



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE CuBi_2O_4 Y
ESTUDIO DE SU POTENCIAL ACTIVIDAD BACTERICIDA.**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

I.Q.M. ALEJANDRO RUBIALES MARTÍNEZ

TUTOR

DRA. AMÉRICA ROSALBA VÁZQUEZ OLMOS
INSTITUTO DE CIENCIAS APLICADAS Y TECNOLOGÍA, ICAT

CIUDAD DE MÉXICO, ABRIL 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

TEMA DE TESIS

**OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE CuBi_2O_4 Y
ESTUDIO DE SU POTENCIAL ACTIVIDAD BACTERICIDA.**

**TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

I.Q.M. ALEJANDRO RUBIALES MARTÍNEZ



Ciudad de México, 2019

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca que me otorgo durante el desarrollo de mis estudios de maestría (CVU 848667).

Al proyecto PAPIIT IN108696, por el financiamiento que aportó para la realización de esta tesis.

A la Dra. América Vázquez Olmos, por el tiempo que invirtió en la realización de esta tesis y su disposición para transmitirme el conocimiento contribuyó a mi crecimiento académico y personal.

A la Dra. Argelia Almaguer Flores quien me apoyó facilitándome el laboratorio a su cargo, el uso de reactivos químicos y biológicos necesarios para mi trabajo, lo cual me permitió concluir con resultados satisfactorios para esta tesis.

A los integrantes de mi jurado, Dr. J. Manuel Saniger Blesa, a la Dra. María del Pilar Carreón Castro, Dra. Ana Leticia Fernández Osorio, Dra. Argelia Almaguer Flores y Dr. Jesús A. Arenas Alatorre quienes dedicaron su tiempo para leer esta tesis y realizaron comentarios para mejorar el resultado final.

A la Dra. Ana Leticia Fernández Osorio, por facilitar el uso del difractómetro y por sus consejos para manejar este equipo.

Al Laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscópica, LUCE ICAT UNAM y a los investigadores Dr. José Ocotlán Flores Flores y Dr. Roberto Sato Berrú, por la caracterización de las muestras mediante las Técnicas, Espectroscopia IR y RAMAN respectivamente.

Asimismo, a mis tíos María y Erasto, por brindarme un gran apoyo y tratarme como a un hijo más; a mis hermanas Patricia y Norma, cuyas muestras de dedicación y

esfuerzo me han enseñado a cumplir mis metas; y a mis amigos Víctor, Alberto y Osiel, quienes me brindaron consejos y compañía durante estos años de estudio.

Finalmente, agradezco a mis padres Antonia y Francisco, porque siempre cuento con su apoyo y cariño, representan un motivo para superarme cada día más.

Contenido

	Pág.
Introducción	1
Objetivos	2
Hipótesis	3
1. Generalidades	4
1.1. Óxido de cobre y bismuto CuBi₂O₄	4
1.2. Nanopartículas de CuBi₂O₄	7
1.2.1. Método Solvotermal	8
1.2.2. Método sol-gel	9
1.2.3. Mecanosíntesis	10
1.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	13
1.4. Mecanismos propuestos del efecto de las NPs sobre las bacterias	15
2. Desarrollo experimental	19
2.1. Obtención de las de CuBi₂O₄	20
2.1.1. Reacciones sin llevar a cabo un tratamiento térmico (mecanosíntesis)	21
2.1.2. Reacciones tratadas térmicamente (activación mecánica)	21
2.1.3. Equipos empleados en la caracterización de las NPs de CuBi₂O₄	22
2.1.4. Ensayos de actividad antibacteriana	23
2.1.4.1. Equipo usado para los ensayos de la actividad antibacteriana	23
2.1.4.2. Nanopartículas en el medio de cultivo (Agar soya tripticasa)	24
2.1.4.3. Ensayo de actividad metabólica bacteriana por sales de tetrazolio (XTT)	25

3. Resultados y discusión.....	27
3.1. Caracterización por difracción de Rayos X en polvos.....	27
3.2. Caracterización de las NPs de CuBi ₂ O ₄ por microscopia electrónica de transmisión de alta resolución HR-TEM (<i>High-resolution transmission electron microscopy</i>).....	31
3.3. Caracterización de las NPs de CuBi ₂ O ₄ por espectroscopías de absorción y emisión electrónica en la región UV-Visible.....	34
3.4. Caracterización por espectroscopia Infrarroja y Raman.....	36
3.5. Caracterización por Resonancia Paramagnética Electrónica (RPE).....	39
3.6. Resultados de las pruebas para la evaluación de la actividad antibacteriana.....	40
3.7. Ensayo de actividad metabólica bacteriana por sales tetrazolio (XTT).....	44
4. Conclusiones.....	48
5. Bibliografía.....	50
Apéndice A	53
Apéndice B	55
Apéndice C	56

Índice de figuras y tablas.

En este trabajo, la convención para ubicar y ordenar las figuras y tablas es la siguiente:

1. El primer número hace referencia a la sección a la cual pertenece.
2. El segundo número hace referencia al orden cronológico en que aparece.

Ejemplo:

Figura 1. 2. Se encuentra en la sección 1 y es la segunda imagen que se muestra en la tesis.

