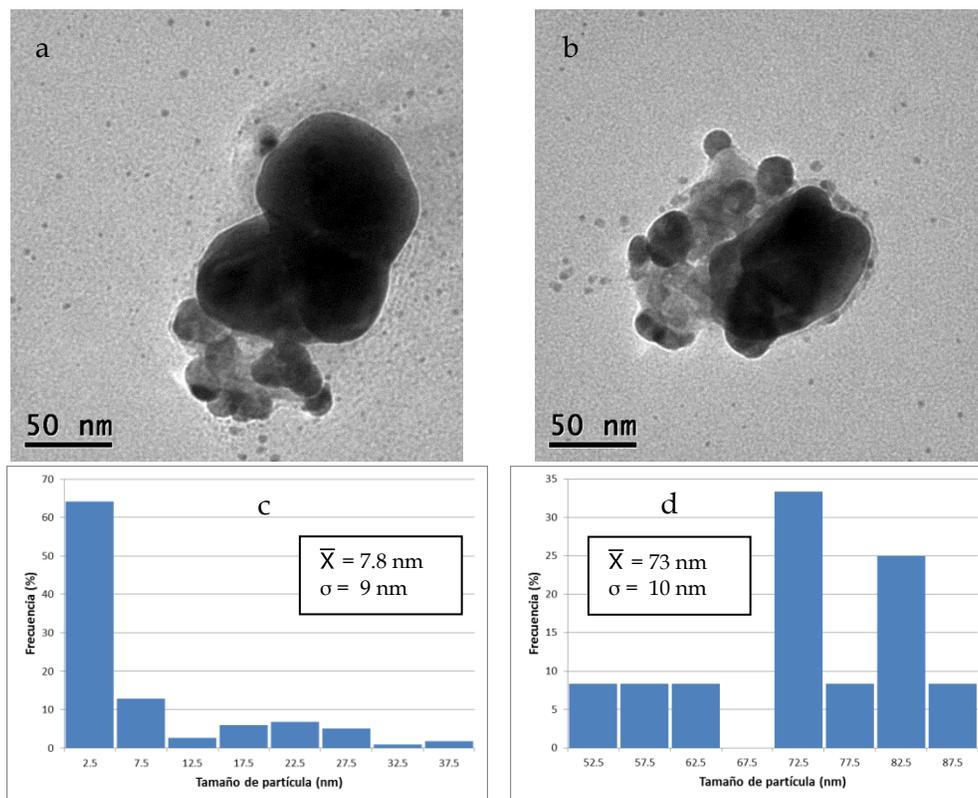


Fig. 49. Micrografías de nanopartículas sistema Ag:Cu50:50 (a, b). Histogramas de frecuencias de 50:50 para el 90% de partículas en el rango de 1-40 nm(c) y para el 10% en el rango de 50-90 nm (b).

### 5.5.4. Microanálisis Ag.

Al llevar a cabo la síntesis para obtener Nps de Ag, se puede observar en la figura 50 una morfología controlada con tendencias a formar partículas esféricas, el tamaño promedio es de 24 nm con  $\sigma=9$  nm, al rededor del 55% de las partículas está en un rango entre 20 y 30 nm.

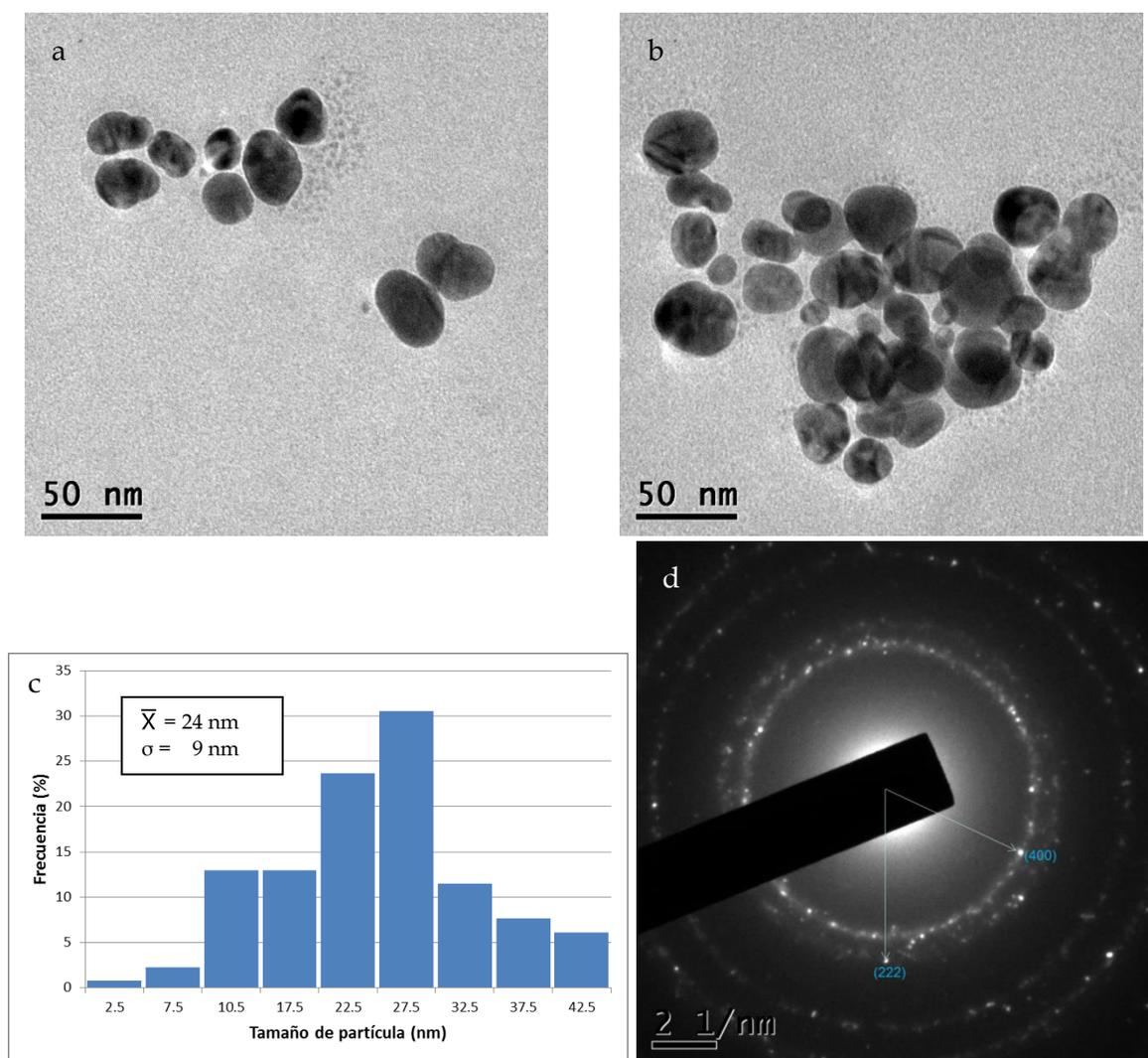


Fig. 50. Micrografías (a,b), histograma de frecuencias (c) y patrón de difracción (d) de nanopartículas de Ag

Al analizar el patrón de difracción de la figura 50d, se aprecia que al tratarse de un solo metal presente en la síntesis, los anillos correspondientes a los planos de difracción de las partículas son definidos, debido a que todas las partículas en la trayectoria del haz de electrones difractan en alguno de los planos propios del mismo metal.

### 5.5.5. Microanálisis Cu.

En el caso de la síntesis de partículas de cobre se observaron partículas de más de 200 nm, como se muestra en la figura 51.

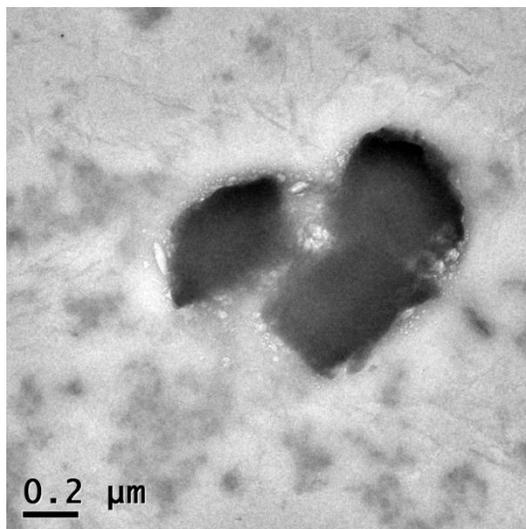


Fig. 51. Micrografías de nanopartículas, sistema de Cu.

Al comparar las muestras de partículas con Ag y Cu, por separado, con las muestras que contienen Ag:Cu, se observó el efecto del sistema combinado Ag:Cu en la morfología y el control de tamaño de las Nps sintetizadas.

Se apreció la formación de partículas de menor tamaño, con menor polidispersidad en el sistema 10:90. Al incrementar la cantidad de Ag, en el sistema 25:75, el tamaño y la polidispersidad aumentaron. En el sistema 50:50 se apreció el mayor contraste, con una gran cantidad de partículas alrededor de 5 nm y la presencia de partículas, con tamaños mayores a 50 nm. Se pudo observar, que el aumento en la concentración, de los iones de  $\text{Ag}^+$ , repercute en la formación de partículas de mayor tamaño, y formas que pierden el carácter esférico, característico de las partículas de Ag. Se observó la formación de Nps, con tamaños menores a 10 nm en los sistemas Ag:Cu, con excepción del sistema 25:75, con partículas mayores de 30 nm.

## 5.6. Pruebas microbiológicas

### 5.6.1. Caracterización de cepas microbianas para las pruebas.

Para saber si las Nps sintetizadas presentaban actividad antimicrobiana, en primer lugar se caracterizaron los microorganismos empleados en dichas pruebas.

Se emplearon muestras bacterianas de *S. aureus* y *E. coli* con certificación ATCC25923 y ATCC25922, respectivamente; a ambas cepas se les aplicó tinción de Gram y se observaron en microscópicamente para corroborar la morfología de las bacterias y su caracterización mediante la tinción de Gram, así como para observar que no existiera contaminación. En el caso del hongo, no cuenta con esta certificación y el estudio corroboró que la muestra fuera acorde con las características generales o básicas del *A. niger*. Se pudo corroborar que las muestras no se encontraban contaminadas, ya que las muestras en su totalidad estaban conformadas solo por microorganismos concordantes con los microorganismos correspondientes.

#### *Staphylococcus aureus*

En las imágenes de la figura 52a se puede observar que las muestras están compuestas por cocos de coloración azul, la cual corresponde a microorganismos Gram-positivos. Para mejorar la observación de la muestra se empleó un microscopio confocal para ver con mayor detalle su morfología (Fig. 52b).

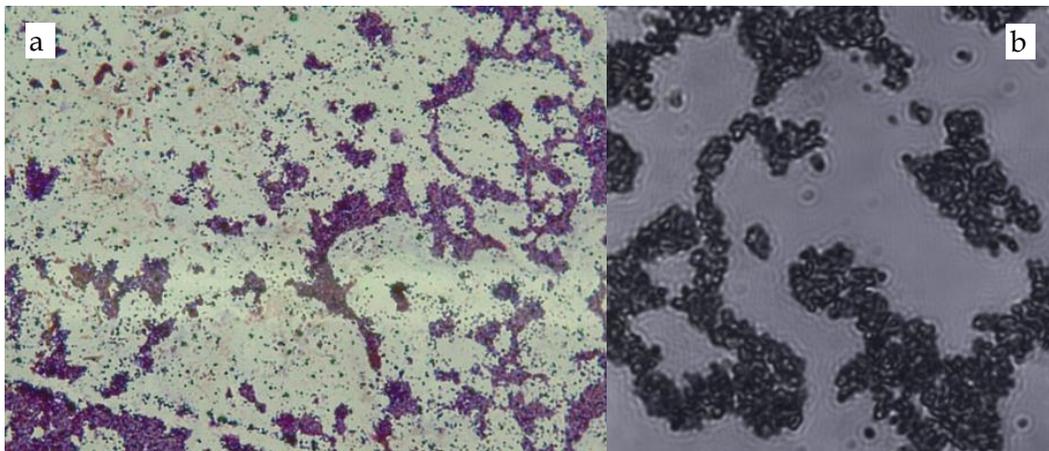


Fig. 52. Micrografías de microscopio óptico (a) y confocal (b) de la muestra de *S. aureus* ATCC25923.

*Escherichia coli*

Se pudo observar que las muestras se encontraban compuestas por bacilos con coloración roja debido a la tinción de Gram-negativa, como se aprecia en la figura 53a; la morfología se puede apreciar mejor en la imagen del microscopio confocal (Fig. 53b).

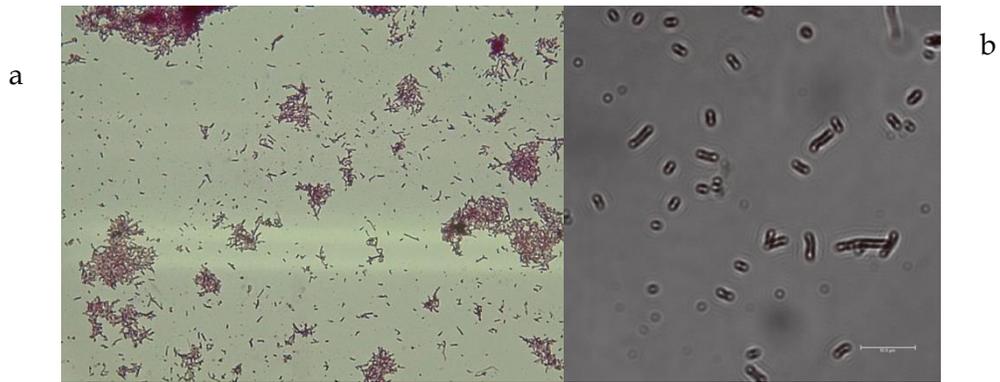


Fig. 53. Micrografías de microscopio óptico (a) y confocal (b) de la muestra de *E. coli* ATCC25922.

*Aspergillus niger*

En la figura 54a se puede observar que la morfología del hongo empleado se compone de filamentos compuestos por hifas, en la terminación de los filamentos presentan vesículas donde se encuentran las fiálides, de donde se desprenden los conidios. En el microscopio confocal solo se puede observar las hifas y restos de los conidios.

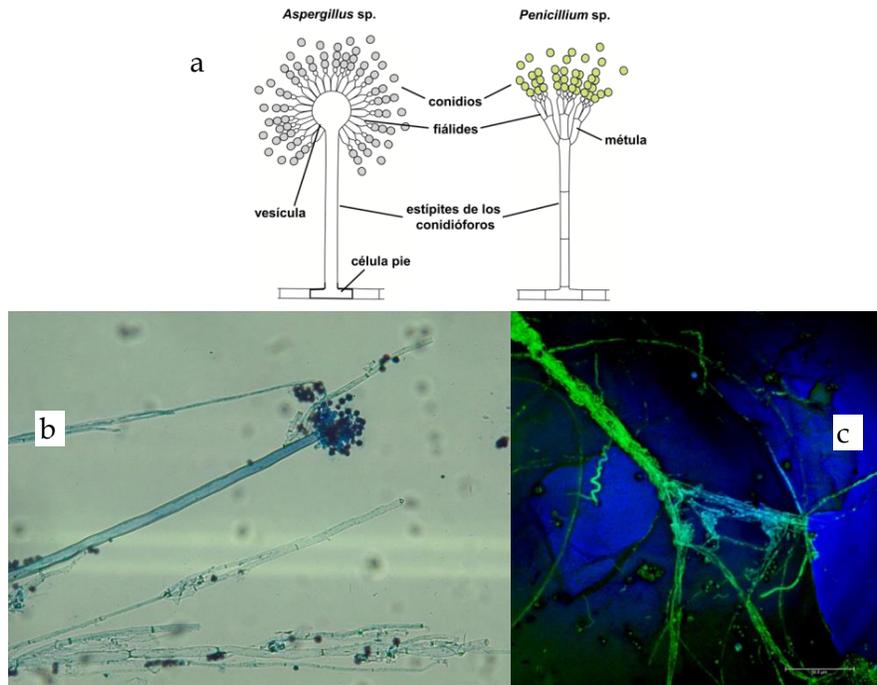


Fig. 54. Esquema estructural del *Aspergillus sp.* y *Penicillium sp.* (a). Micrografía de microscopio óptico de *A. niger* (b). Micrografía de microscopio confocal del *A. niger*.

### 5.6.2. Prueba de halo de inhibición.

Se realizó esta prueba para seleccionar las muestras en las que se evaluarán la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima letal (CML), identificando aquellas que tienen acción antimicrobiana en *E. coli*.

En esta prueba se coloca un disco de papel en el centro sin Nps o el bioreductor para corroborar que el papel no interfiera en la inhibición (Bco). En la figura 55a se puede observar que las Nps sintetizadas con el extracto de la hoja seca de *Ricinus communis* no presentó actividad antimicrobiana, aún aquellas conformadas en su totalidad por plata, y que presentan difusión en el disco, observada por la coloración en la cepa, no presentó inhibición del crecimiento bacteriano, por lo que se sintetizaron Nps con el extracto de la hoja fresca.