A. Índice de figuras

	Página
Figura 1. 1. Representación de la estructura cristalina del CuBi_2O_4 . (a) Vista desde el eje C, (b) vista desde un ángulo arbitrario. Los átomos se representan por esferas; azules = Bi, naranjas = Cu y rojas = O.....	5
Figura 1. 2. Comparación de tamaños.....	8
Figura 1. 3. Esquema simplificado del método sol-gel.....	10
Figura 1. 4. Diagrama de las etapas involucradas en la mecosíntesis..	11
Figura 1. 5. <i>P. aeruginosa</i>	14
Figura 1. 6. <i>S. aureus</i>	15
Figura 1. 7. Posibles mecanismos del efecto antibacteriano de los óxidos metálicos nanoestructurados.....	19
Figura 2. 8. Evolución de la reacción para obtener NPs de CuBi_2O_4	21
Figura 2. 9. Esquema general del procedimiento experimental.....	22
Figura 2. 10. (10.A) Cajas Petri con medio de cultivo agar y (10.B) medio de cultivo agar y NPs de CuBi_2O_4	25
Figura 2. 11. Esquema de las placas y concentración de las NPs en los pozos.....	26

Figura 3. 12. Difractogramas de las NPs de CuBi_2O_4 , obtenidas a partir de las sales metálicas de acetato.....	28
Figura 3. 13. Difractogramas de las NPs de CuBi_2O_4 , obtenidas a partir de las sales metálicas de cloruros.....	28
Figura 3. 14. Difractograma de la mezcla de NPs de CuBi_2O_4 , CuO y Bi_2O_3	31
Figura 3. 15. Micrografías de HRTEM y patrones de difracción de electrones, representativos de las NPs de CuBi_2O_4 obtenidas sin llevar a cabo un tratamiento térmico posterior a la molienda.....	32
Figura 3. 16. Micrografías de HRTEM representativas de las NPs de CuBi_2O_4 obtenidas después de calentar a 600°C por 2 h.....	33
Figura 3. 17. Espectros de absorción electrónica en la región UV-Visible de las NPs de CuBi_2O_4 de 20 y 50 nm.....	35
Figura 3. 18. Espectros de fluorescencia de las NPs de CuBi_2O_4 de 20 y 50 nm, obtenidos en polvo empleando una λ_{exc} de 270 nm.....	36
Figura 3. 19. Espectros Raman de las NPs de CuBi_2O_4	38
Figura 3. 20. Espectro FTIR de las NPs de CuBi_2O_4 obtenidas en esta tesis.....	39
Figura 3. 21. Espectros de RPE de las NPs de CuBi_2O_4 obtenidas en este trabajo.....	40
Figura 3. 22. Gráfica del conteo de las UFC's de acuerdo a la concentración de las NPs de CuBi_2O_4 (25 y 50 mg).....	41
Figura 3. 23. Fotografías de las cajas Petri con la bacteria <i>P. aeruginosa</i> y las diferentes concentraciones de NPs. (23.A) 50 mg de NPs /mL (89% de reducción de crecimiento bacteriano), (23.B) 25 mg de NPs/mL (57% de reducción de crecimiento bacteriano) y (23.C) Medio de cultivo sin NPs.....	42

Figura 3. 24. Fotografías de las cajas Petri con la bacteria <i>S. aureus</i> y las diferentes concentraciones de NPs. (24.A) 50 mg de NPs /mL (100% de inhibición de crecimiento bacteriano). (24.B) 25 mg de NPs /mL (100% de inhibición de crecimiento bacteriano) y (24.C) medio de cultivo sin NPs	43
Figura 3. 25. Gráfica del porcentaje de efectividad antibacteriana de las NPs de CuBi_2O_4 para <i>P. aeruginosa</i>	45
Figura 3. 26. Gráfica del porcentaje de efectividad bacteriana de las NPs de CuBi_2O_4 para <i>S. aureus</i>	46
Figura A. 27. Tarjeta cristalográfica del óxido de cobre bismuto CuBi_2O_4	54
Figura B. 28. Intervalos de energía en donde absorben los compuestos moleculares de Cu (II), con diferentes geometrías.....	55
Figura C. 29. Formas celulares entre las bacterias verdaderas unicelulares. (A) Cocos. (B) Bastones (bacilos). (C) Espirales. (Contraste de fase, 1500×).....	56
Figura C. 30. Categorías principales y grupos de bacterias patógenas en seres humanos como parte de un esquema de identificación descrito en el <i>Bergey's Manual of Determinative Bacteriology</i> , 9th ed.....	58
Figura C. 31. Esquema comparativo de las paredes celulares de bacterias Gram positivas y Gram negativas.....	59
Figura C. 32. Modelo tridimensional de la “envoltura o cubierta” de una bacteria a) Gram negativa y una b) Gram positiva.....	61

A. Índice de tablas

Tabla 1. 1. Bacterias Gram positivas y Gram negativas para las que se ha probado la actividad antibacteriana de NPs de CuO , Bi_2O_3 y CuBi_2O_4 ..	6
Tabla 1. 2. Métodos de síntesis y tipos de NPs de CuBi_2O_4	12
Tabla 2. 3. Pesos y concentración de los reactivos químicos empleados..	20

Tabla 3. 4. Colores para identificar las condiciones en que se obtuvieron las NPs de CuBi_2O_4 , cuando se partió de 5×10^{-4} moles de la sal de Cu(II)	27
Tabla 3. 5. Posición de los picos de difracción de las NPs de CuBi_2O_4	29
Tabla 3. 6. Tamaños promedio de las NPs de CuBi_2O_4	30
Tabla 3. 7. Distancias interplanares observadas en las micrografías de las NPs de CuBi_2O_4 , así como en sus correspondientes patrones de difracción de electrones.....	34
Tabla 3. 8. Resultados del conteo de las unidades formadoras de colonias.....	43
Tabla 3. 9. Comparación de actividad antibacteriana de NPs de CuO , Bi_2O_3 y CuBi_2O_4 frente a cepas de <i>P. aeruginosa</i> y <i>S. aureus</i>	47

Abreviaturas y anglicismo

NPs	Nanopartículas
CuBi ₂ O ₄	Óxido de cobre bismuto
nm	Nanómetros
FTIR	Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier
TiO ₂	Óxido de titanio
ZnO	Óxido de zinc
CuO	Óxido de cobre (II)
Fe ₃ O ₄	Magnetita
MgO	Óxido magnesio
Fe ₂ O ₃	Hematita
UV	Ultravioleta
Bi ₂ O ₃	Óxido de bismuto (III)
<i>Band gap</i>	Energía entre bandas o brecha
<i>Bulk materials</i>	Materiales masivos
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (del inglés)
OMS	Organización Mundial de la Salud
µm	Micrómetros
NaCl	Cloruros de sodio
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina (del inglés)
ICDD	Centro Internacional de datos para difracción (del inglés)
DRX	Difracción de rayos X
FWHM	Anchura a media altura (del inglés)
HR-TEM	Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (del inglés)
RPE	Resonancia Paramagnética electrónica
UFC	Unidades formadoras de colonia
DNA	ácido desoxirribonucleico (del inglés)

Introducción

En este trabajo se presenta la obtención, caracterización y evaluación de las propiedades antibacterianas de nanopartículas (NPs) de óxido de cobre y bismuto (CuBi_2O_4) con diámetro promedio de cristalito de 50 y 20 nm, obtenidas por mecano-síntesis.

La mecano-síntesis es una técnica basada generalmente en reacciones en estado sólido, lo que significa que los procesos involucrados en la evolución de la microestructura ocurren sin salir de la fase sólida. Por lo tanto, no requieren pasar por los puntos de fusión de los elementos participantes en la reacción. En términos prácticos, esto puede significar una reducción de costos frente a otros procedimientos comúnmente empleados en la obtención de nanoestructuras.

Las NPs de CuBi_2O_4 fueron caracterizadas por difracción de rayos-X en polvo, microscopía electrónica de transmisión de alta resolución, espectroscopías de absorción y emisión electrónica en la región del UV-Visible, FTIR, espectroscopia Raman, y Resonancia Paramagnética Electrónica.

Finalmente, se llevó a cabo un estudio preliminar de la actividad antimicrobiana de las NPs de CuBi_2O_4 obtenidas, utilizando las cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Esta tesis consta de 5 secciones. La 1° sección se refiere de manera general, las propiedades químicas y físicas, del CuBi_2O_4 y a los precedentes bibliográficos relacionados con este trabajo. En la 2° sección se aborda el método de síntesis de las NPs de CuBi_2O_4 , la descripción del equipo utilizado para la caracterización de dichas NPs y se describe la metodología empleada para evaluar sus propiedades bactericidas. La discusión de los resultados obtenidos del estudio de las NPs de CuBi_2O_4 se lleva a cabo en la 3° sección. Las conclusiones del trabajo se dan en la 4° sección y las referencias bibliográficas, aparecen en el 5° apartado. Además, se presentan 4 apéndices con información adicional, relacionada con este trabajo.

Objetivos

Objetivo General

- Obtener nanopartículas de óxido de cobre y bismuto (CuBi_2O_4) de diferentes tamaños a partir de un método mecanoquímico y evaluar su actividad antibacteriana.

Objetivos Específicos

- Obtener nanopartículas de CuBi_2O_4 por mecano-síntesis.
- Caracterizar las nanoestructuras de CuBi_2O_4 obtenidas, a partir de diferentes técnicas espectroscópicas y por microscopia de transmisión electrónica.
- Evaluar las propiedades antibacterianas de las nanopartículas de CuBi_2O_4 utilizando cepas de *P. aeruginosa* y *S. aureus*.

Hipótesis

La activación mecánica, así como de la mecnosíntesis de la mezcla de sales de cobre (II) y Bi(III) en un medio básico, permitirá obtener nanopartículas de CuBi_2O_4 con diferentes diámetros promedio.

La diferencia de tamaño influirá en la actividad antibacteriana de las NPs de CuBi_2O_4

1.- Generalidades

Los óxidos metálicos en general y en particular los óxidos formados por metales de transición son compuestos con propiedades electrónicas únicas. En la actualidad, el desarrollo de óxidos conductores, superconductores, catalíticos, emisores de luz, dieléctricos, magnéticos etc., demuestra que este tipo de óxidos metálicos forman una serie de compuestos cuyo entendimiento representa un reto científico único y da lugar a una diversidad de aplicaciones que solo se puede encontrar en estos materiales. Por otro lado, se ha informado que las nanoestructuras formadas por óxidos en donde intervienen metales de transición, resultan buenos candidatos para interactuar con las bacterias. En particular se ha informado que las NPs de óxido de titanio (TiO_2), óxido de zinc (ZnO), óxido cúprico (CuO), la magnetita (Fe_3O_4) y el óxido de magnesio (MgO) presentan importantes propiedades antibacterianas, las cuales dependen en gran medida de su forma y tamaño. En años recientes se ha informado sobre las propiedades antimicrobianas de otros óxidos como son la hematita (Fe_2O_3), la espinela de manganeso (Mn_3O_4) y el óxido de cobre y bismuto CuBi_2O_4 , entre otros [1].

1.1.- Óxido de cobre y bismuto, CuBi_2O_4

El óxido de cobre y bismuto (CuBi_2O_4) es de color negro con brillo metálico, se presenta en la naturaleza como el mineral “*kusachiite*”; y tiene una densidad de 8.53 g/cm^3 . Su composición química es de óxido de bismuto (III) (Bi_2O_3 85.42% - 86.00%) y óxido de cobre (II) (CuO (13.91% - 14.58 %)). Presenta un arreglo cristalino tetragonal, con un grupo espacial $P4/ncc$ y parámetros de red $a = b = 8.50 \text{ \AA}$ y $c = 5.81 \text{ \AA}$ (figura 1). El CuBi_2O_4 es un material semiconductor tipo-p con una energía de brecha prohibida o *band gap* de 1.5 - 1.8 eV. [2]