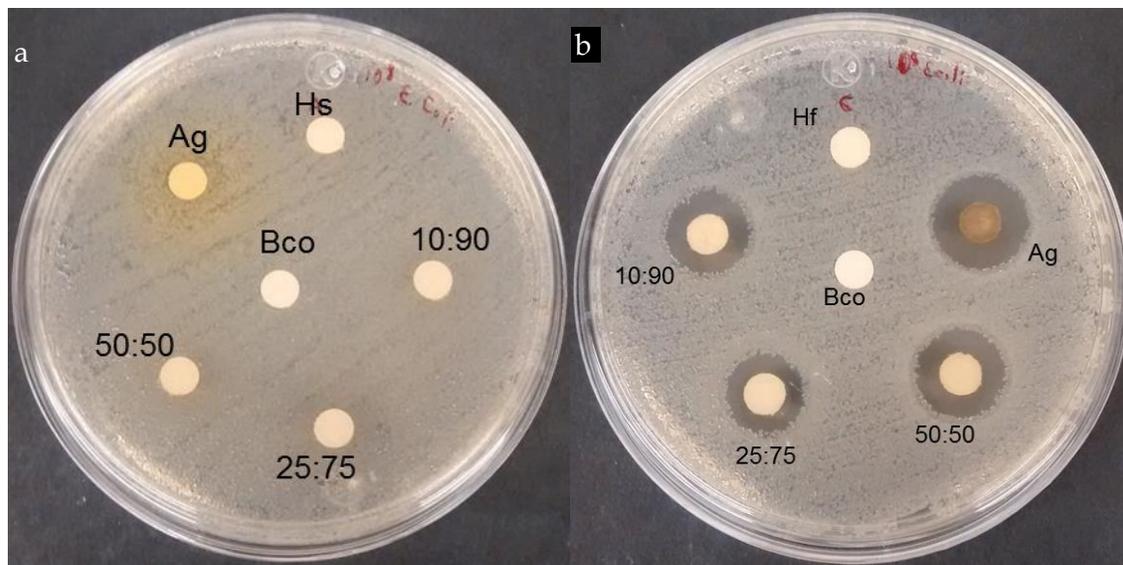


Fig. 55. Cajas petri con pruebas de halo inhibitorio para cepa *E. coli* y Np's sintetizadas con hoja seca (a) y hoja fresca de *Ricinus communis* (b). Hs-*Ricinus comunis* seca. Ag-plata. Bco-Blanco. Hf- Hs-*Ricinus comunis* fresca. Sistemas Ag:Cu 10:90, 25:75: 50:50.

Las Nps sintetizadas con el extracto de la hoja fresca en la figura 55b tienen una clara acción antimicrobiana ya que se observa la inhibición con un radio inhibitorio de 3.6, 3.1, 2.5 y 2.9 mm alrededor de los discos impregnados con Ag, 50:50, 25:75 y 10:90 respectivamente. En ambas síntesis el disco impregnado con el extracto de *Ricinus communis*, ya sea seca (Hs) o fresca (Hf), no presentan halo inhibitorio. En base a ello puede plantearse la posibilidad de que, las Nps obtenidas con el extracto de la hoja seca queden atrapadas por biomoléculas de la *Ricinus comunis*, formando aglomerados que evitaron la difusión de las Nps, por lo que presentaron un resultado negativo en estas pruebas.

### 5.6.3. Concentración mínima inhibitoria (CMI).

Se llevaron a cabo pruebas por triplicado para la CMI con las Nps sintetizadas mediante el extracto de la hoja fresca, acorde a la metodología (página 73), debido a que presentaron acción antimicrobiana en la prueba de halo inhibitorio.

Al estudiar las placas de la figura 56 se comprobó que las muestras no estuvieran contaminadas, observando que los pozos de la columna 1 (control negativo), que solo contiene el medio de cultivo no tuviera turbidez, lo que indica que no hay crecimiento de microorganismos que pudieran haber contaminado la caja. En la columna 12 (control positivo) se corroboró que los microorganismos crecieron en el medio de cultivo y las condiciones de incubación observando la presencia de turbidez en cada cepa evaluada. El

pocillo con el extracto de la hoja empleado para la síntesis de Nps presentó turbidez en los tres casos, lo que corrobora los datos de la prueba de halo inhibitorio en la que se observa que no tiene efecto microbicida para *S. aureus*. Para el cobre se observó una turbidez muy tenue en la alícuota de las Nps (columna 2, Fig. 56b), lo que indica que no presenta acción antimicrobiana, al igual que el extracto de la hoja fresca. Se pudo observar que la CMI parece aumentar a medida que aumenta la concentración de plata en las nanopartículas sintetizadas por la falta de turbidez en los pocillos.

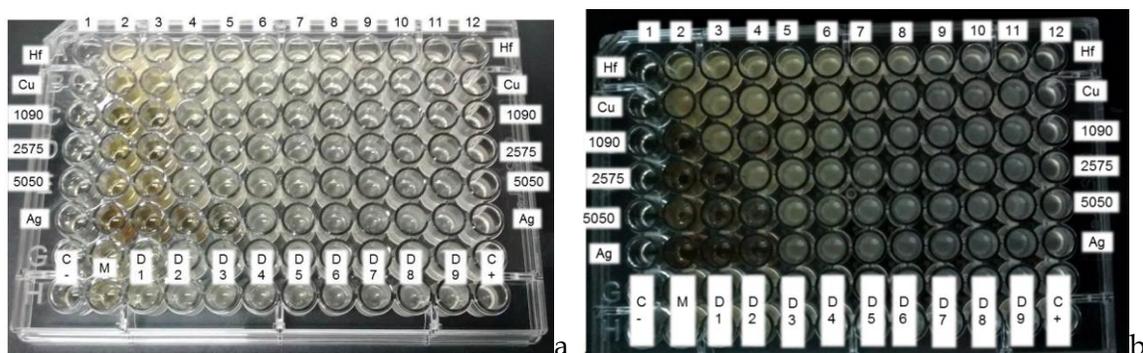


Fig. 56. Cajas con pocillo (200µl, 5x10<sup>5</sup> UFC/ml) de *S. aureus* (a) y *A. niger* (b). En columnas: C- control negativo (solo caldo de cultivo). M muestra. D1-D9 dilución 1-9. C+ control positivo (Cepa y caldo de cultivo). En filas: las soluciones de nanopartículas que se están evaluando.

Las placas de la CMI se esquematizan en las tablas 11-13, donde se encuentra en verde los parámetros estudiados como son los sistemas que contienen a las Nps, los controles y las diluciones de las nanopartículas, en rojo la rotulación de las placas y en azul los resultados para cada pocillo donde C significa que la solución no presenta turbidez y por lo tanto no tiene crecimiento microbiano, la T señala la presencia de turbidez. Los resultados se resumen en la tabla 14.

### *S. aureus*

Tabla 11. Esquematización de los resultados en placas con micropocillos para *S. aureus*. Coloración verde-parámetros, roja-cerigrafía en la placa, en azul resultados de presencia (T) o ausencia (C) de turbidez.

Np's de Sistemas		C-	Nps	1 <sup>a</sup> D	2 <sup>a</sup> D	3 <sup>a</sup> D	4 <sup>a</sup> D	5 <sup>a</sup> D	6 <sup>a</sup> D	7 <sup>a</sup> D	8 <sup>a</sup> D	9 <sup>a</sup> D	C+
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Hf	A	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
Cu	B	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
10:90	C	C	C	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T
25:75	D	C	C	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T
50:50	E	C	C	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T
Ag	F	C	C	C	C	C	T	T	T	T	T	T	T

*E. coli*

Tabla 12. Esquematización de los resultados en placas con micropocillos para *E. coli*. Coloración verde-parámetros, roja-rotulación en la placa, en azul resultados de presencia (T) o ausencia (C) de turbidez.

		C-	Nps	1ª D	2ª D	3ª D	4ª D	5ª D	6ª D	7ª D	8ª D	9ª D	C+
Np's de Sistemas		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Hf	A	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
Cu	B	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
10:90	C	C	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
25:75	D	C	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
50:50	E	C	C	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T
Ag	F	C	C	C	C	T	T	T	T	T	T	T	T

*A. niger*

Tabla 13. Esquematización de los resultados en placas con micropocillos para *A. niger*. Coloración verde-parámetros, roja-cerigrafía en la placa, en azul resultados de presencia (T) o ausencia (C) de turbidez.

		C-	Nps	1ª D	2ª D	3ª D	4ª D	5ª D	6ª D	7ª D	8ª D	9ª D	C+
Np's de Sistemas		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Hf	A	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
Cu	B	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
10:90	C	C	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
25:75	D	C	C	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T
50:50	E	C	C	C	C	T	T	T	T	T	T	T	T
Ag	F	C	C	C	C	T	T	T	T	T	T	T	T

En la tabla 14 se identifica la CMI (columna Ag/Cu), de cada sistema evaluado (columna Mtra.) en µg/ml, identificando el número de dilución (columna ID) y el número de pocillo, en las cepas de: *S. aureus*, *E. coli* y *A. niger*.

Tabla 14. Concentración del metal en Nps (µg/ml), para la CMI de sistemas: Hf (extracto 1/10 de *Ricinus communis*), Cu, 10:90, 25:75, 50:50 y Ag, evaluados en las cepas de *S. aureus*, *E. coli* y *A. niger*.

Mtra.	<i>S. aureus</i>			<i>E. coli</i>			<i>A. niger</i>		
	ID	Pocillo	Ag:Cu (µg/ml)	ID	Pocillo	Ag:Cu (µg/ml)	ID	Pocillo	Ag:Cu (µg/ml)
Hf	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cu	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10:90	1ª D	3	2.45 : 13.00	Nps	2	4.90 : 26.00	Nps	2	4.90 : 26.00
25:75	1ª D	3	6.13 : 10.83	Nps	2	12.26 : 21.66	1ª D	3	6.13 : 10.83
50:50	1ª D	3	12.26 : 7.22	1ª D	3	12.26 : 7.22	2ª D	4	6.13 : 3.61
Ag	3ª D	5	6.13	2ª D	4	12.26	2ª D	4	12.26

#### 5.6.4. Concentración mínima letal (CML).

La prueba de CML se realizó de acuerdo a la metodología de la página 75. Se prepararon 5 cajas Petri para cada cepa (*A. aureus*, *E. coli* y *A. niger*), asignando una caja por sistema (Cu, 10:90, 25:75, 50:50 y Ag). Se tomaron alícuotas de las pruebas de CMI con ayuda de una micropipeta de 200 $\mu$ l y puntas esterilizadas (una por pocillo), colocando gotas en las secciones marcadas, extendiéndolas al centro, con ayuda de asas microbianas, esterilizando entre cada uso y cambiando de asa para cada cepa.

En las placas Petri para *S. aureus*, de la figura 57, se asignó el blanco (sección sin muestra) a C- (control negativo), el control positivo (pocillo 12 de CMI) a C+, Np's al pocillo con 100  $\mu$ l de la síntesis (pocillo 2), 1<sup>a</sup>D, 2<sup>a</sup>D y 3<sup>a</sup>D, son las diluciones sucesivas (pocillos del 3 al 5). Las placas pertenecen a los sistemas: Cu (a), 10:90 (b), 25:95 (c), 50:50 (d) y Ag (e).

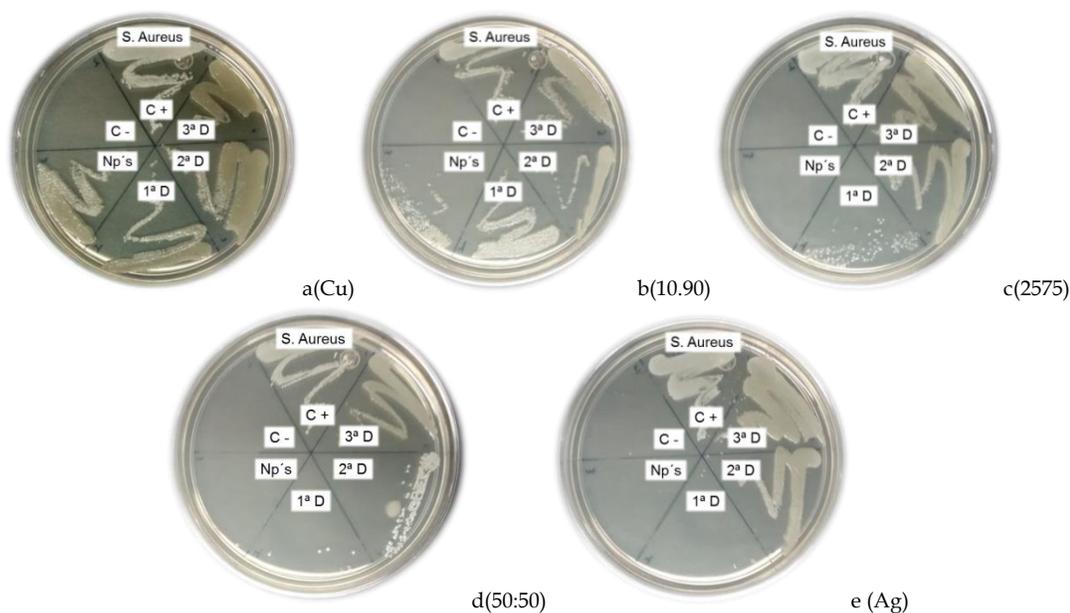


Fig. 57. Pruebas de CML para *S. aureus* para: a) Cu, b) Ag:Cu 10:90, c) 25:75, d) 50:50, e) Ag. C+ control positivo, C- control negativo, Np's alícuota de nanopartículas, Xª D es el número de dilución.

Se observó que Nps con la misma CML, la cantidad de colonias en cada caso difiere drásticamente, como se observa en las imágenes 57c, con respecto a 57d y 57e.

En la tabla 15 se presentan las CMI y CML de las muestras, en la cepa de *S. aureus* los valores de CMI son la mitad de CML para las muestra 25:75 y 50:50; en la Ag es mucho menor la CMI y en el caso de la 10:90 no presenta CML. La concentración de Ag en la CMI del sistema 10:90 es mucho menor a la de las Nps de Ag solas, lo que no sucede en los sistemas 25:75 y 50:50, esto se puede atribuir al tamaño de las partículas del sistema 10:90 ( $\bar{X}$ =18 nm), que puede permitir mayor interacción con las bacterias y la baja concentración de Ag no permite la destrucción de la bacteria. La CML y la concentración de Ag en los sistemas 25:75 y 50:50 es menor al de la CML de las Nps de Ag solas.

Tabla 15. CMI y CML ( $\mu\text{g}$  en un pocillo de 200  $\mu\text{l}$  y  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) para los sistemas Hf (extracto 1/10 de *Ricinus communis*), Cu, 10:90, 25:75, 50:50 y Ag, evaluados en las cepas de *S. aureus*, *E. coli* y *A. niger* ( $5 \times 10^5 \text{UFC}/\text{ml}$ ).

	ID	CMI ( $\mu\text{g}$ )	CMI Ag:Cu ( $\mu\text{g}$ )	CMI ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	CMI Ag:Cu ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	ID	CML ( $\mu\text{g}$ )	CML Ag:Cu ( $\mu\text{g}$ )	CML ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	CML Ag:Cu ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
<i>S. aureus</i>										
R. <i>communis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10:90	1ª D	3.06	0.49 : 2.60	15.45	2.45 : 13.00	-	-	-	-	-
25:75	1ª D	3.40	1.23 : 2.17	16.96	6.13 : 10.83	Nps	6.78	2.45 : 4.33	33.92	12.26 : 21.66
50:50	1ª D	3.89	2.45 : 1.44	19.48	12.26 : 7.22	Nps	7.79	4.90 : 2.89	38.96	24.52 : 14.44
Ag	3ª D	1.23	1.2258	6.13	6.13	Nps	9.81	9.81	49.03	49.03
<i>E. coli</i>										
R. <i>communis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10:90	Nps	6.20	0.98 : 5.20	30.90	4.90 : 26.00	Nps	6.17	0.98 : 5.19	30.90	4.90 : 26.00
25:75	Nps	6.78	2.45 : 4.33	33.92	12.26 : 21.66	Nps	6.78	2.45 : 4.33	33.92	12.26 : 21.66
50:50	1ª D	3.89	2.45 : 1.44	19.48	12.26 : 7.22	Nps	7.19	4.90 : 2.89	38.96	24.52 : 14.44
Ag	2ª D	2.45	2.4516	12.26	12.26	2ª D	2.45	2.45	12.26	12.26
<i>A. niger</i>										
R. <i>communis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10:90	Nps	6.18	0.98 : 5.20	30.90	4.90 : 26.00	Nps	6.18	0.98 : 5.20	30.90	4.90 : 26.00
25:75	1ª D	3.40	1.23 : 2.17	16.96	6.13 : 10.83	1ª D	3.40	1.23 : 2.17	16.96	6.13 : 10.83
50:50	2ª D	2.95	1.23 : 0.72	9.74	6.13 : 3.61	1ª D	3.89	2.45 : 1.44	19.48	12.26 : 7.22
Ag	2ª D	2.45	2.45	12.26	12.26	2ª D	2.45	2.45	12.26	12.26

En *E. coli* se aprecia que la CMI y CML es la misma para todos los casos, con excepción del sistema 50:50, que tiene el doble de CML. Las concentraciones de Ag para la CMI son de 6.13  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (excepto 10:90), los resultados sugieren que la concentración de Ag condiciona la inactivación de la bacteria. En el sistema 10:90 la CMI es mayor a la de las Nps de Ag, pero la concentración de Ag empleada en la síntesis es menor.

En el *A. niger* se observa que la CMI y CML son las mismas (excepto 50:50) como se vio en *E. coli*. La CMI del sistema 50:50 es menor a la de las Nps de Ag. En todos los casos de CMI y CML la concentración de Ag necesaria para la síntesis es menor a la de las Nps de Ag.

Los resultados obtenidos muestran la influencia del contenido de Ag y Cu en las propiedades microbiológicas de las Nps sintetizadas [115].

Se ha reportado la síntesis de Ag con materiales biológicos como hongos y raíces, entre otros donde se reportan CMI para *S.aureus* desde 0.35 a 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , *E. coli* de 0.4 a 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y *A. niger* 16  $\mu\text{g}/\text{ml}$  [5, 116-119], al contrastar estos datos con los obtenidos en la presente tesis, se confirma el potencial del método de síntesis para obtener Nps con actividad antimicrobiana de manera económica.

La falta de estandarización en los análisis de CMI y CML dificulta una comparación rigurosa entre diferentes estudios, pues las mismas Nps aplicadas a diversas cepas de referencia (ATCC, MTCC , etc.), pueden presentar valores muy diferentes de CMI y CML, como es el caso reportado de partículas de Ag y Cu, con CMI desde 40 y 140  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , hasta 180 y 220  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , para diferentes cepas de referencia de *E coli* [43].

## CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES

Las síntesis realizadas con el extracto acuoso de la hoja seca de *Ricinus communis*, no presentan propiedades antimicrobianas, mientras que el extracto con la hoja fresca presenta estas propiedades.

Se determinó el uso de la dilución 1/10 del extracto acuoso, obtenido de la hoja fresca de *Ricinus communis*, como el adecuado en base a la estabilidad de las partículas, en las distintas soluciones de los sistemas Ag:Cu ya que presenta una absorción menor a 1 (intensidad de absorción promedio de 0.5). Datos vistos en las pruebas previas con la metodología donde se emplea el extracto de la hoja seca.

La relación 1:10 en volumen de: "solución Ag:Cu": "extracto acuoso (1/10)", en las síntesis con hoja de *Ricinus communis* fresca, formó Nps mecánicamente estables, en las soluciones de síntesis. Estudios previos con el extracto acuoso de la hoja seca, determinó esta relación con la mayor estabilidad, en relaciones 1:1 y menores, las muestran precipitan en 3 horas o menos, por la formación de partículas de gran tamaño, que se confirman por imágenes de TEM.

Los espectros ultravioleta visible, obtenidos en las síntesis con la hoja fresca aumentan la absorbancia en el rango de 500 - 800 nm, a medida que aumenta la concentración de plata en el sistema.

Se observa que la señal en 405 nm, para los sistemas Ag:Cu, incrementa su intensidad al aumentar la concentración de la Ag. Las nanopartículas con mayor concentración de cobre presentan una señal perfilada desde los 5 minutos, caso contrario a la señal en 442 nm para la plata, donde se ve un mayor perfilamiento de la señal con el tiempo, presentando un plasmón clásico para nanopartículas de Ag esféricas.

En los sistemas de nanopartículas con mayor concentración de Cu 10:90 y 25:75, se observan señales entre 645 y 703.

El espectro de IR muestra interacción entre el extracto acuoso y las partículas formadas en las señales entre 1600 - 1500  $\text{cm}^{-1}$ , mostrando una sola señal en sistemas con un solo tipo de partículas y desdoblándose en dos señales más definidas e intensas conforme aumenta el contenido de Ag en los sistemas Ag:Cu.

El SEM permitió corroborar la presencia de Ag y Cu con la técnica acoplada de EDS, se observó que la concentración de Ag detectada en las Nps, aumenta conforme se aumenta la relación en volumen de la Ag en la solución precursora, pero no mantiene la relación Ag:Cu de la solución precursora.

La formación de partículas con tamaños menores a 100 nm empleando el extracto acuoso de *Ricinus communis*, se corrobora mediante imágenes de TEM.

El sistema 10:90, muestra el mejor desempeño en el control del tamaño y la morfología de las partículas con un tamaño promedio de 18 nm, aumentando tamaño y polidispersidad para el sistema tema 25:75.

Los patrones de difracción obtenidos presentan señales adjudicadas a Ag y Cu.

Se confirma el crecimiento de cepas bacterianas (*S. aureus* y *E. coli*) y fúngicas (*A. niger*) sin contaminación por tinción de Gram (bacterias), mediante la observación con microscopio óptico y confocal.

Todos los sistemas Ag:Cu, presentan acción antimicrobiana para la prueba del halo inhibitorio con *E. coli*.

Todos los sistemas Ag:Cu presentan CMI y CML en las 3 cepas, con excepción del sistema 10:90 que no presento CML para la cepa de *S. aureus*.

El cobre y el extracto de *Ricinus communis* (1/10), no presentan acción antimicrobiana en las cepas.

La síntesis de nanopartículas, a partir de los sistemas Ag:Cu, empleando el extracto acuoso de *Ricinus communis* (1/10), forma partículas menores a 100 nm, con la presencia de Ag y Cu en los sistemas, presenta propiedades antibacterianas y antifúngicas, lo que sugiere la comprobación de la hipótesis.

# ANEXOS

## ANEXO 1

### *Cálculo de la concentración de Ag y Cu en las muestras.*

Para conocer la cantidad de metal en  $\mu\text{g/ml}$  se emplea la ecuación

$$\mu\text{g/ml del metal} = \left( (\text{ml de solución precursora}) \left( \frac{M}{1000} \right) \right) \left( \frac{1}{V_f} \right) (PM)(1000000)$$

$$\mu\text{g/ml del metal} = \left( \text{ml AgNO}_3 \left( \frac{\text{moles/l}}{1000\text{ml/l}} \right) \right) \left( \frac{1}{\text{ml}} \right) \left( \frac{\text{g}}{\text{mol}} \right) (1000000\mu\text{g/g})$$

Dónde:

ml de solución precursora: son los ml de  $\text{AgNO}_3$  o  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  que se emplea, su valor es de 1 para un cálculo de 11ml de volumen final y en el caso de 10:90, 25:75 y 50:50 corresponde a 0.1, 0.25 y 0.5 ml de  $\text{AgNO}_3$  y 0.9, 0.75 y 0.5 de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  respectivamente.

M: Es la molaridad de las soluciones y en todos los casos es de 0.01M.

$V_f$ : es el volumen final resultante de una relación 1:10 de los volúmenes del precursor y del extracto del bioreductor, es decir  $1\text{ml} + 10\text{ml} = 11\text{ml}$ .

PM: es el peso molecular o masa atómica del metal en cuestión.  $PM_{\text{Ag}}=107.8682 \text{ g/mol}$ ,  $PM_{\text{Cu}}=63.546 \text{ g/mol}$ .

El primer término obtiene lo moles tomados de la solución precursora y se divide entre mil para expresar los moles en ml, en el segundo término se calcula la molaridad de la solución en la síntesis (Volumen final), en el tercer término se calculan los gramos a partir de la masa atómica y en el último término se convierten a la expresión de  $\mu\text{g/ml}$ .

Así para los sistemas de Nps sintetizadas se tiene una concentración de:

**Tabla 16. Concentraciones de los metales para los sistemas sintéticos ( $\mu\text{g/ml}$  o  $\text{mg/L}$ ).**

	Cu	10:90		25:75		50:50		Ag
		Ag	Cu	Ag	Cu	Ag	Cu	
$\mu\text{g/ml}$	57.769	9.8062	51.992	24.5155	43.3268	49.031	28.8845	98.062

## ANEXO 2

### Nanopartículas sintetizadas con el extracto de hoja seca de *Ricinus communis*.

#### 1.1. Espectroscopia ultravioleta-visible.

##### 1.1.1. Determinación de la concentración adecuada de *Ricinus communis*.

Se determinó la concentración adecuada del bioreductor para las síntesis reduciendo las soluciones precursoras (Ag:Cu), empleando el volumen correspondiente del extracto acuoso de *Ricinus communis* directamente, así como en diluciones a razón de: 1/10 y 1/100 en los diversos sistemas planteados, razón por la que en solo en este apartado se empleó de referencia una celda con agua para observar las absorbancias del extracto de *Ricinus communis*. Al emplear el extracto directamente se satura la señal del uv-vis, en el caso de la dilución 1/100 la señal azul de la figura 58 correspondiente a la muestra Ag:Cu 25:75 a las dos horas no se aprecia una formación de plasmón después de 400 nm, en el caso de la dilución 1/10 correspondiente a la señal verde se observa que la muestra toma una tonalidad café oscura (Fig. 61a.) que indica la reducción de los iones provenientes de las sales precursoras a metales de valencia cero ( $M^0$ ), el espectro presenta una absorbancia media de 0.5, se puede apreciar la formación de una señal alrededor de 560 nm que podría corresponder a la formación de Nps de Ag:Cu, se establece ésta dilución (1/10) del extracto acuoso para realizar las síntesis de Np's en los diversos sistemas de síntesis debido a la intensidad y presencia del espectro observado.

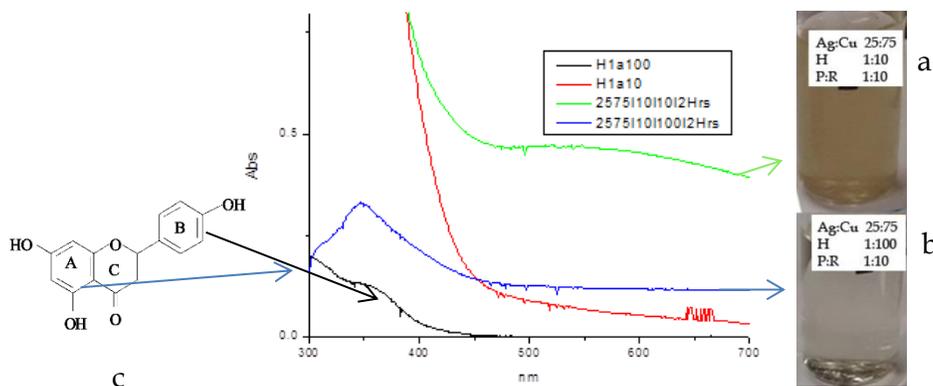


Fig. 58. Espectro Uv-vis de Higuierilla diluida 1:100 (negro), 1:10 (rojo), nanopartículas a 2H. con relación Ag:Cu 25:75 obtenida por reducción con higuierilla diluida 1:10 (verde) y 1:100 (azúl). A la derecha: imágenes de las muestras. a) Ag:Cu 25:75 con relación Precursor:Reductor 1:10 con la dilución del extracto 1/10. b) Ag:Cu 25:75 con relación P:R 1:10 con la dilución del extracto 1/100. c) Estructura de la flavanona.

Las señales presentes por debajo de 400 nm que se aprecian claramente en las muestras de *Ricinus communis* (1/100, 300 nm y 357 nm) y 25:75 (1/100, 346 nm), corresponden a las reportadas para flavonoides como el de la figura 65c que corresponde a la flavonona, estas presentan dos bandas de absorción, una banda de absorción máxima BI entre 320-385 nm que se debe a la absorción del anillo B y una banda más intensa BII de 250 a 285 nm debida a la absorción del al anillo A [120].

### 1.1.2. Determinación de la relación en volumen del precursor Ag:Cu y extracto bioreductor de *ricinus communis*.

Se sintetizaron Np's a partir de la dilución 1/10 del extracto acuoso de *Ricinus communis* propuestas en la tabla de la metodología (Tabla 9) que plantea las reducciones de los precursores mediante la combinación de un volumen de la solución precursora (Ag:Cu 10:90, 25:75, 50:50) por 0.25, 0.5, 1, 5 y 10 veces dicho volumen del bioreductor (*Ricinus communis* 1/10), de las cuales se muestran las imágenes al cabo de 6 horas de reacción (Fig 59)

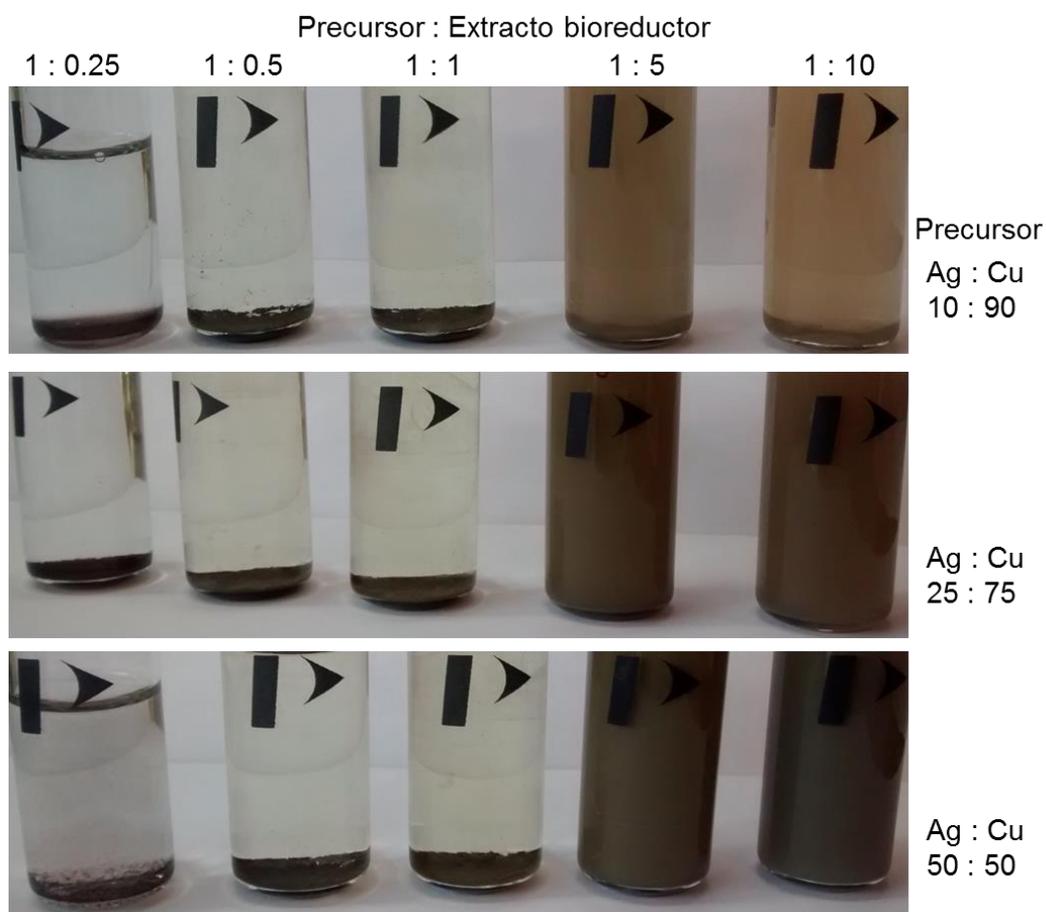
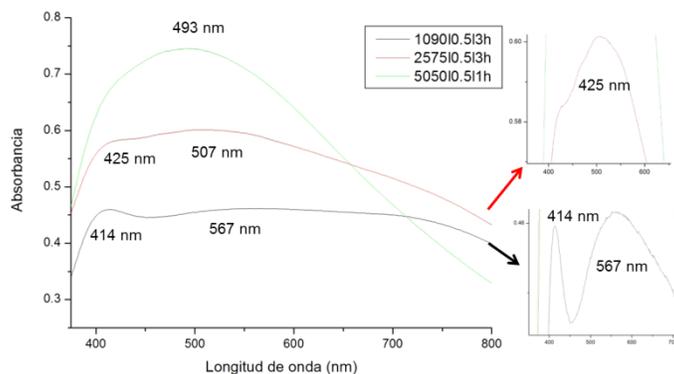


Fig. 59. Muestras de Nps obtenidas por diversas relaciones de volumen: precursor:extracto (columnas) ; precursores Ag:Cu (filas).