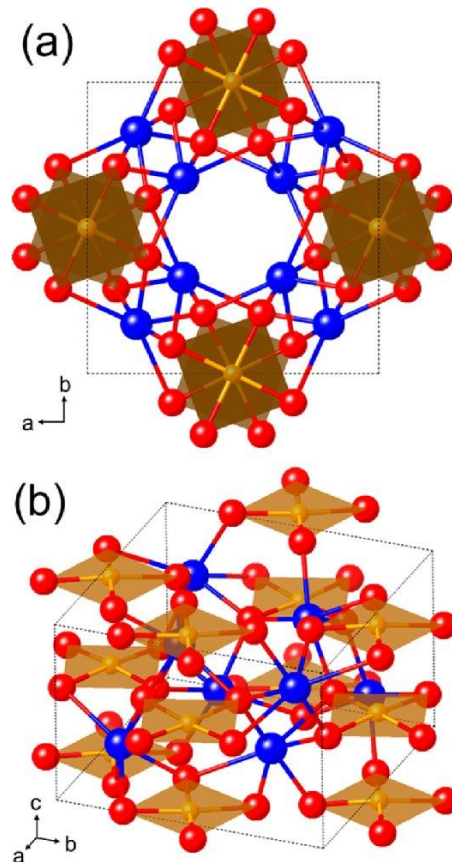


Figura 1. Representación de la estructura cristalina del CuBi_2O_4 . (a) Vista desde el eje C, (b) vista desde un ángulo arbitrario. Los átomos se representan por esferas; azules = Bi, naranjas = Cu y rojas = O. [2]

El mineral *Kusachiite*, (CuBi_2O_4) se ha encontrado en vetas de calcita cortadas en rocas de gehlenita-espurita en la zona de Fuka, Japón. Este mineral fue llamado así en honor al Doctor Isao Kusachi del Departamento de Ciencias de la Tierra de la Universidad de Okayama, en reconocimiento a su trabajo sobre minerales “skarn” (rocas que contienen minerales calcosilicatados como la wollastonita, granate andradita y actinolita). Esta especie mineral y su nombre fueron aprobados por la Comisión de Nuevos Minerales y Nombres de Minerales, de la Asociación Internacional Mineralógica [3].

El CuBi_2O_4 , es un material relativamente poco estudiado en comparación con otros óxidos como las ferritas. La primera referencia data de 1976 y hasta marzo de 2019 solamente aparecen 86 trabajos relacionados con dicho óxido (fuente *scopus*)

Las principales aplicaciones del CuBi_2O_4 están relacionadas con la fotocatalisis, para la generación de hidrógeno a partir de H_2O , con la degradación de algunos colorantes contaminantes del agua y como microbicida, debido a la generación de especies reactivas de oxígeno, capaces de inactivar microorganismos como virus, bacterias, esporas y protozoarios [3]. Las propiedades microbicidas del óxido cúprico (CuO), así como del óxido de bismuto (Bi_2O_3) son bien conocidas, por lo que el CuBi_2O_4 resulta un sistema muy interesante en ese sentido, ya que se podría esperar una respuesta sinérgica o concomitante de ambos óxidos, en la actividad antibacteriana del CuBi_2O_4 . En la tabla 1, se resumen los tipos de bacterias para las que han resultado efectivas las NPs de los óxidos mencionados.

Tabla 1. Bacterias Gram positivas y Gram negativas para las que se ha probado la actividad antibacteriana de NPs de CuO , Bi_2O_3 y CuBi_2O_4

Composición y tamaño de las NPs	Gram negativas	Gram positivas
CuO 23-30 nm [4 y 5]	<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Janthinobacterium sp.</i> , <i>Microbacterium testaceum</i>
Bi_2O_3 15-30 nm [6] y 350 nm [7]	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
CuBi_2O_4 38-100 nm nanorods [8]	<i>Escherichia coli</i>	

1.2.- Nanopartículas de CuBi_2O_4

Los nanomateriales son materiales (cerámicos, metales, semiconductores, polímeros, o bien, una combinación de éstos) en donde al menos una de sus tres dimensiones se encuentra en el intervalo de 1 a 100 nm ($1\text{nm} = 10^{-9}\text{m}$). Durante las últimas décadas, la investigación en ciencia y tecnología se ha centrado en la fabricación de materiales a escala nano-métrica debido a que son sistemas que se encuentran en la interface de sistemas con estados electrónicos discretos (moléculas) y sistemas con estados electrónicos continuos “bulk materials” (materiales masivos).

En los materiales nanoestructurados, los electrones más externos experimentan efectos de confinamiento, que generan que sus propiedades físicas y químicas se modifiquen drásticamente conforme disminuye el tamaño de partícula. El efecto de la disminución del tamaño de partícula se refleja en el desplazamiento de los máximos de las bandas de los espectros de absorción y emisión hacia regiones de mayor energía, la disminución considerable de los puntos de fusión, propiedades catalíticas superiores y aumento de la solubilidad, lo que conduce a que sus propiedades electrónicas, magnéticas y ópticas se modifiquen drásticamente. Los sistemas nanoestructurados, se caracterizan por su gran relación superficie/volumen (S/V), también conocida como superficie específica. A medida que las partículas disminuyen su tamaño, esta relación crece exponencialmente. Además, en los nanomateriales se observa una cuantización de los niveles de energía de los electrones más externos. En la figura 2 se presenta una escala de dimensiones que va desde 1nm hasta 1 milímetro en la que se puede observar la región en que se ubican los materiales nanoestructurados [9].

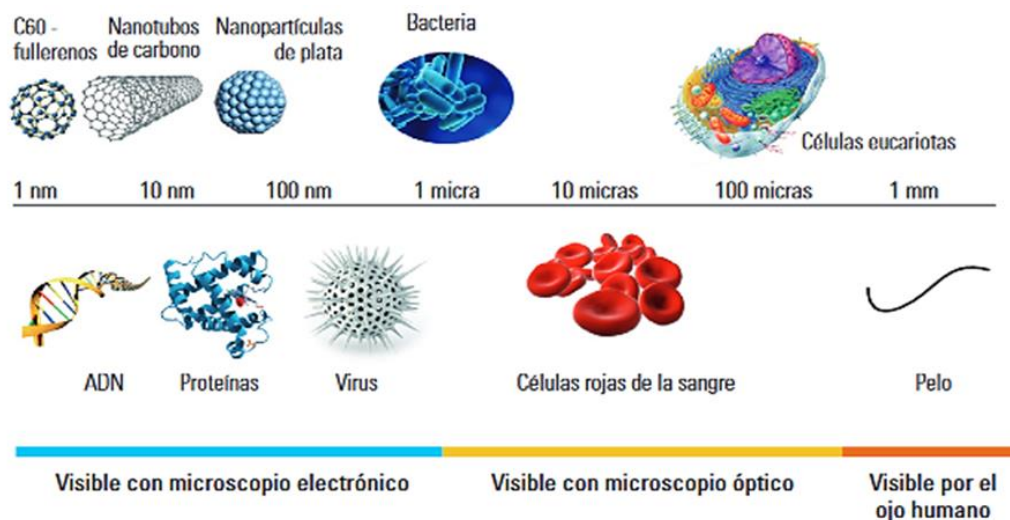


Figura 2 Comparación de tamaños [10]