Se observa que para las diversas relaciones de Ag:Cu, que al aumentar la relación del volumen de bioreductor con respecto al de los precursores se tiene una mayor estabilidad ya que a relaciones menores que 1:5, las muestras precipitan antes de las 6 horas, mientras que las muestras 1:5 y 1:10 permanecen en suspensión, también se puede apreciar que al aumentar la cantidad de plata en el precursor se puede observar una mayor intensidad de color en la muestra, lo que podría sugerir que al tener una mayor cantidad de plata, la cual se reduce más fácilmente se pueden generar una mayor cantidad de semillas que darían lugar a la formación de más partículas con menor tamaño permitiendo que estas permanezcan en suspensión, mientras que en aquellas que precipitan se puede inferir la formación de aglomerados y partículas más grandes mismas que se observaron en imágenes de microscopía posteriormente.

Se realiza en análisis por espectroscopia ultravioleta visible para las muestras con 0.5 (Fig. 60), 1, 5 y 10 (Fig. 61) veces el volumen de la solución precursora.

En el espectro de la Figura 60 se observa que en el sistema sintético con 0.5 veces el volumen del bioreductor con respecto a la solución precursora, la reducción de las partículas para las relaciones Ag:Cu 10:90 y 25:75 presentan dos señales principales (alrededor de los 400 nm y de 500-600 nm), las cuales a mayor contenido de plata en la solución precursora aumenta la longitud de onda a la que se presenta la señal, llegando a tener una sola señal a 493 nm en la síntesis con solución precursora Ag:Cu 50:50.



**Fig. 60. Espectro Uv-vis de nanopartículas Ag:Cu (10:90, 25:75, 50:50) en el sistema de un volumen de solución precursora por 0.5 veces el volumen de Bioreductor.**

El corrimiento de la señal por el aumento de Ag en la solución precursora también se observa en la síntesis con 10 veces el volumen del bioreductor en la figura 61, además se puede observar que a esta relación de volumen se obtiene una sola señal para cada sistema.

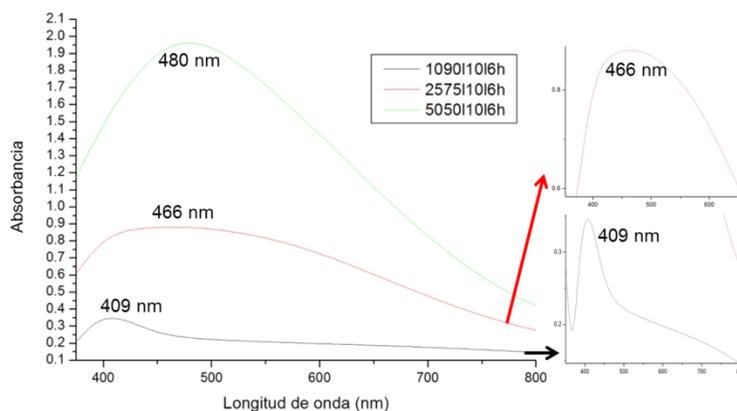


Fig. 61. Espectro uv-vis de nanopartículas Ag:Cu (10:90, 25:75, 50:50) en el sistema de un volumen de solución precursora por 10 veces el volumen de Bioreductora las 6 horas de reacción.

En la tabla 17 se presentan los tiempos de absorción máximos y las longitudes de onda presentadas para los diversos sistemas sintéticos:

Tabla 17. Señales de absorción en uv-vis de los sistemas Ag:Cu y Precursor: Extracto acuoso (1/10) a 6 horas.

PRECURSOR Ag:Cu	PRECURSOR:EXTRACTO (1/10)	Tiempo Abs - Max	$\lambda$ Abs - Max
10:90			
	1 : 0.5	3h	414 ; 567
	1 : 1	3h	409 ; 595
	1 : 5	>6h	409 ; 606
	1 : 10	>6h	409
25 : 75			
	1 : 0.5	3h	425 ; 507
	1 : 1	3h	414 ; 509
	1 : 5	>6h	504
	1 : 10	>6h	466
50 : 50			
	1 : 0.5	1h	493
	1 : 1	3h	499
	1 : 5	>6h	495
	1 : 10	>6h	480

Se puede observar que los espectros con dos señales pertenecen a síntesis con mayor cantidad de Cu y menor volumen del bioreductor, esto se puede deber a una mayor competencia de Nps de Ag con respecto a las Nps del sistema Ag:Cu dando dos señales, mientras que los espectros con una sola señal se pueden adjudicar a una mayor estabilidad en la formación de una especie de Nps Ag:Cu del sistema.

Debido a la estabilidad presentada así como al interés de emplear un método sintético que presente una menor repercusión ambiental se decidió tomar la relación de volumen 1:10 (precursor:bioreductor) para realizar las pruebas microbiológicas, en las cuales se observaron resultados negativos para éste sistema sintético que emplea la hoja seca de *ricinus communis* para obtener el extracto, por lo que se realizó una síntesis con el extracto obtenido de la hoja fresca.

## **1.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM) 25:75.**

Se observan cúmulos de Nps (puntos brillantes), presentan variaciones en su composición química de Ag:Cu con respecto a las cantidades empleadas en la síntesis, aunque presenta valores cercanos, como se puede apreciar en los análisis de la muestra 25:75 (Fig. 65 e, f), estas variaciones se pueden deber a la forma en que se están organizando las Nps, así como a la sección en que se lleva a cabo el análisis elemental. Siendo posible que se encuentre una mayor cantidad de plata en la superficie de las Nps, lo cual podría aumentar la señal de la misma en el % de peso para el análisis elemental EDS.

Las micrografías de las figuras 62a y 62b muestran que las partículas quedan embebidas dentro de aglomerados grandes, por lo que se podría pensar que ésta puede ser la razón por la cual a pesar de formar Nps pequeñas, no presentan acción antimicrobiana, ya que al quedar embebidas no pueden interactuar con los microorganismos.

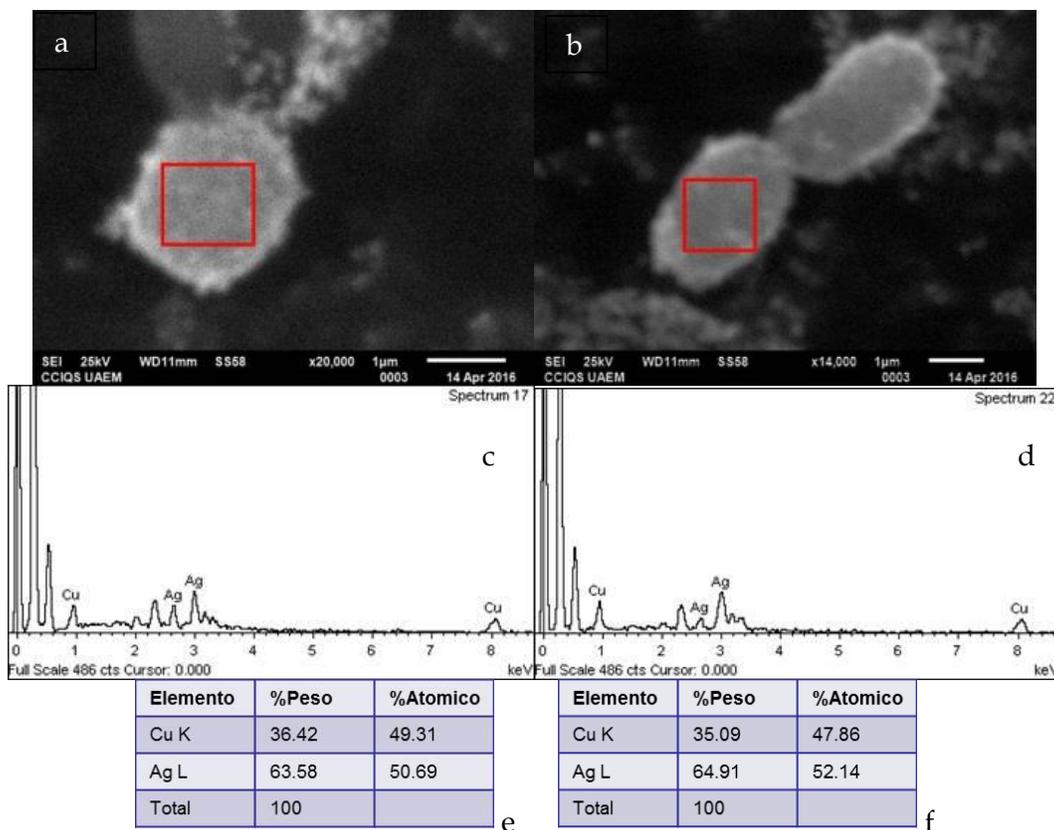


Fig. 62. Microanálisis elemental de las Np's de Ag:Cu 25:75 para un volumen 1:10 de Precursor:Bioreductor. Area de análisis en cuadro rojo (a,b), espectro EDS (c,d) y porcentaje en peso (e, f).

### 1.3. Microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Ésta técnica permite observar la morfología, tamaño y composición de las partículas (patrón de difracción), se observan unas muestras sintetizadas con la hoja de *Ricinus communis* seca para corroborar tamaños de partículas en aquellas que precipitan, así como una de las muestras que presentaron resultados negativos en el análisis antimicrobiano, estas muestras son de los sistemas con relación precursor:bioreductor 1:0.25 y 1:10 respectivamente, la solución precursora empleada es Ag:Cu 25:75 en ambos casos.

#### 1.3.1. Sistema Ag:Cu 25:75; precursor:bioreductor 1:0.25.

De entre las muestras que presentaron precipitación antes de las 3 horas, se observó la muestra Ag:Cu 25:75 con una relación precursor:reductor 1:0.25 (Fig. 63), en el cual se observa una gran polidispersidad en las partículas con tamaños que rondan de los 30 nm a

los 250 nm con algunas partículas que alcanzan hasta los 290 nm (Fig. 63 c y d), así como la formación de nanoalambres de dimensiones que superan las 5 micras de largo (Fig. 63 a y b), al igual que aglomerados de partículas de gran tamaño, lo cual repercute en la estabilidad de la solución, razón por la cual la muestra precipita.

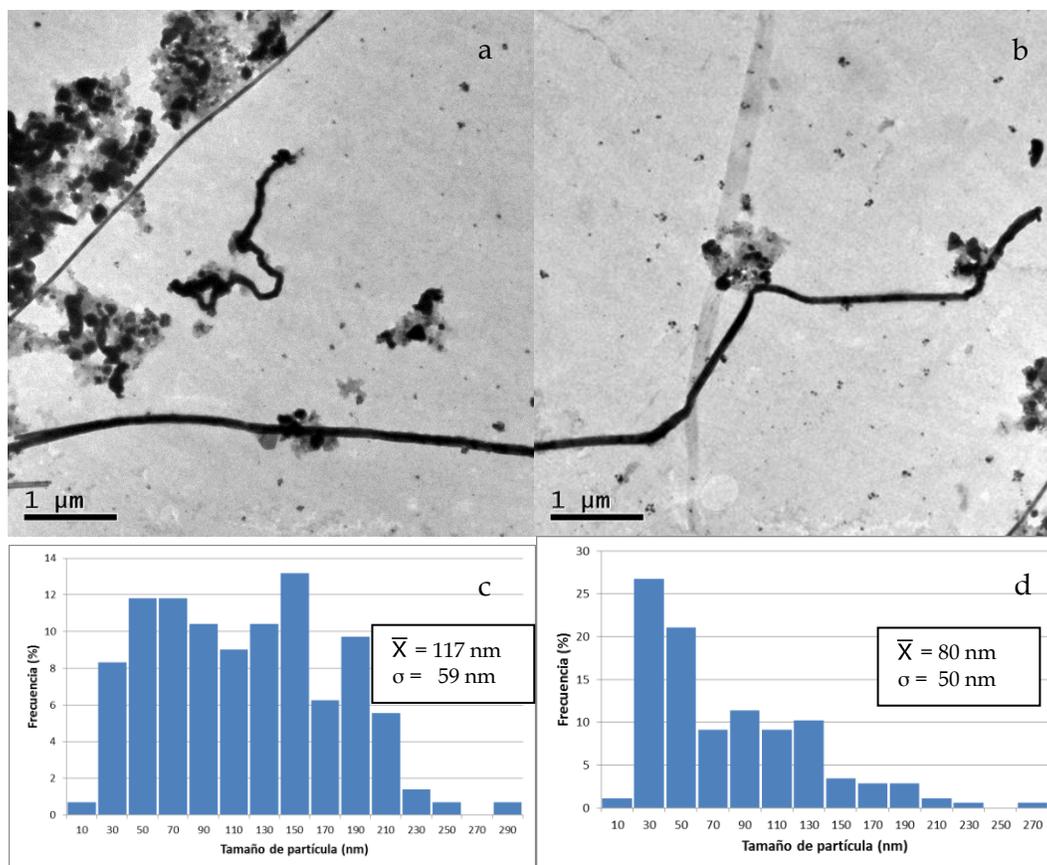


Fig. 63. Micrografía de muestra Ag:Cu 2575; precursor:bioreductor 1:0.25 (a,b) histograma de frecuencias para las micrografías (c,d)

En la figura 64b se puede observar polimorfismo en el que predominan partículas esféricas a razón de que el tamaño de las mismas disminuye obteniéndose Nps de alrededor de 5 nm para las partículas vistas en la micrografía.

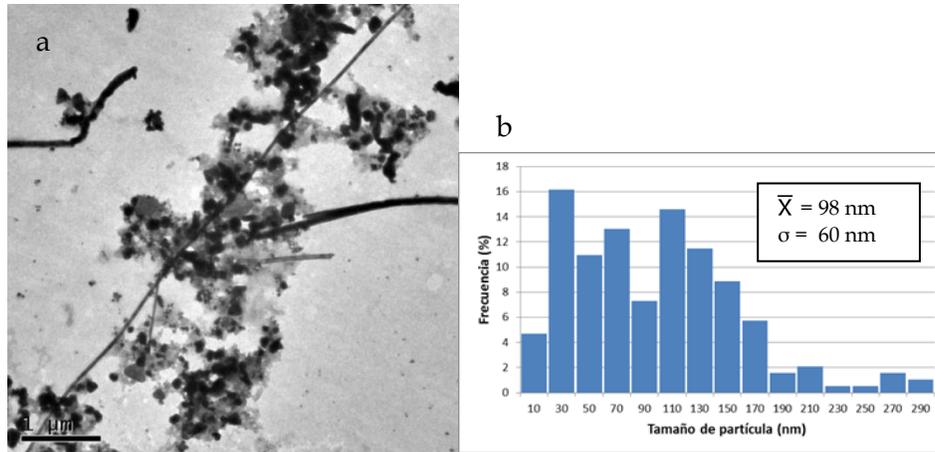


Fig. 64. Micrografía de muestra Ag:Cu 25:75; precursor:bioreductor 1:0.25 (a,b) histograma de frecuencias para las micrografías (c,d).

Al obtener el patrón de difracción para esta muestra (Fig. 65) se pueden observar distancias interplanares que se adjudican a los planos cristalinos de la plata y del cobre al relacionarlas con las tarjetas de difracción 03-065-8428 para plata y 01-070-3038 para cobre, lo cual confirma la presencia de estos en las partículas observadas.

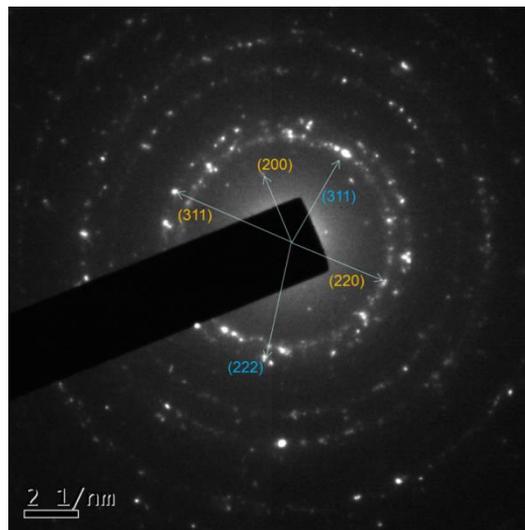


Fig. 65. Patrón de difracción de muestra Ag:Cu 25:75; precursor:bioreductor 1:0.25.

### 1.3.2. Sistema Ag:Cu 25:75; precursor:bioreductor 1:10.

En el caso de esta muestra en la figura 66 se puede observar una mayor formación de Nps en el rango de 5 nm con una cantidad importante en alrededor de los 27.5 nm se aprecia polimorfismo que tiende a partículas esféricas en razón de un menor tamaño de las partículas. La mitad de estas partículas están en el rango de los 15 a 40 nm (Fig. 67),

confirmando que el uso de una mayor cantidad del bioreductor permite un control mayor en el tamaño y la dispersidad de las partículas.