La producción de nuevos nano-materiales se puede llevar a cabo mediante dos estrategias diametralmente opuestas, por un lado, técnicas descendentes o “*top-down*” (reducción del tamaño de materiales másicos hasta límites nano-métricos), y por otro, técnicas ascendentes o “*bottom-up*” (síntesis de nano-materiales mediante unidades de construcción más pequeñas) [11].

En particular el CuBi_2O_4 nanoestructurado se ha obtenido empleando el método solvotermal, sol-gel y por mecanosíntesis empleando un molino de bolas. A continuación, se describen brevemente dichos métodos.

1.2.1.- Método Solvotermal

Con el nombre general de síntesis solvotermal se agrupan una serie de técnicas en las que un precursor metálico disuelto en un líquido, dentro de una autoclave, es calentado por encima de su punto de ebullición, lo que genera una presión superior a la atmosférica. El líquido habitual es el agua, y de ahí el nombre de “síntesis hidrotermal”; sin embargo, cada vez se van utilizando con mayor frecuencia otros medios líquidos: disolventes orgánicos, amoniaco líquido, hidracina, etc., y tenemos entonces la síntesis solvotermal. En este tipo de técnicas, normalmente los tiempos de reacción son largos (comparados con otros métodos químicos). La síntesis hidrotermal se refiere a reacciones heterogéneas en medio acuoso por encima de 100 °C y 1 bar. Una característica distintiva de la síntesis hidrotermal es que los

reactivos que difícilmente se disuelven en agua pasan a la disolución por acción del propio disolvente o de mineralizadores. El objetivo de esta técnica es lograr una mejor disolución de los componentes de un sistema y así se logran disolver o hacer reaccionar especies muy poco solubles en condiciones habituales (p. ej., la sílice, aluminosilicatos, sulfuros, etc). [1]. Este método se ha empleado para preparar una gran variedad de materiales como, semiconductores, cerámicos, aleaciones y polímeros. El proceso involucra el uso de disolventes que van de una presión moderada a un alta (el rango típico es de 1 atm a 10000 atm) y temperatura entre los 100°C a los 1000°C. El proceso puede ser usado para obtener varias geometrías incluyendo películas delgadas, nano-cristales, y mono-cristales. Además, la morfología (esfera (3D), barra (2D) o alambre (1D)) de los cristales formados se controla mediante la manipulación de la sobresaturación del disolvente, la concentración de la sustancia química de interés y el control cinético. [12]

1.2.2.- Método sol-gel

El método sol-gel es un proceso químico en fase húmeda ampliamente utilizado en la ciencia de los materiales. Este método se utiliza principalmente para la fabricación de nano-materiales (normalmente un óxido metálico). Se parte de una solución química o sol que actúa como precursor de una red integrada ya sea de partículas discretas o de una red de polímeros. Los precursores típicos del proceso sol-gel son los alcóxidos metálicos y los cloruros metálicos, que sufren varias reacciones de hidrólisis y poli-condensación para formar una dispersión coloidal, que luego de una polimerización lenta forma un gel. En general los alcóxidos son muy sensibles a la humedad (se descomponen muy fácilmente ante la presencia de ésta), es por ello que la hidrólisis para la formación del gel es llevada a cabo usando alcoholes como un disolvente común para los diferentes líquidos inmiscibles. Un gel polimérico es una red macromolecular infinita, la cual está hinchada por el disolvente. Un gel puede ser creado cuando la concentración de la especie dispersa aumenta. El disolvente es atrapado en la red de partículas y así la red polimérica impide que el líquido se separe, mientras el líquido previene que el sólido colapse en una masa compacta. La deshidratación parcial de un gel produce un residuo sólido elástico

que se conoce como *xerogel*. Finalmente, este material es completamente deshidratado y eventualmente tratado térmicamente en flujo de gas para obtener el material nano-estructurado final. Se observa un esquema del método sol-gel en la figura 3. [1]

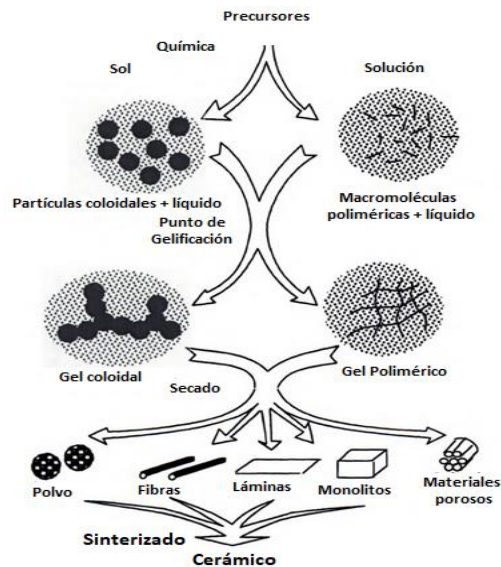


Figura 3 Esquema simplificado del método sol-gel. [13]