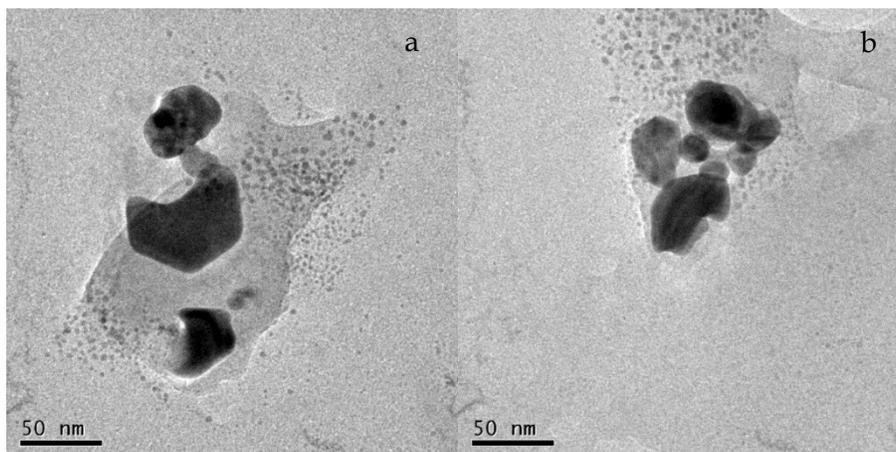


Fig. 66. Micrografías de muestra Ag:Cu 25:75; precursor:bioreductor 1:10.

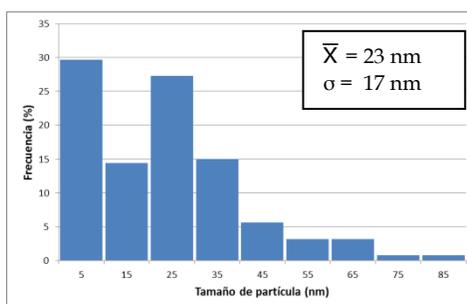


Fig. 67. Histograma de frecuencia para las partículas del sistema Ag:Cu 25:75; precursor:bioreductor 1:10.

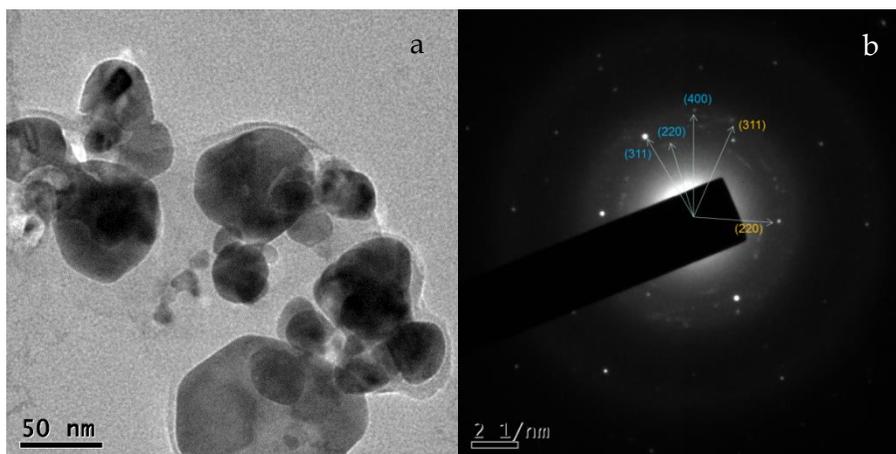


Fig. 68. Micrografía para el sistema Ag:Cu 25:75; precursor:bioreductor 1:10. b patrón de difracción de las partículas en la micrografía a.

El patrón de difracción en la figura 68 presenta distancias interplanares que se pueden adjudicar a la presencia de Ag y Cu en la muestra.

# ANEXO 3

## Tarjetas cristalográficas.

### Ag

Pattern : 03-065-8428		Radiation = 1.540600		Quality : Calculated			
Ag		<i>d</i> (Å)	<i>i</i>	<i>h</i>	<i>k</i>	<i>l</i>	
		2.38330	999	1	1	1	
		2.06400	458	2	0	0	
		1.45947	227	2	2	0	
Silver		1.24464	225	3	1	1	
		1.19165	62	2	2	2	
		1.03200	26	4	0	0	
		0.94703	78	3	3	1	
		0.92305	74	4	2	0	
		0.84262	63	4	2	2	
<p><b>Lattice</b> : Face-centered cubic</p> <p><b>S.G.</b> : Fm-3m (225)</p> <p><b>a</b> = 4.12800</p>		<p><b>Mol. weight</b> = 107.87</p> <p><b>Volume [CD]</b> = 70.34</p> <p><b>Dx</b> = 10.185</p>					
<p><b>Z</b> = 4</p>		<p><b>I/cor</b> = 17.26</p>					
<p><b>NIST M&amp;A collection code:</b> A 211 49095 12/  <b>Temperature factor:</b> TF TF was not given, B set to 1.000 for calc.  <b>Analysis:</b> Ag0.996 Bi0.004  <b>Sample preparation:</b> Prepared by rapid cooling of stoichiometric melt.  <b>Remarks from ICSD/CSD:</b> Metastable phase. Solute Ag<sub>1-x</sub>Bix, x= 0-0.04, a= 4.086-4.128, linear dependence, (information taken from figure)  <b>Data collection flag:</b> Ambient.</p>							
<p>Predel, B., Bankstahl, H., Z. Metallkd., volume 67, page 793 (1976)            Calculated from NIST using POWD-12++</p>							
<p><b>Radiation</b> : CuKα1</p> <p><b>Lambda</b> : 1.54060</p> <p><b>SS/FOM</b> : F9=1000(0.0001,9)</p>		<p><b>Filter</b> : Not specified</p> <p><b>d-sp</b> : Calculated spacings</p>					

# Cu

Pattern : 01-070-3038		Radiation = 1.540600		Quality : Calculated		
Cu		<b>d (Å)</b>	<b>i</b>	<b>h</b>	<b>k</b>	<b>l</b>
		2.09289	999	1	1	1
		1.81250	427	2	0	0
Copper		1.28163	172	2	2	0
Copper		1.09298	157	3	1	1
<b>Lattice</b> : Face-centered cubic		<b>Mol. weight</b> = 63.55				
<b>S.G.</b> : Fm-3m (225)		<b>Volume [CD]</b> = 47.63				
<b>a</b> = 3.62500		<b>Dx</b> = 8.861				
		<b>Dm</b> = 8.930				
	<b>Z</b> = 4	<b>l/cor</b> = 8.87				
<p><b>ICSD collection code:</b> 053246  <b>Test from ICSD:</b> REF Current Science.  <b>Test from ICSD:</b> REF Acta Crystallographica A (24,1968-38,1982).  <b>Test from ICSD:</b> ACACB 25 (1969) 676-682.  <b>Test from ICSD:</b> CLAS m-3m (Hermann-Mauguin) - Oh (Schoenflies).  <b>Test from ICSD:</b> PRS cF4.  <b>Test from ICSD:</b> ANX N.  <b>Test from ICSD:</b> WYCK a.  <b>Remarks from ICSD/CSD:</b> REM M Cell from 2nd reference: 3.61491 at RT, 3.61536 at 308  <b>Remarks from ICSD/CSD:</b> REM 3.61638 at 328 K.  <b>Remarks from ICSD/CSD:</b> REM M PDF 00-004-0836.  <b>Test from ICSD:</b> No R value given in the paper. (Code 51).  <b>Test from ICSD:</b> At least one temperature factor missing in the paper. (C  <b>Additional pattern:</b> See PDF 01-085-1326.  <b>Data collection flag:</b> Ambient.</p>						
<p>Srinavasa-Rao, S., Anantharaman, T.R., Curr. Sci., volume 32, page 262 (1963)            Calculated from ICSD using POWD-12++</p>						
<b>Radiation</b> : CuKα1		<b>Filter</b> : Not specified				
<b>Lambda</b> : 1.54060		<b>d-sp</b> : Calculated spacings				
<b>SS/FOM</b> : F4=1000(0.0000,4)						

# Biosynthesis of Ag/Cu bimetallic nanoparticles using *Ricinus communis* and their antibacterial and antifungal activity

Fernando López-Ubaldo<sup>1</sup>, Víctor Sánchez-Mendieta<sup>2</sup>, Oscar F Olea-Mejía<sup>2</sup>, Sol González-Pedroza María<sup>3</sup> and Raúl A Morales Luckie<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Maestría en Ciencia de Materiales de la Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Colón Esquina Paseo Toluca S/N, Toluca Estado de México, CP 50000, México

<sup>2</sup>Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable UAEM UNAM - Carretera Toluca-Atlaomulco Km. 14.5 Toluca, México

<sup>3</sup>Doctorado en Ciencia de Materiales de la Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Colón Esquina Paseo Toluca S/N, Toluca Estado de México, CP 50000, México

E-mail: [rاملuckie@gmail.com](mailto:rاملuckie@gmail.com)

Received 6 November 2019

Accepted for publication 13 April 2020

Published 28 May 2020



CrossMark

## Abstract

This work demonstrates an efficient, low-cost and environmentally friendly synthetic method of Ag/Cu bimetallic nanoparticles (NPs), which allows taking advantage of renewable resources, using *Ricinus Communis* leaf extract as bioreducing and passivating agent. By varying the metal salt precursors of AgNO<sub>3</sub> and CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O concentrations, the stable bimetallic NPs were obtained. The Ag/Cu bimetallic NPs were characterised using ultraviolet-visible absorption spectroscopy (UV-vis), Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), X-ray dispersive energy spectroscopy (EDS), and scanning and transmission electron microscopy (SEM and TEM). In all cases, the particles size is less than 100 nm. The 10:90 Ag/Cu system has the best control of morphology (spheroid) and size in range of 10–25 nm ( $\bar{X} = 18$  nm,  $\sigma = 9$ ). Selected area electron diffraction patterns (SAED) are in concordance with JCPDF cards for silver and copper face-centered cubic (fcc) crystal structures. Microbiological susceptibility was tested by disc diffusion, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimal lethal concentration (MLC) methods, with the following microorganism strains: *Staphylococcus aureus* (gram +), *Escherichia coli* (gram –) and *Aspergillus niger* (fungus). The MIC concentration for the three strains was found to range from 1.25 to 2.45  $\mu$ g and the MLC allowance ranges from 2.45 to 9.81  $\mu$ g.

Keywords: bimetallic nanoparticles, green nanosynthesis, bionanotechnology, *Ricinus communis*

Classification numbers: 2.04, 4.02

## 1. Introduction

Nanostructured metallic materials have been of great interest because the control of their size, distribution, structure, morphology and medium composition, allows absorbing and dispersing the energy of the medium in a different way compared to that in microscopic materials, changing drastically physical, chemical, mechanical, magnetic, biological, optical, electrical, physicochemical and catalytic properties [1, 2]. This allows the design of materials for specific needs,

which reduces the necessary material and demanded energy.

It has potential applications in various areas of study and industrial processes such as chemistry, biology, medicine, health, biomedical science, catalysis, electronics, environment, cosmetics, industrial foods, among others [1, 3–6].

Several physical, chemical and biological synthetic methods have been studied to control nanoparticles (NPs) properties [7–10]. Following the principles and philosophy of green chemistry, methods and procedures focus on the use of biological material to maximise resources, reduce or eliminate

the use of dangerous reagents, pollution, generation of hazardous substances and toxic waste in more environmentally friendly processes [11–18]; biomass such as bacteria, fungi, tree components, shrubs, and their fruits or extracts are used to carry out the bioreduction [6, 7, 19–24]. The synthesis of metal NPs using diverse plant aqueous extracts as reducing agents has been the main methodology employed so far [25]. It is, usually, a straightforward method; the kinetics of this bioreduction reaction can be easily monitored by UV–vis spectroscopy, throughout the surface plasmon resonance. Perhaps the only disadvantage of this method is the polydispersity of the obtained NPs and their different morphology that appears with some bioreducing agents. However, these latter characteristics of NPs are not so important in several metal NPs applications, such as sensing [26] and antibacterial properties [27]. Recently, the interest has been devoted to research on biomedical applications such as empowered antimicrobial [28] and anticancer [29] properties of biogenic metal NPs, where the main appeal is related to the facile and green synthetic methodology, and to the possible synergic interactions between the metal nanoparticle and the surrounding biomolecules, coming from the reducing agent precursors. In this context, the present synthesis focuses on the use of aqueous leaf extract of *Ricinus communis* (*R. communis*) as a reductant and passivating agent, since it contains bioactive constituents such as alcohols, amino acids, proteins, lactones, terpenoids, flavonoids, among others that can perform well these roles [6, 30–32].

Noble metals microbiological properties have been extensively investigated. Specifically, noble metals NPs have shown superior antimicrobial action than their bulk form [33]. Particularly, Ag NPs [4, 20–22, 34–37] have been demonstrated to exhibit stability, conductivity, catalytic activity, antibacterial, antiviral, antifungal, anti-inflammatory properties [4, 5, 38]. Ag and its compounds with other metals such as Cu [30, 33, 39] are of interest because they combine the properties of different elements, enhancing the characteristics of the Ag–Cu material [14, 17, 18, 33, 38, 40], also, the lower price of Cu reduces the cost, making cheaper materials and processes. Ag NPs have been obtained through the extract of *R. communis* [5, 6] that in India is used in the traditional health area, in Mexico the seed is exploited to obtain the castor oil [41–43] and is considered a pest, so the synthesis of bimetallic Ag/Cu NPs presents an opportunity to exploit natural resources.

Herein, bimetallic Ag/Cu NPs were synthesised throughout an easy, low-cost and green methodology, using *R. Communis* leaf aqueous extract as reducing agent. Moreover, the antibacterial and antifungal properties of Ag/Cu NPs, with different compositions, were evaluated.

## 2. Experimental

### 2.1. *R. communis* leaf aqueous extract preparation

*R. communis* leaves were collected in the Tenancingo de Degollado, State of Mexico, Mexico. They were washed with

abundant water and then several times with deionised water. Next, they were placed to sun-dry on watch glasses with filter paper and then the dried leaves were cut into little pieces. 10 g of these leaves was added to 100 ml of deionised water and boiled for 5 min. Next, they were cooled at room temperature and filtered to obtain the aqueous extract. A 1/10 dilution of the aqueous extract was used for the synthesis.

### 2.2. Biosynthesis of bimetallic Ag/Cu NPs

10 mM solutions of silver nitrate ( $\text{AgNO}_3$ ) and copper sulfate ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) were prepared with Ag/Cu volume ratios of 10:90, 25:75 and 50:50. The corresponding Ag/Cu precursor solution and 10 ml of *R. communis* extract (1/10) were mixed in 1 ml vials. The solutions became grayish over time.

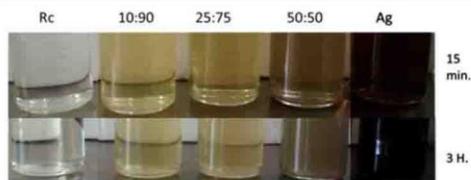
### 2.3. Characterisation studies

NPs biosynthesis was monitored for six hours by scan of maximum absorption wavelength of 280–800 nm in a UV–vis Cary 100 spectrophotometer. Double beam correction and zero baseline of the spectrum were made placing the aqueous extract of *R. communis* (1/10), used in the synthesis, in the cell reference. Fourier-transform infrared (FTIR) spectra were obtained with a Prestige-21 Shimadzu infrared spectrophotometer with a scan of 4000 to 500  $\text{cm}^{-1}$ . Drops of the samples were placed in a glass slide and dried to place the powder in the sample holder.

The size, morphology and composition of the bimetallic NPs were studied by a 200 kV JEOL 2100 transmission electron microscope (TEM) with  $\text{LaB}_6$  filament and scanning electron microscopy (SEM) in a JEOL JSM-6510LV microscope equipped with an elementary microanalysis system. For TEM measurement, the samples were sonicated for 15 min. Next, these samples were separated and cleaned by centrifugation for 15 min at 9000 rpm, followed by decanting and re-dispersing in deionised water for washing on several occasions. The images were analysed with the program ‘Image J’. For SEM, the samples were sonicated for 5 min and drops were placed on double-sided carbon tape over metal slide.

All microbiological manipulations were performed inside the laminar flow cabinet. Antibacterial activity was evaluated in strains of *S. aureus* ATCC25293 and *E. coli* ATCC25922, seeded in test tubes with BHI (Brain Heart Infusion) agar medium and EMB (Eosin Methylene Blue) agar respectively incubated at 38 °C for 48 h, antifungal activity was evaluated with a strain of *A. niger* in PDA (Potato Dextrose Agar) culture medium incubated at 25 °C for 48 h. The colonies were taken from Petri dishes seeded in same conditions

For disc diffusion test (inhibitory halo), a seeded colony in a Petri dish of the *E. coli* strain ATCC25922 was taken, with sterile saline solution and UV–vis spectrophotometer at 625 nm it was equal to turbidity standard 0.5 McFarland ( $1 \times 10^8$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ ). The inoculum was rolled on a Petri dish with MH (Müller-Hinton) agar and allowed to dry. Whatman No. 42, 6 mm filter paper discs impregnated with NPs (15-min sonication in the vials with NPs and allowed to dry)



**Figure 1.** Photograph of NPs synthesised with *R. communis* aqueous (1/10) extract and mixture solutions of (CuSO<sub>4</sub>) and Ag (AgNO<sub>3</sub>) with volume ratios of Ag:Cu of 10:90, 25:75, 50:50, at 15 min and 3 h. Rc (*R. communis* extract 1/10).

are placed on the Petri dish and incubated at 36 °C for 48 h to observe and measure the halo.