1.2.3.- Mecanosíntesis

La IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) define una reacción mecano-química como: “reacción química que es inducida por absorción directa de energía mecánica” con una nota que “cizallamiento, estiramiento, molienda y golpe son algunos métodos típicos para la generación de una reacción mecano-química” [14]. Por otro lado, Gaffet et al. [15] se refiere a la mecano-síntesis como a aquellos procesos en los que se induce una reacción química en las materias de partida, debido únicamente a la acción de molienda continua. La mecano-síntesis es una técnica basada fundamentalmente en reacciones en estado sólido, lo cual significa que los procesos involucrados en la evolución de la microestructura ocurren sin salir de la fase sólida; por lo tanto, no requiere pasar por los puntos de fusión de los elementos participantes de la reacción. En términos prácticos, esto también significa una reducción de costos frente a los procedimientos que usualmente involucran cambios de estado. Las reacciones sólidas, producidas mediante esta técnica,

corresponden a procesos difusivos a escala atómica inducidos por las condiciones locales de presión y temperatura que se generan en la microestructura de las partículas debido a la generación de defectos cristalinos y a la acumulación de tensión en la red cristalina producida durante el proceso de la aleación mecánica. El método general de mecano-síntesis consiste en una serie de procesos que se ilustran en la figura 4. La reacción ocurre antes del término del tratamiento mecánico (fase 1) y es determinada por la excitación térmica, la cual depende de la temperatura de reacción. La aplicación de energía mecánica resulta en un aumento significativo de la velocidad de reacción (fase 2); después, ésta se estabiliza y permanece constante bajo las mismas condiciones (fase 3). Por último, después de la interrupción del tratamiento, la velocidad de reacción vuelve a disminuir (fase 4) [16].

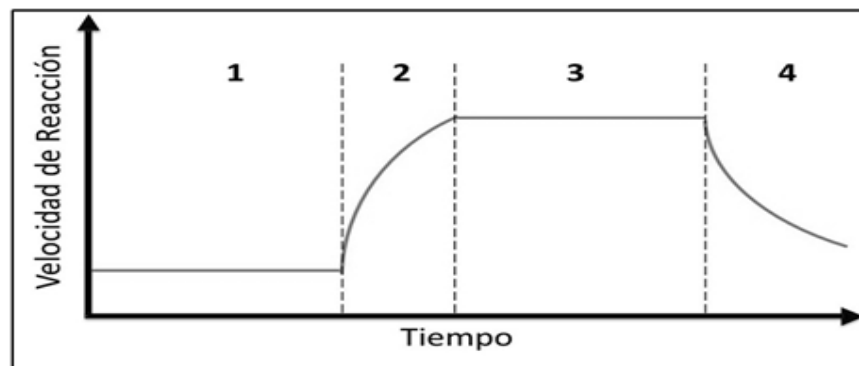


Figura 4. Diagrama de las etapas involucradas en la mecano-síntesis [16].

Por otro lado, la activación mecánica está definida como un incremento en la capacidad de reacción debido a cambios estables en la estructura sólida; esto se refiere a los procesos en los que no se produce un cambio químico en los reactivos de partida, pero se favorece la cinética de la reacción, permitiendo obtener un determinado producto, empleando una temperatura de tratamiento térmico menor que en un proceso de síntesis convencional en estado sólido.

Se ha informado en la literatura que la mecano-síntesis es un método adecuado para producir:

- “Compositos” de polvo metálicos con una microestructura controlada.
- Soluciones sólidas cristalinas y amorfas.
- Materiales metálicos nano-estructurados y nano-vítreos. [17]

Este fue el método de síntesis empleado para obtener las nanoestructuras de CuBi_2O_4 , objeto de estudio de este trabajo de tesis.

En la tabla 2 se hace un resumen de los métodos informados en la literatura para la obtención de NPs de CuBi_2O_4 .

Tabla 2. Métodos de síntesis y tipos de NPs de CuBi_2O_4 .

Método	Reactivos químicos	Condiciones de trabajo	Tamaño (nm)	Morfología
Sol-gel. [18]	$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ HNO_3 , glucosa, acrilamida, ácido tartárico	La reacción se lleva a cabo durante 3h, después secado a 120°C durante 12h. Calcinado durante 6 h a 600°C	230	Esféricas
Mecano- químico (Usando molino de bolas). [19]	MWCNT, $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ y NaOH	La reacción dura 2h en el molino a 480 rpm y T. ambiente. Lavado con agua destilada y etanol. Secado al vacío a 60°C por 8 h.	30-40	Nano- tubos cortos
Sol-gel [20]	Acetona, glicerol, HNO_3 , $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$	La reacción se llevó a 50°C durante 13h, se secó a 120°C por 1 h y se calcina a 500°C por 3h.	900 longitud 200 ancho	Nano- lámina
Hidrotermal [21]	$\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, HNO_3 , agua destilada, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ NaOH	La reacción se llevó a cabo a 120°C de 6 a 24h, después fue centrifugado y secado a 60°C .	400-800 longitud 200-500 ancho	Nano- lámina
Hidrotermal [22]	$\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ Ac etato cúprico, agua, etanol, NaOH	La reacción se llevó a cabo a 120°C durante 12h. Secado a 80°C durante 8 h	100- 2800 longitud 40-250 diámetro	Nano- tubos
Hidrotermal [23]	$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ $\text{Bi}(\text{NO}_3)_2$ Agua destilada NaOH	La reacción se llevó a cabo en una autoclave a 180°C durante 10h. Se lavó con agua destilada y se secó a 100°C durante 2h.	30-50	Cúbicas

En esta tesis se evaluó la actividad antibacteriana de las NPs de CuBi_2O_4 frente a cepas de *P. aeruginosa* y de *S. aureus*. Estas bacterias se eligieron ya que son consideradas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) de prioridad crítica (documento publicado el 27 de febrero de 2017), pues presentan multi-resistencia y son especialmente peligrosas en hospitales, en pacientes inmunodeprimidos.

1.3.- *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*

P. aeruginosa (figura 5) pertenece a la rama g de las proteobacterias, así como las enterobacterias. Es un bacilo aeróbico Gram negativo perteneciente a la familia *Pseudomonadaceae*. Los bacilos miden aproximadamente de 0.5 a 0.8 μm por 1.5 μm , la mayoría de las cepas son móviles debido a un flagelo polar. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, pero puede crecer incluso hasta 42°C. Esta especie bacteriana es capaz de utilizar una enorme variedad de compuestos orgánicos como sustrato para crecer, capacidad que le permite colonizar nichos en los que son escasos los nutrientes que otros organismos pueden asimilar. Se ha reportado el aislamiento de *P. aeruginosa* de ambientes tan inhóspitos como son el combustible de avión, soluciones de clorhexidina y el jabón, contrariamente a lo que parece, todos nosotros estamos en contacto diariamente con *P. aeruginosa*, ya que se encuentra en bajas cantidades en nuestros alimentos y en algunos artículos de limpieza. Debido a su alta capacidad de adaptabilidad, son organismos de vida libre que se encuentran en una gran variedad de ecosistema generalmente formando biopelículas. Todas las cepas son potencialmente patógenas para el hombre y las plantas. *P. aeruginosa* representa un problema importante de salud pues se presenta como un patógeno oportunista generando infecciones nosocomiales comúnmente y afectando a pacientes inmunodeprimidos. Una vez que se establece la infección, la bacteria produce una serie de compuestos tóxicos que causan daño tisular extenso e interfieren con el funcionamiento del sistema inmune. Es una bacteria que presenta una muy alta resistencia natural a distintos antibióticos y a desinfectantes, resultando en una alta mortalidad en pacientes infectados [24].

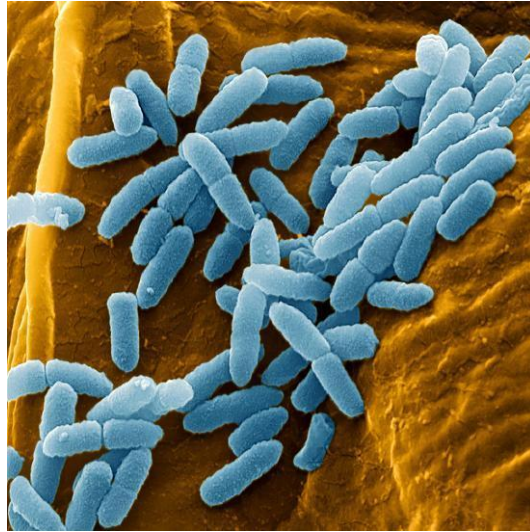


Figura 5. *P. aeruginosa* [24]

Por otro lado, *S. aureus* (figura 6) son bacterias esféricas con un diámetro aproximado de 0.8-1.0 μm ; no poseen flagelos, ni esporas. Son bacterias Gram positivas y su agrupación característica es en cúmulo parecido a racimos de uvas. La temperatura óptima de incubación es de 30-37°C, aunque son capaces de crecer en un rango amplio de temperatura que va desde los 10°C y hasta los 40°C, y soporta una concentración alta de NaCl (15%). Son bacterias anaerobias facultativas que pueden crecer a partir de respiración aerobia o por medio de la fermentación. Puede causar infecciones supurativas, infecciones estomacales y síndrome del choque tóxico. Dentro de las enfermedades más graves que *S. aureus* genera, se encuentran la neumonía, flebitis, meningitis y endocarditis. Una de las cepas de mayor relevancia es *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA por sus siglas en inglés) observada predominantemente en infecciones nosocomiales, y más recientemente se ha encontrado fuera de hospitales. La resistencia a la meticilina es un indicativo de multiresistencia a antibióticos por parte de las bacterias.

En la actualidad se ha incrementado la resistencia de algunas bacterias a tratamientos con antibióticos, lo que causa que la población sea afectada por este tipo de bacterias y las infecciones que producen, a veces tardan en curarse o causan la muerte del individuo. Por tal razón, se están buscando nuevas formas de

combatir las infecciones de tipo bacteriano y en este sentido, las nanoestructuras, debido a sus dimensiones de unos cuantos nanómetros y a su gran superficie específica, resultan candidatos ideales para interactuar con las bacterias [25].

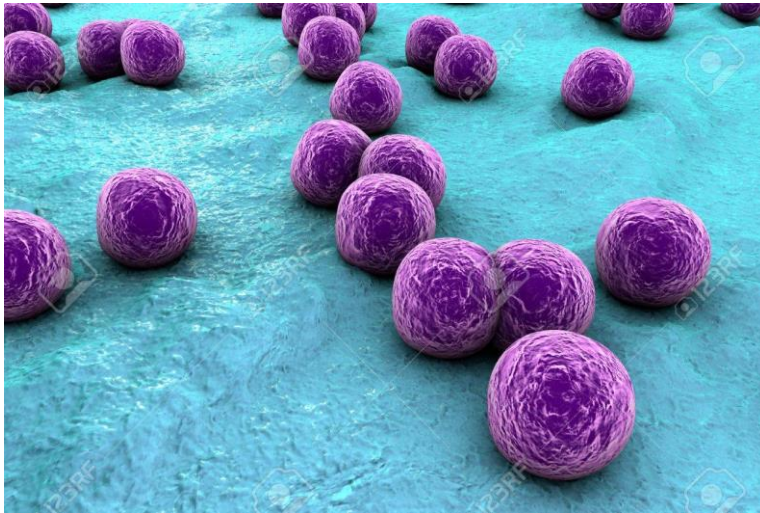


Figura 6. *S. aureus* [25]

1.4.- Mecanismos propuestos del efecto de las NPs sobre las bacterias

Se ha informado sobre diversos mecanismos alrededor del efecto antibacteriano de los óxidos metálicos nanoestructurados, los cuales se describen a continuación brevemente (Figura 7).