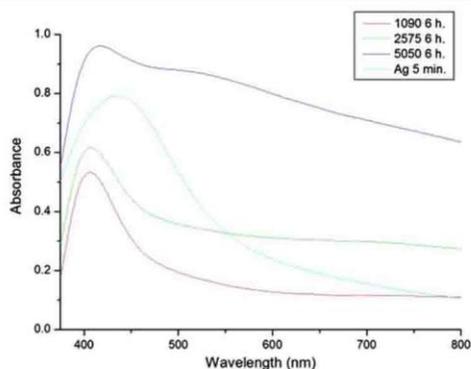
**2.3.1. Minimum inhibitory concentration (MIC).** Sterile treated multiple polystyrene well plates with 8 × 12 (96) with work capacity of 200 μl/well were used. In the second column of the plate an aliquot of 200 μl of NPs was placed and 100 μl of MH culture broth was added in the rest of the wells. NPs were diluted consecutively to 50% with a 100 μl pipette taking an aliquot of the NPs well and diluting it in the right well, continuing subsequently to column 11 (leaving only 100 μl) the last column on the right only with culture broth. An aliquot of each preparation with microorganism to be evaluated was prepared and was taken from 1 × 10<sup>8</sup> CFU ml<sup>-1</sup> (0.5 McFarland) concentration to 1 × 10<sup>6</sup> CFU ml<sup>-1</sup>, pouring 100 μl into each well from the one containing the undiluted NPs until the last to have a final concentration of 5 × 10<sup>5</sup> CFU ml<sup>-1</sup>. The plate was closed and incubated according to the microorganism. The test is valid if the first column with culture broth remains translucent and the last column is turbid.

**2.3.2. Minimal lethal concentration (MLC).** Subcultures of the MIC were made. A Petri dish with MH agar was divided into six sections: a blank (takes nothing), control (column 12 of the MIC boxes that is the broth and microbial culture) and in the rest a small drop of the wells was placed where there was no turbidity for each sample of NPs. It was incubated according to the previous specifications. The test is valid if there is no growth in the target and there is growth in the control; for the samples taken from the MIC, the MLC was the one where there was no growth.

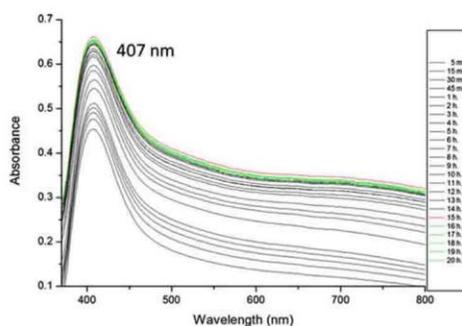
### 3. Results and discussion

#### 3.1. UV-vis absorbance spectroscopy

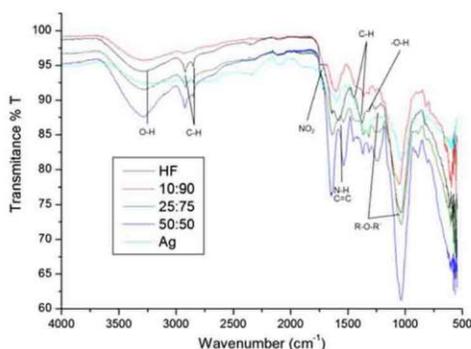
NPs were obtained from *R. comunis* extract in proportion ((1/10) 1 ml of extract and 9 ml of deionised water) and 10 mM precursor solutions of Ag/Cu 10:90, 25:75 and 50:50. When the extract was added, solutions turned to a yellow-brown colour, which intensified slowly as time elapsed, as shown in figure 1, which indicates the metal ion reduction and the NPs formation.



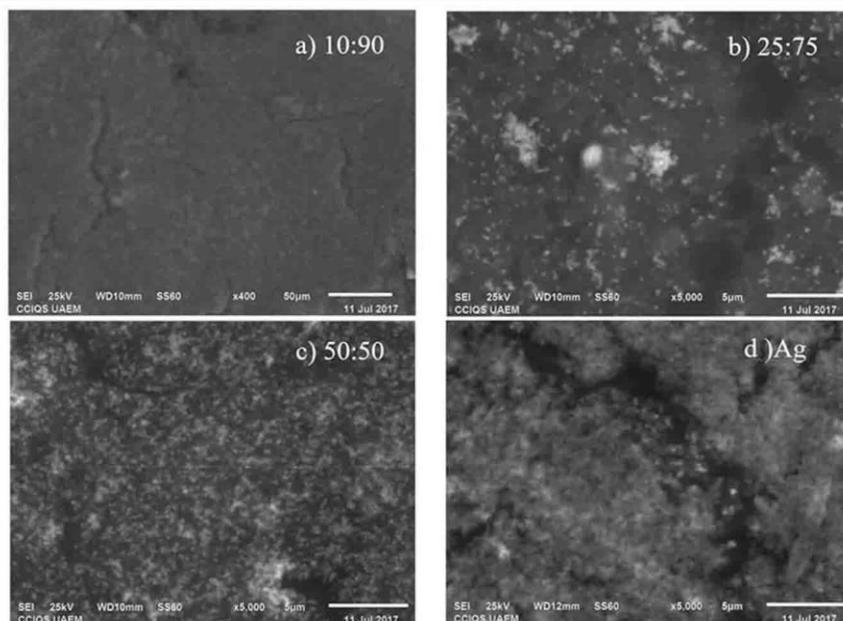
**Figure 2.** UV-vis spectra of Ag/Cu systems at 6 h and Ag NPs at 5 min.



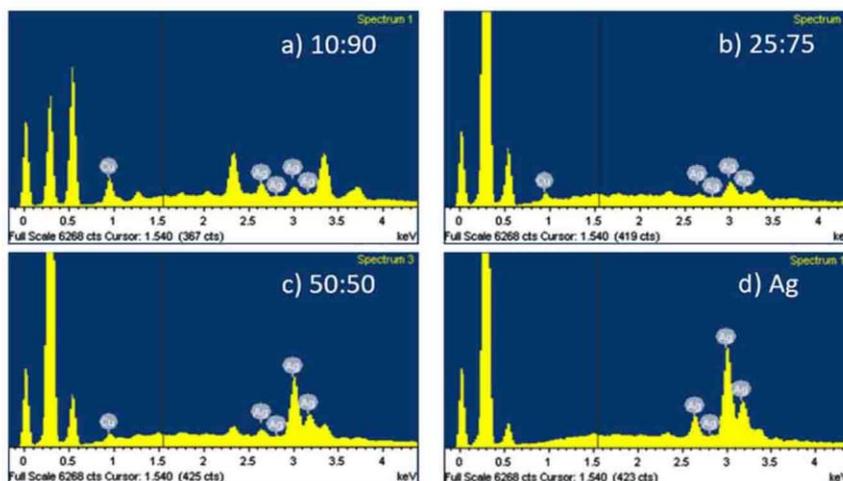
**Figure 3.** UV-vis spectra of Ag/Cu 50:50 system from 5 min to 20 h.



**Figure 4.** FTIR spectra of *R. communis* (HF-black line), Ag/Cu 10:90 (red), 25:75 (green), 50:50 (navy blue) and Ag NPs (blue).



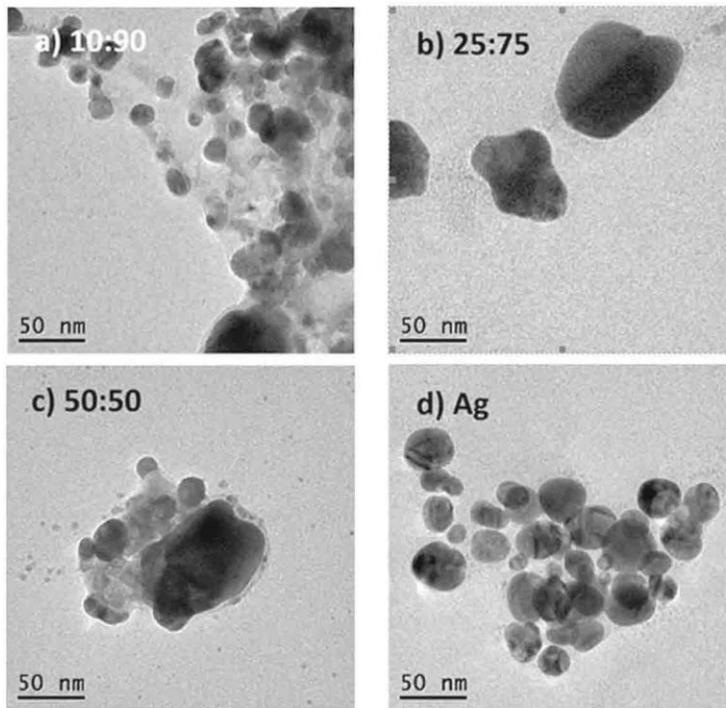
**Figure 5.** SEM images of nanoparticles of: (a) Ag/Cu systems 10:90; (b) 25:75; (c) 50:50; (d) Ag.



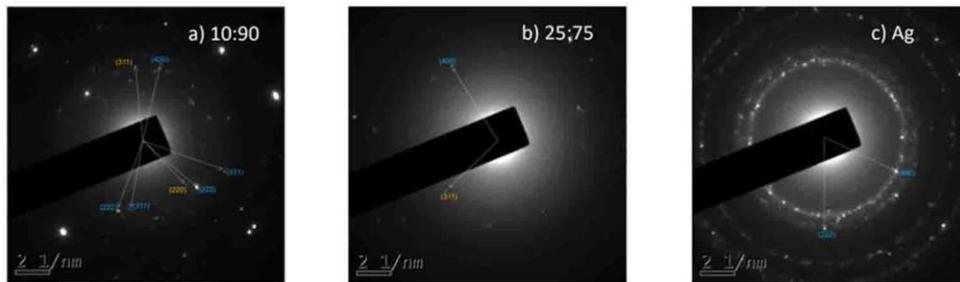
**Figure 6.** EDS spectra for: (a) Ag/Cu 10:90, (b) 25:75, (c) 50:50 and (e) Ag NPs systems. Cu appears around 1 and Ag between 2.6 and 3.3 keV, respectively.

UV-vis spectra show the corresponding surface resonance plasmon (SPR) at peaks from 407 to 442 nm and the absorption intensity increases with the Ag concentration in the system, as seen in the spectra at 6 h for samples Ag/Cu of

10:90, 25:75, 50:50 and 5 min for Ag (figure 2). It shows that in Ag/Cu systems the range of 480–800 nm increases absorbance too, which does not occur in Ag NPs, which indicates formation of particles of different compositions or



**Figure 7.** TEM images of: (a) 10:90 Ag/Cu, (b) 25:75 Ag/Cu, (c), 50:50 Ag/Cu and (d) Ag NPs.



**Figure 8.** SAED pattern of: (a) 10:90 Ag/Cu, (b) 25:75 Ag/Cu and (c) Ag NPs.

**Table 1.** EDS atomic % for Ag and Ag/Cu systems.

	10:90	25:75	50:50	Ag
	Atomic %	Atomic %	Atomic %	Atomic %
Cu	81.67	36.67	13.00	0.00
Ag	18.36	63.33	87.00	100.00
Total	100.00	100.00	100.00	100.00



**Figure 9.** Inhibitory halo on Petri dish of *E. coli* strain for discs impregnated with *R. communis* extract (1/10) (Hf), Ag/Cu NPs systems with ratios of 10:90, 25:75 and 50:50.

sizes for samples with ratios of 25:75, 50:50; Ag NPs spectrum in 442 nm and image show that it reduction is faster and concordant with spherical NPs reported to Ag [5, 6].

A UV-vis cell of 25:75 system sample was monitored for 20 h to see the maximum absorbance that was 15 h as seen in the figure 3, 16–24 h signals in green remained stable.

### 3.2. FTIR analysis

The FTIR spectrum signals from the extract of the *R. communis* leaf in figure 4 (black line) are identified as follows. The band at  $3286\text{ cm}^{-1}$  corresponds to O–H stretching for the H associated with sugars, phenols and alcohols [6]. Bands between  $2993$  and  $2850\text{ cm}^{-1}$  correspond to C–H stretching of hydrocarbon chains. In  $1747\text{ cm}^{-1}$  the asymmetric stretching of  $\text{NO}_2$  is found. The signal at  $1643\text{ cm}^{-1}$  corresponds to N–H bending primary amines. Signals at  $1457$  and  $1373\text{ cm}^{-1}$  correspond to C–H stretching. The band on  $1318\text{ cm}^{-1}$  corresponds to O–H bending and the bands at  $1266$  and  $1046\text{ cm}^{-1}$  can be attributed to ether linkages [5].

In FITR the signals assigned to the terpenoids used for the biosynthesis of Ag NPs are: of  $1636$ ,  $1608$  and  $1500\text{ cm}^{-1}$  to vibrations of elongation  $\text{C}=\text{C}$  of aromatic rings,  $1432\text{ cm}^{-1}$  to OH deformations that traversed to  $1382\text{ cm}^{-1}$  when forming Ag NPs,  $1384\text{ cm}^{-1}$  to terminal methyl groups and the signals of  $1300\text{ cm}^{-1}$  to  $885\text{ cm}^{-1}$  to C–O stretching vibrations of alcohols, ethers and esters [31, 32], suggesting the presence of alcohols, ketones, aldehydes, lactones, terpenoids, flavonoids, amino acids and proteins absorbed on the surface via the interaction of  $\pi$  electrons or carbonyl groups, indicating that the biomolecule possibly performs the two

functions of formation and stabilisation of NPs in the aqueous medium [6, 30–32].

The band around  $1643\text{ cm}^{-1}$ , with Ag NPs, is a discrete signal, in 10:90 rate it forms a more intense signal, when increasing the concentration of Ag (25:75 and 50:50) it is divided into two signals, each time more defined; the signal at  $1266\text{ cm}^{-1}$  (R–O–R') widens and lengthens as the concentration of Ag increases in the Ag:Cu systems, suggesting that the signals are due to the interaction of the biomolecules in the extract and the metal particles formed.

### 3.3. SEM-EDS analysis

SEM analysis was carried out to see aggregates that form the particles and to analyse the chemical composition by EDS to evidence the presence of metals in the synthesised samples. Secondary electrons analysis micrographs in figure 5 allow us to observe the aggregate topography of nanoparticles. An increase of particles with greater brightness when increasing the concentration of silver in the systems, can be observed, these particles are embedded in the biomass of the synthesis.

X-ray energy dispersion spectrometry (EDS) elemental analysis for Cu and Ag (figure 6 and table 1) shows the increase in Ag atomic percent concentration in the NPs, Ag concentration determined in the NPs is higher than the Ag ratio added to the systems: 10:90 (18:82), 25:75 (63:37) and 50:50 (87:13). It is reported that the decrease in the concentration of Cu can be due to the formation of NPs with Cu core and Ag shell or Ag/Cu NPs [44–46]. Another justification for these results is that  $\text{Cu}^0$  reduces  $\text{Ag}^+$  ions, forming  $\text{Cu}^{2+}$  ions in solution that are reduced again [45, 46] and are covered by Ag, the remaining  $\text{Cu}^{2+}$  is reduced in a large crystal of  $\text{Cu}^0$  [45].

### 3.4. TEM studies

TEM images show predominantly spherical shape for small particles and irregular form for larger particles. The 10:90 system (figure 7(a)) has an average size of 18 nm and  $\sigma = 9$  nm (standard deviation) with predominant spherical form, the 25:75 system (figure 7(b)) has particles of average size of 64 nm and  $\sigma = 17$  nm, 50:50 (figure 7(c)) has two representative samples with an average particle size of 7.8 nm and  $\sigma = 7.8$  nm (less than 5 nm for 56%, 5–40 nm for 34% of total measured) and average particle size of 73 nm and  $\sigma = 10$  nm (50–90 nm for 10% of total measured), Ag NPs (figure 7(d)) are in the range of 24 nm with  $\sigma = 9$  nm, the 10:90 system presents particles with greater monodispersity, better control of size and morphology.

Figure 8 shows the selected area electron diffraction (SAED) pattern of the systems 10:90, 25:75 and Ag, the ring-like diffraction pattern indicates the crystallinity of the samples. The diffraction patterns can be indexed with diffraction cards 03-065-8428 of silver fcc structure and 01-070-3038 of copper fcc structure. The 10:90 system (figure 8(a)) shows the diffraction planes (220), (311) for the Cu fcc and (222), (400) (331), (311), (222) planes for silver fcc; in the 25:75 system (figure 8(b)) the crystalline planes (400) and (222)

**Table 2.** MIC and MLC for *R. communis*, Cu, Ag/Cu NPs systems 10:90, 25:75, 50:50.

	MIC $\mu\text{g}$	MIC Ag/Cu $\mu\text{g}/\mu\text{g}$	MLC $\mu\text{g}$	MLC Ag/Cu $\mu\text{g}/\mu\text{g}$
<i>S. aureus</i>				
<i>R. communis</i>	-	-	N	-
10:90	3.06	0.49 : 2.60	N	-
25:75	3.40	1.23 : 2.17	6.78	2.45 : 4.33
50:50	3.89	2.45 : 1.44	7.79	4.90 : 2.89
Ag	1.23	1.2258	9.81	9.81
<i>E. coli</i>				
<i>R. communis</i>	N		N	-
10:90	6.20	0.98 : 5.20	6.17	0.98 : 5.19
25:75	6.78	2.45 : 4.33	6.78	2.45 : 4.33
50:50	3.89	2.45 : 1.44	7.19	4.90 : 2.89
Ag	2.45	2.4516	2.45	2.45
<i>A. niger</i>				
<i>R. communis</i>	N		N	-
10:90	6.18	0.98 : 5.20	6.18	0.98 : 5.20
25:75	3.40	1.23 : 2.17	3.40	1.23 : 2.17
50:50	2.95	1.23 : 0.72	3.89	2.45 : 1.44
Ag	2.45	2.45	2.45	2.45

corresponding to the fcc silver and copper respectively are identified; figure 8(c) shows the (400) and (222) lattice planes for silver fcc.

### 3.5. Disk diffusion test

The *E. coli* strain was used to test the antibacterial action of the NPs before performing the MIC and MLC tests; figure 9 shows the inhibition halos with radius of 3.6, 3.1, 2.5 and 2.9 mm around the discs impregnated with Ag, 50:50, 25:75 and 10:90 NPs systems, respectively; the disc impregnated with *R. communis* extract (1/10) does not present an inhibitory halo.

### 3.6. MIC and MLC

The MIC tests were carried out in culture plates with 96 wells of 200  $\mu\text{l}$ , with 100  $\mu\text{l}$  of MH broth, the NPs and their successive dilutions at 50% were inoculated with the bacterial strains *S. aureus* (ATCC25293), *E. coli* (ATCC25922) and the fungus *A. niger*, incubated at 38 °C (bacteria) and 25 °C

(fungus) for a period of 48 h. The results were corroborated by looking to that of the negative control (broth only), which did not have turbidity and the positive control (broth with the microbiological strain) which showed turbidity that indicates the growth of microorganisms. The MLC test was inoculated on Petri culture dishes divided into six sections inoculated with the samples of the MIC test without turbidity. The lack of growth in the section of the blank confirms no contamination and the growth of the section of the well 12 (broth and microbiological culture) confirms the adequate conditions for growth.

Table 2 shows that *E. coli* and *A. niger* MLC is the same as MIC except for the 50:50 sample where concentration is high. In *S. aureus* 10:90 do not present MLC, 25:75 and 50:50 have MLC concentrations twice their MIC, in silver the MLC is eight times higher than the MIC. Ag/Cu systems have higher concentrations of MIC and MLC than silver, except for MLC for *S. aureus* if it presents them (10:90 not present MLC). 10:90 presents silver concentration notoriously lower than the rest of the systems to generate inhibition and eliminate microorganisms (except *S. aureus*). *R. communis*

extract (1/10) does not present antimicrobial activity. The results suggest that the antimicrobial sensitivity of the particles is a combination of the size, shape and composition of the particles.

#### 4. Conclusions

*R. communis* aqueous leaf extract was used to reduce Ag and Cu ions in a biological and environmentally friendly method to generate Ag/Cu bimetallic NPs in a rapid and simple one-step green synthesis. The results show that the Ag and Cu volume ratio is relevant to control the size, form and composition of the bimetallic NPs, which also promotes their antimicrobial properties. The SAED pattern confirms the face-centered cubic crystalline structure for Ag and Cu. UV-vis and FTIR results suggest interaction between the biomolecules of extract and the synthesised NPs. The microbial properties of the 10:90 system, with particle size around 18 nm ( $\sigma = 9$  nm) confirm that the synthetic method presents the advantages of a low-cost process that may have potential applications in medicine and technological applications.

#### Acknowledgments

F López-Ubaldo acknowledges CONACYT financial support to conduct postgraduate studies.

#### References

- [1] Klabunde K and Richards R 2001 *Materiales a nanoescala en química* ed J Kenneth (Hoboken, New Jersey: Biblioteca en línea de Wiley) p 1035
- [2] Liz-Marzán L M 2004 Nanometals: formation and color *Mater. Today* **7** 26–31
- [3] Ramsden J 2016 *Nanotecnología: una introducción* ed Sabrina Webber (El boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford, OX5 1GB, Reino Unido: William Andrew)
- [4] Ahmed S, Ahmad M, Swami B L and Ikram S 2016 *J. Adv. Res.* **7** 17–28
- [5] Mani U, Dhanasingh S, Arunachalam R, Pablo mi, Shanmugam PAGS, Rosa C and Mandal AB 2013 *Progreso en nanotecnología y nanomateriales* **2** 21–5
- [6] Singh UNA, Mittal S, Shrivastav R, Dass S and Srivastava J 2012 *Cavarr. J. Nanomater. Biostruct* **7** 1157–63 ([http://chalcogen.ro/1157\\_Singh.pdf](http://chalcogen.ro/1157_Singh.pdf))
- [7] Guzmán MG, Dille J and Godet S 2009 *En t. J. Chem. Biomol. Ing.* **2** 104–11 (<http://omnis-mg.hr/radovi/4bak-4siz-peru.pdf>)
- [8] Song K C, Lee S M, Park T S and Lee B S 2009 *Korean J. Chem. Eng.* **26** 153–5
- [9] Fulmer P, Manivel Raja M and Manthiram A 2001 *Chem. Mater.* **13** 2160–8
- [10] Brunel F, Véron L, David L, Domard A and Delair T 2008 *Langmuir* **24** 11370–7
- [11] Talawar M, Sivabalan R, Mukundan T, Muthurajan H, Sikder A, Gandhe B and Rao A S 2009 *J. Hazard. Mater.* **161** 589–607
- [12] Cabri W 2009 *Catal. Today* **140** 2–10
- [13] Rao P J and Khanum H 2016 *LWT-Food Science and Technology* **65** 695–702
- [14] Zain N M, Stapley A and Shama G 2014 *Carbohydrate Polym.* **112** 195–202
- [15] Ahmed S, Saifullah, Ahmad M, Swami B L and Ikram S 2016 *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* **9** 1–7
- [16] Thakore S I, Nagar P S, Jadeja R N, Thounaojam M, Devkar R V and Rathore P S 2019 *Arabian J. Chem.* **12** 694–700
- [17] Ruparelia J P, Chatterjee A K, Duttgupta S P and Mukherji S 2008 *Acta Biomater.* **4** 707–16
- [18] Valodkar M, Modi S, Pal A and Thakore S 2011 *Mater. Res. Bull.* **46** 384–9
- [19] Cinelli M, Coles S R, Nadagouda M N, Blaszczyński J, Słowiński R, Varma R S and Kirwan K 2017 *J. Clean. Prod.* **162** 938–48
- [20] Nakkala J R, Mata R, Gupta A K and Sadras S R 2014 *Eur. J. Med. Chem.* **85** 784–94
- [21] Sun Q, Cai X, Li J, Zheng M, Chen Z and Yu C-P 2014 *Colloids Surf. A* **444** 226–31
- [22] Mariselvam R, Ranjitsingh A, Nanthini A U R, Kalirajan K, Padmalatha C and Selvakumar P M 2014 *Spectrochim. Acta, Part A* **129** 537–41
- [23] Sadeghi B, Rostami A and Momeni S 2015 *Spectrochim. Acta, Part A* **134** 326–32
- [24] Santhoshkumar T, Rahuman A A, Rajakumar G, Marimuthu S, Bagavan A, Jayaseelan C, Zahir A A, Elango G and Kamaraj C 2011 *Parasitology Research* **108** 693–702
- [25] Dauthal P and Mukhopadhyay M 2016 *Ind. Eng. Chem. Res.* **55** 9557–77
- [26] Hoyos Dakota del Sur, Luisa mi, Sánchez-Mendieta V, Vilchis-Nestor Arkansas, Camacho-López MAMA, Trujillo-Reyes J and Avalos-Borja METRO 2019 *J. Nanomater.* **2019** 1–11
- [27] Morales-Luckie R A, Lopezfuentes-Ruiz A A, Olea-Mejía O F, Liliana A-F, Sanchez-Mendieta V, Brostow W and Hinestroza J P 2016 *Materials Science and Engineering: C* **69** 429–36
- [28] Bilal M, Zhao Y, Rasheed T, Ahmed I, Hassan S T, Nawaz M Z and Iqbal H 2019 *International Journal of Environmental Research and Public Health* **16** 598
- [29] Arévalo-Gallegos A, Garcia-Perez J S, Carrillo-Nieves D, Ramirez-Mendoza R, Iqbal H M and Parra-Saldívar R 2018 *Int. J. Nanomed.* **13** 5591
- [30] Brumbaugh A D, Cohen K A and St. Angelo S K 2014 *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **2** 1933–9
- [31] Vilas V, Philip D and Mathew J 2014 *Spectrochim. Acta, Part A* **132** 743–50
- [32] Khan M A, Khan T and Nadhman A 2016 *Adv. Colloid Interface Sci.* **234** 132–41
- [33] Kaweeteerawat C, Chang C H, Roy K R, Liu R, Li R, Toso D, Fischer H, Ivask A, Ji Z and Zink J I 2015 *ACS Nano* **9** 7215–25
- [34] Dorau B, Arango R and Green F 2004 An investigation into the potential of ionic silver as a wood preservative *Proc. from the Woodframe Housing Durability and Disaster Issues Conf. (October 4–6, 2004) (Las Vegas, Nevada, USA, Madison, WI (Forest Products Society) 2004*, pp 133–45
- [35] Maillard J Y 2002 *J. Appl. Microbiol.* **92** 16S–7S
- [36] Kumar P V, Pammi S, Kollu P, Satyanarayana K and Shameem U 2014 *Ind. Crops Prod.* **52** 562–6
- [37] Zhang Y, Yang re, Kong Y, Wang X, Pandoli O and Gao sol 2010 *Nano Biomed. Ing.* **2** 252–7
- [38] Yoon K-Y, Byeon J H, Park J-H and Hwang J 2007 *Sci. Total Environ.* **373** 572–5
- [39] Prado V, Vidal R and Durán C 2012 Aplicación de la capacidad bactericida del cobre en la práctica médica *Revista Médica de Chile* **140** 1325–32

- [40] Nazeruddin sol, Prasad R, Shaikh Y and Shaikh UNA 2014 *Der Pharmacia Lettre* **3** 129–36 (<http://scholarsresearchlibrary.com/archive.html>)
- [41] Rana METRO, Dhamija H, Prashar si and Sharma S 2012 *Revista Internacional de Investigación PharmTech* **4** 1706–11 ([https://doc-developpement-durable.org/file/Plantes-Medicinales-Aromatiques/FICHES\\_PLANTES/ricin/RICINUS%20COMMUNIS\\_Research%20Journal%20Chemistry.pdf](https://doc-developpement-durable.org/file/Plantes-Medicinales-Aromatiques/FICHES_PLANTES/ricin/RICINUS%20COMMUNIS_Research%20Journal%20Chemistry.pdf))
- [42] Rampadarath S, Puchooa D and Ranghoo-Sanmukhiya V M 2014 *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* **7** S384–90
- [43] Jena J and Gupta Alaska 2012 *Revista Internacional de Farmacia y Ciencias Farmacéuticas* **4** 25 ([https://researchgate.net/profile/Jitendra\\_Jena/publication/235417877\\_Ricinus\\_communis\\_linn\\_A\\_phytopharmacological\\_review/links/02e7e51a4eb786c21c000000/Ricinus-communis-linn-A-phytopharmacological-review.pdf](https://researchgate.net/profile/Jitendra_Jena/publication/235417877_Ricinus_communis_linn_A_phytopharmacological_review/links/02e7e51a4eb786c21c000000/Ricinus-communis-linn-A-phytopharmacological-review.pdf))
- [44] Mancier V, Rousse-Bertrand C, Dille J, Michel J and Fricoteaux P 2010 *Ultrason. Sonochem.* **17** 690–6
- [45] Zhao J, Zhang D and Zhao J 2011 *J. Solid State Chem.* **184** 2339–44
- [46] Tsuji M, Hikino S, Tanabe R, Matsunaga M and Sano Y 2010 *CrystEngComm* **12** 3900–8

## BIBLIOGRAFÍA

1. Kaweeteerawat, C., et al., *Cu Nanoparticles Have Different Impacts in Escherichia coli and Lactobacillus brevis than Their Microsized and Ionic Analogues*. ACS Nano, 2015. **9**(7): p. 7215-7225.
2. Ahmed, S., et al., *A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise*. Journal of Advanced Research, 2016. **7**(1): p. 17-28.
3. Singh, A., et al., *Biosynthesis of Silver Nanoparticles using Ricinus communis L. leaf extract and its antibacterial activity*. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, 2012. **7**(3): p. 1157-1163.
4. Mani, U., et al., *A Simple and Green Method for the Synthesis of Silver Nanoparticles Using Ricinus Communis Leaf Extract*. Progress in Nanotechnology and Nanomaterials, 2013. **2**(1): p. 21-25.
5. Yoon, K.-Y., et al., *Susceptibility constants of Escherichia coli and Bacillus subtilis to silver and copper nanoparticles*. Science of The Total Environment, 2007. **373**(2): p. 572-575.
6. Poole, C.P. and J.F.J. Owens, *Introduction to nanotechnology*. 2003, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. 388.
7. Jhonson, R.L. and W. J.P., *Metal Nanoparticles and Nanoalloys*. 1 ed. 2008: Elsevier.
8. Wilson, M., et al., *Nanotechnology: basic science and emerging technologies*. 2002: CRC Press.
9. Abou El-Nour, K.M.M., et al., *Synthesis and applications of silver nanoparticles*. Arabian Journal of Chemistry, 2010. **3**(3): p. 135-140.
10. Klabunde, K.J. and R. Richards, *Nanoscale materials in chemistry*. Vol. 1035. 2001: Wiley Online Library.
11. Ramsden, J., *Nanotechnology: an introduction*. 2016: William Andrew.
12. Liz-Marzán, L., *Nanometals*. Vol. 7. 2004. 26-31.
13. López, G., Morales, R., Olea, Mejía, O., Sánchez, V., Trujillo, J., Varela, V., Vilchis, A., *NANOESTRUCTURAS METÁLICAS: SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y APLICACIONES*. 2013, Estado de México. México.: Ed. REVERTÉ. pp. 4,5.
14. <https://www.lifeder.com/ejemplos-enlaces-metalicos/>.
15. <https://quimicaenlace.wordpress.com/enlace-metalico/>.
16. Nalwa, H.S., *Encyclopedia of nanoscience and nanotechnology*. 2004, California. U.S.A.: American Scientific Publishers.
17. Askeland, D.R. and P.P. Phulé, *Ciencia e ingeniería de los materiales*. 2004: Thomson.
18. Klabunde, K.J., *Introduction to Nanotechnology, in Nanoscale Materials in Chemistry*. 2001, New York, USA.: John Wiley & Sons, Inc.
19. G Guzmán, M., J. Dille, and S. Godet, *Synthesis of Silver Nanoparticles by Chemical Reduction Method and Their Antibacterial Activity*. Vol. 33. 2009.
20. Song, K.C., et al., *Preparation of colloidal silver nanoparticles by chemical reduction method*. Korean Journal of Chemical Engineering, 2009. **26**(1): p. 153-155.
21. Fulmer, P., M. Manivel Raja, and A. Manthiram, *Chemical Synthesis, Processing, and Characterization of Nanostructured Fe-B for the Magnetically Assisted Chemical Separation of Hazardous Waste*. Chemistry of Materials, 2001. **13**(6): p. 2160-2168.

22. Chen, D.-H. and S.-H. Wu, *Synthesis of Nickel Nanoparticles in Water-in-Oil Microemulsions*. Chemistry of Materials, 2000. **12**(5): p. 1354-1360.
23. Brunel, F., et al., *A Novel Synthesis of Chitosan Nanoparticles in Reverse Emulsion*. Langmuir, 2008. **24**(20): p. 11370-11377.
24. Centi, G. and S. Perathoner, *Catalysis and sustainable (green) chemistry*. Catalysis Today, 2003. **77**(4): p. 287-297.
25. Anastas, P.T. and M.M. Kirchhoff, *Origins, Current Status, and Future Challenges of Green Chemistry*. Accounts of Chemical Research, 2002. **35**(9): p. 686-694.
26. Anastas, P.T. and J.C. Warner, *Green chemistry: theory and practice*. 2000, New York: Oxford University Press.
27. Manley, J.B., P.T. Anastas, and B.W. Cue, *Frontiers in Green Chemistry: meeting the grand challenges for sustainability in R&D and manufacturing*. Journal of Cleaner Production, 2008. **16**(6): p. 743-750.
28. García-Serna, J., L. Pérez-Barrigón, and M.J. Cocero, *New trends for design towards sustainability in chemical engineering: Green engineering*. Chemical Engineering Journal, 2007. **133**(1): p. 7-30.
29. Anastas, P.T., M.M. Kirchhoff, and T.C. Williamson, *Catalysis as a foundational pillar of green chemistry*. Applied Catalysis A: General, 2001. **221**(1): p. 3-13.
30. Warner, J.C., A.S. Cannon, and K.M. Dye, *Green chemistry*. Environmental Impact Assessment Review, 2004. **24**(7): p. 775-799.
31. Poliakov, M. and P. Licence, *Sustainable technology: Green chemistry*. Nature, 2007. **450**(7171): p. 810-812.
32. Cabri, W., *Catalysis: The pharmaceutical perspective*. Catalysis Today, 2009. **140**(1): p. 2-10.
33. Hutchings, G.J., *A golden future for green chemistry*. Catalysis Today, 2007. **122**(3): p. 196-200.
34. Heine, L. *Sustainable materials and green chemistry*. 2003 2017/9/26/; Available from: <http://accessscience.com/content/sustainable-materials-and-green-chemistry/YB030505>.
35. Talawar, M.B., et al., *Environmentally compatible next generation green energetic materials (GEMs)*. Journal of Hazardous Materials, 2009. **161**(2): p. 589-607.
36. Anastas, P.T., et al., *The role of catalysis in the design, development, and implementation of green chemistry*. Catalysis Today, 2000. **55**(1): p. 11-22.
37. Centi, G., et al., *Environmental catalysis: trends and outlook*. Catalysis Today, 2002. **75**(1): p. 3-15.
38. Folić, M., et al., *Systematic Selection of Green Solvents for Organic Reacting Systems\** \*Supported by PRISM FP6 Marie Curie Research Training Network (MRTN-CT-2004-512233). Chinese Journal of Chemical Engineering, 2008. **16**(3): p. 376-383.
39. Rao, P.J. and H. Khanum, *A green chemistry approach for nanoencapsulation of bioactive compound – Curcumin*. LWT - Food Science and Technology, 2016. **65**: p. 695-702.
40. Zain, N.M., A.G.F. Stapley, and G. Shama, *Green synthesis of silver and copper nanoparticles using ascorbic acid and chitosan for antimicrobial applications*. Carbohydrate Polymers, 2014. **112**: p. 195-202.
41. Ahmed, S., et al., *Green synthesis of silver nanoparticles using Azadirachta indica aqueous leaf extract*. Journal of Radiation Research and Applied Sciences, 2016. **9**(1): p. 1-7.

42. Thakore, S.I., et al., *Sapota fruit latex mediated synthesis of Ag, Cu mono and bimetallic nanoparticles and their in vitro toxicity studies*. Arabian Journal of Chemistry, 2015.
43. Ruparelia, J.P., et al., *Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles*. Acta Biomaterialia, 2008. **4**(3): p. 707-716.
44. Valodkar, M., et al., *Synthesis and anti-bacterial activity of Cu, Ag and Cu-Ag alloy nanoparticles: A green approach*. Materials Research Bulletin, 2011. **46**(3): p. 384-389.
45. Cinelli, M., et al., *Robustness analysis of a green chemistry-based model for the classification of silver nanoparticles synthesis processes*. Journal of Cleaner Production, 2017. **162**: p. 938-948.
46. Nakkala, J.R., et al., *Biological activities of green silver nanoparticles synthesized with Acorous calamus rhizome extract*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2014. **85**(Supplement C): p. 784-794.
47. Sun, Q., et al., *Green synthesis of silver nanoparticles using tea leaf extract and evaluation of their stability and antibacterial activity*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2014. **444**(Supplement C): p. 226-231.
48. Nabikhan, A., et al., *Synthesis of antimicrobial silver nanoparticles by callus and leaf extracts from saltmarsh plant, Sesuvium portulacastrum L*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2010. **79**(2): p. 488-493.
49. Mariselvam, R., et al., *Green synthesis of silver nanoparticles from the extract of the inflorescence of Cocos nucifera (Family: Areaceae) for enhanced antibacterial activity*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2014. **129**(Supplement C): p. 537-541.
50. Sadeghi, B., A. Rostami, and S.S. Momeni, *Facile green synthesis of silver nanoparticles using seed aqueous extract of Pistacia atlantica and its antibacterial activity*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2015. **134**(Supplement C): p. 326-332.
51. Santosh, K., et al., *Biosynthesis of silver nanoparticles using premna herbacea leaf extract and evaluation of its antimicrobial activity against bacteria causing dysentery*. Int. J. Pharm. Bio. Sc., 2013 Oct. **4**: p. 378-384.
52. Manjul, G. and J.N.P. Geeta, *Biological evaluation and green synthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of calotropis procera*. Int. J. Pharm. Bio. Sci., 2013 Oct. **4**: p. 635-643.
53. Anandini, R., et al., *Green synthesis of silver nanoparticles using leaves extract of centella asiatica l. for studies against human pathogens*. Int. J. Pharm. Bio. Sci., 2013. **4**: p. 661-674.
54. Rajakumar, G. and A. Abdul Rahuman, *Larvicidal activity of synthesized silver nanoparticles using Eclipta prostrata leaf extract against filariasis and malaria vectors*. Acta Tropica, 2011. **118**(3): p. 196-203.
55. Santhoshkumar, T., et al., *Synthesis of silver nanoparticles using Nelumbo nucifera leaf extract and its larvicidal activity against malaria and filariasis vectors*. Parasitology Research, 2011. **108**(3): p. 693-702.
56. Chandran, S.P., et al., *Synthesis of Gold Nanotriangles and Silver Nanoparticles Using Aloe vera Plant Extract*. Biotechnology Progress, 2006. **22**(2): p. 577-583.
57. Elavazhagan, T. and K.D. Arunachalam, *Memecylon edule leaf extract mediated green synthesis of silver and gold nanoparticles*. International Journal of Nanomedicine, 2011. **6**: p. 1265-1278.

58. Kesharwani, J., et al., *Phytofabrication of Silver Nanoparticles by Leaf Extract of Datura metel: Hypothetical Mechanism Involved in Synthesis*. Journal of Bionanoscience, 2009. **3**(1): p. 39-44.
59. Rana, M., et al., *Ricinus communis L. - A. Review*. International Journal of PharmTech Research, 2012. **4**(4): p. 1706-1711.
60. Rampadarath, S., D. Puchooa, and V.M. Ranghoo-Sanmukhiya, *A comparison of polyphenolic content, antioxidant activity and insecticidal properties of Jatropha species and wild Ricinus communis L. found in Mauritius*. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 2014. **7**: p. S384-S390.
61. Jena, J. and A. Gupta, *Ricinus communis linn: A phytopharmacological review*. 2012. **4**(4): p. 25-29.
62. B., D., A. R., and G. F., *Investigation into the potential of ionic silver as a wood preservative*. Proceedings from the Woodframe housing durability and disaster issues., 2004: p. 133-145.
63. J.Y., M., *Bacterial target sites for biocide action*. Journal of applied Microbiology Symposium Supplement, 2002. **92**: p. 16-27.
64. Tavaf, Z., et al., *Green synthesis of silver nanoparticles by reduced glycated casein adducts: Assessment of their antibacterial and antioxidant activity against Streptococcus mutans*. European Journal of Integrative Medicine, 2015. **7**(3): p. 294-302.
65. Velayutham, K., et al., *Larvicidal activity of green synthesized silver nanoparticles using bark aqueous extract of Ficus racemosa against Culex quinquefasciatus and Culex gelidus*. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 2013. **6**(2): p. 95-101.
66. Vijay Kumar, P.P.N., et al., *Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using Boerhaavia diffusa plant extract and their anti bacterial activity*. Industrial Crops and Products, 2014. **52**(Supplement C): p. 562-566.
67. Yixia, Z., et al., *Synergetic Antibacterial Effects of Silver Nanoparticles@Aloe Vera Prepared via a Green Method*. Nano Biomed. Eng., 2010. **2**: p. 252-257.
68. Prado J, V., R. Vidal A, and C. Durán T, *Aplicación de la capacidad bactericida del cobre en la práctica médica*. Revista médica de Chile, 2012. **140**: p. 1325-1332.
69. Magdassi, S., M. Grouchko, and A. Kamyshny, *Copper Nanoparticles for Printed Electronics: Routes Towards Achieving Oxidation Stability*. Materials, 2010. **3**(9): p. 4626.
70. Brumbaugh, A.D., K.A. Cohen, and S.K. St. Angelo, *Ultrasmall Copper Nanoparticles Synthesized with a Plant Tea Reducing Agent*. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2014. **2**(8): p. 1933-1939.
71. Zhao, J., D. Zhang, and J. Zhao, *Fabrication of Cu-Ag core-shell bimetallic superfine powders by eco-friendly reagents and structures characterization*. Journal of Solid State Chemistry, 2011. **184**(9): p. 2339-2344.
72. Tsuji, M., et al., *Syntheses of Ag/Cu alloy and Ag/Cu alloy core Cu shell nanoparticles using a polyol method*. CrystEngComm, 2010. **12**(11): p. 3900-3908.
73. Nazeruddin, G., et al., *Synergetic effect of Ag-Cu bimetallic nanoparticles on antimicrobial activity*. Der Pharmacia Lettre, 2014. **3**: p. 129-136.
74. Betancur Henao, C.P., V. Hernández Montes, and R. Buitrago Sierra, *Nanopartículas para materiales antibacterianos y aplicaciones del dióxido de titanio*. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas, 2016. **35**: p. 387-402.

75. Cruz D., R.M., López J., Herrera V., Orive A., Creus A., *Nanopartículas metálicas y plasmones de superficie: una relación profunda* Avances en Ciencias e Ingeniería, 2012. **3(2)**: p. 67-78.
76. Brooks, G.F., et al., *Jawetz, Melnick y Adelberg. Microbiología médica*, ed. J.d.L. Fraga. 2001, México: Mc. Graw Hill. 815.
77. Montaña Arias, N.M., et al., *Los microorganismos: pequeños gigantes. Elementos: ciencia y cultura*, 2010. **17(77)**: p. 15-23.
78. Murray, R.P., s.K. Rosenthal, and A.M. Pfäuer, *Microbiología médica*. 5 ed. 2007, España.: ELSEVIER. 963.
79. Pérez, M., Mota, M, *Temas de Bacteriología y Virología Médica: morfología y Estructura Bacteriana*. 2ª ed. 2006, Montevideo (Uruguay): Universidad de la República, Departamento de Bacteriología, Oficina del Libro FEFMUR.
80. Cervantes, G.E., G.R. Garcia, and S.P.M. Salazar, *Características generales del Staphylococcus aureus*. Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio., 2014. **61(1)**: p. 28-40.
81. Rodríguez, A.G., *Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli*. Salud Pública de México, 2002. **44**: p. 464-475.
82. Nataro, J.P. and J.B. Kaper, *Diarrheagenic Escherichia coli*. Clinical microbiology reviews, 1998. **11(1)**: p. 142-201.
83. Fratamico, P.M., et al., *Advances in Molecular Serotyping and Subtyping of Escherichia coli*. Frontiers in microbiology, 2016. **7**: p. 644-644.
84. <https://www.lifeder.com/aspergillus-niger/>.
85. <http://fundacionio.org/gefor/micologia/Aspergillus%20niger.html>.
86. <https://www.pinterest.com.mx/pin/434386326541173205/>.
87. Estrada, C.A., *La radiación electromagnética*.
88. <http://astronomiaan0900.blogspot.com/2015/10/luz-radiacion-y-materia.html>.
89. Silverstein, R.M., G.C. Bassler, and T.C. Morrill, *Identificación espectrométrica de compuestos orgánicos*. 1980: Diana.
90. Field, I.D., S. Sternhell, and J.R. Kalman, *Organic Structures from Spectra* 4ed. 2008, England: JOHN WILEY AND SONS, LTD
91. Willard, H.H., A.R. Hernández, and F.P. Bocanegra, *Métodos instrumentales de análisis*. 1991, México: Grupo Editorial Iberoamérica. 879.
92. Skoog, D.A., F.J. Holler, and S.R. Crouch, *Principios de análisis instrumental*. 6 ed. 2008, México: Cengage Learning.
93. Skoog, D.A., et al., *Fundamentos de química analítica*. 8 ed. 2005, México: THOMSON.
94. Galen, W.E., *Métodos Instrumentales de análisis químicos*. 1979, México, DF.: Mc. Graw Hill.
95. <https://es.wikipedia.org/wiki/Nanotecnolog%C3%ADa>.
96. Williams, B. and D.B. Carter, *Transmission Electron Microscopy A Textbook for Material Science*. 1996, New York: Plenum Press.
97. Ltd., J., *Scanning Electron Microscope A to Z (Basic Knowledge for Using the SEM)*. Japan.
98. <https://www.nanoimages.com/sem-technology-overview/>.
99. <http://quimica.unab.cl/laboratorio-de-analisis-de-solidos-las/informacion/fundamentos-teoricos/microscopia-electronica-de-barrido-con-detector-eds-sem-eds/>.

100. Chamont, M., E.W. Mason, and Clyde, *Handbook of Chemical Microscopy*. 1958, U.S.A. : Johon Wiley and Sons, Inc.
101. <http://la-mecanica-cuantica.blogspot.com/2009/08/la-espectroscopia-de-rayos-x.html>.
102. Kay, D., *Techniques for electron microscopy*. 2 ed. 1967, Philadelphia: F.A. DAVIS COMPANY.
103. Geoffrey, A.M., *Practical Electron Microscopy for Biologists*. 2 ed. 1977, Gran Bretaña: Johon Wiley & Sons.
104. Lalitha, M.K., *Msnual on antimicrobial Suceptibility Testing*. 2004, India: Indian Association of Medical Microbiologists.
105. Garcia, J., et al., *Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos*. 2000: Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
106. Cavalieri, S.J. and A.S.f. Microbiology, *Manual of antimicrobial susceptibility testing*. . 2005, United States: Washington, DC : American Society for Microbiology.
107. Malbrán", S.A.-I.A.D.C.G., *Método de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución MIC testing, M07-A9*. Vol. 32. 2012: Clinical and labtory standars institute.
108. Taroco, R., V. seija, and R. Vignoli, in *Temas de bacteriloga y virología médica. Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica*. p. 663-671.
109. [http://introduccionmicrobiologia.blogspot.com/2016/05/laboratorio-no2\\_4.html](http://introduccionmicrobiologia.blogspot.com/2016/05/laboratorio-no2_4.html).
110. <https://www.monografias.com/docs113/tinciones-microbiologia/tinciones-microbiologia.shtml>.
111. <https://app.emaze.com/@AWIFIWRQ#9>.
112. Vilas, V., D. Philip, and J. Mathew, *Catalytically and biologically active silver nanoparticles synthesized using essential oil*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2014. **132**: p. 743-750.
113. Mashwani, Z.-u.-R., et al., *Applications of plant terpenoids in the synthesis of colloidal silver nanoparticles*. Advances in Colloid and Interface Science, 2016. **234**: p. 132-141.
114. Mancier, V., et al., *Sono and electrochemical synthesis and characterization of copper core-silver shell nanoparticles*. Ultrasonics Sonochemistry, 2010. **17**(4): p. 690-696.
115. Garza-Cervantes, J.A., et al., *Synergistic Antimicrobial Effects of Silver/Transition-metal Combinatorial Treatments*. Scientific reports, 2017. **7**(1): p. 903-903.
116. Chan, Y.S. and M. Mat Don, *Biosynthesis and structural characterization of Ag nanoparticles from white rot fungi*. Materials Science and Engineering: C, 2013. **33**(1): p. 282-288.
117. Manivasagan, P., et al., *Biosynthesis, Antimicrobial and Cytotoxic Effect of Silver Nanoparticles Using a Novel Nocardiosis sp. MBRC-1*. BioMed Research International, 2013. **2013**: p. 9.
118. Mohan, S., et al., *Completely green synthesis of dextrose reduced silver nanoparticles, its antimicrobial and sensing properties*. Carbohydrate Polymers, 2014. **106**: p. 469-474.
119. Suresh, G., et al., *Green synthesis of silver nanoparticles using Delphinium denudatum root extract exhibits antibacterial and mosquito larvicidal activities*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2014. **127**: p. 61-66.
120. YAO, L.H., et al., *Flavonoids in Food and Their Health Benefits*. Plant Foods for Human Nutrition, 2004. **59**(3): p. 113-122.