- **Estrés oxidativo, formación de especies reactivas de oxígeno (ERO).** Las ERO, son un conjunto de moléculas reactivas producidas en algunos procesos metabólicos en los que participa el oxígeno: el anión superóxido O_2^- que es un potente agente oxidante muy reactivo con el agua. El peróxido de hidrógeno H_2O_2 y el radical hidroxilo (OH) que es el más reactivo, ya que aceptando un electrón más, da lugar a una molécula de agua. Las NPs de óxidos metálicos son capaces de producir distintas especies reactivas de oxígeno, pueden participar en distintos tipos de reacciones en las que pueden sufrir procesos de oxidación o reducción. Las ERO pueden producir efectos nocivos sobre las células como daños en el

ADN, daños producidos por oxidación de ácidos grasos poliinsaturados y de aminoácidos. La alteración del balance en los mecanismos de producción y eliminación de las ERO, en favor de la producción, origina el estado de estrés oxidativo en la célula. Las NPs de MgO pueden generar O_2^- , mientras que las NPs de ZnO pueden generar H_2O_2 y OH, pero no O_2^- . Por otro lado, las NPs de CuO pueden producir los cuatro tipos de oxígeno reactivo. El O_2 y el H_2O_2 causan reacciones de estrés menos agudas y pueden ser neutralizados por antioxidantes endógenos, como las enzimas superóxido y la catalasa, mientras que el OH y el O_2 pueden conducir a la muerte microbiana aguda.

- **Daño en pared-membrana celular por interacción electrostática y acumulación.** Los grupos electronegativos de los polisacáridos en la membrana bacteriana son sitios de atracción de cationes metálicos. La diferencia de carga entre membranas bacterianas y las NPs de óxidos metálicos conduce a la atracción electrostática y así se acumulan en la superficie de la bacteria alterando la estructura y la permeabilidad de la membrana celular. Las bacterias Gram-negativas tienen una mayor carga negativa que las bacterias Gram-positivas y por lo tanto la interacción electrostática será más fuerte en las cepas Gram-negativas. Los poros de las membranas se encuentran en el orden de nanómetros, por lo tanto, entre menor sea el tamaño de partícula y mayor es el área de superficie, mayor es la eficacia de los óxidos metálicos nanoestructurados. De la misma manera los cationes extraídos de las NPs de los óxidos metálicos y su acumulación en pared celular, crean fosas en ella, llevando a un cambio en la permeabilidad debido a la liberación sostenida de lipopolisacáridos, proteínas de la membrana y factores intracelulares. Además, se ha vinculado este mecanismo con la interrupción de la replicación del adenosín trifosfato (ATP) y del ácido desoxirribonucleico (ADN) de la bacteria, llevándola a su muerte. Un estudio señala que la acción de las NPs depende de los componentes y la estructura de la célula bacteriana. Se mencionó, por ejemplo, que la acción antimicrobiana de ZnO es más efectiva en bacterias Gram-positivas. Los componentes peculiares de las bacterias Gram-negativas, como los lipopolisacáridos (LPS), pueden prevenir la adhesión de las np de ZnO a la

barrera de las células bacterianas y regular el flujo de iones dentro y fuera de la membrana celular bacteriana.

- **Pérdida de homeostasis por iones metálicos.** El balance de elementos metálicos es esencial para la supervivencia microbiana, ya que regula las funciones metabólicas al ayudar a las coenzimas, cofactores y catalizadores. Cuando las bacterias tienen un exceso de metales o iones metálicos, habrá un desorden en las funciones metabólicas.

Los iones metálicos se unen con el ADN y alteran la naturaleza helicoidal mediante enlaces cruzados entre y dentro de las cadenas de ADN. Los iones metálicos neutralizan las cargas en LPS y aumentan la permeabilización de la membrana externa. Reportes señalan que las NPs de TiO_2 pueden adherirse a la superficie de las células bacterianas liberando iones y dañando la composición y estructura de la membrana celular, interfiriendo con la función de la membrana celular y causando la fuga de contenido celular, resultando en la muerte bacteriana. Las NPs que contienen $\text{Fe}^{(2+)}$ / $\text{Fe}^{(3+)}$ también puede causar la descomposición de las células bacterianas debido a la difusión de iones metálicos generando grandes cantidades de radical hidroxilo y la difusión en las células bacterianas. Otros estudios señalan que las NPs de óxidos metálicos pueden liberar lentamente iones metálicos a través de adsorción, disolución e hidrólisis. Dichos iones son tóxicos y abrasivos para las bacterias y, por lo tanto, lisan las células.

- **Disfunción de proteínas y enzimas.** La disfunción de la proteína es otro modo de actividad antibacteriana exhibida por NPs de óxidos metálicos. Los iones metálicos catalizan la oxidación de las cadenas laterales de aminoácidos dando como resultado carbonilos unidos a proteínas. Los niveles de carbonilación dentro de la molécula de proteína sirven como marcador para el daño oxidativo de la proteína. Esta carbonilación de proteínas conducirá a la pérdida de la actividad catalítica en el caso de las enzimas, lo que finalmente desencadena la degradación de las proteínas. Además, estos iones reaccionan con los grupos -SH de muchas proteínas y enzimas y los vuelven inactivos. Un estudio señala que las NPs de CuO causaron alteración significativa de expresión

de proteínas involucradas en el metabolismo del nitrógeno, la transferencia de electrones y el transporte de sustancias.

- **Genotoxicidad e inhibición de la señal de transducción.** Debido a sus propiedades eléctricas, las NPs de óxidos metálicos interactúan con los ácidos nucleicos, en particular el ADN genómico y el plasmídico. Suprimen la división celular de los microbios al alterar los procesos de replicación del ADN cromosómico y del plásmido. Se sabe que la transducción de señales en las bacterias se ve afectada por las NPs de óxidos metálicos. La fosfotirosina es un componente esencial del mecanismo de transducción de señales en bacterias. Estas nanopartículas desfosforilan los residuos de fosfotirosina, lo que inhibe la transducción de señales y, en última instancia, obstruye el crecimiento de bacterias. Estudios señalan que las NPs de MgO pueden alterar la expresión de muchas proteínas metabólicas, incluida la regulación de una proteína débil de unión a ésteres de tiamina y riboflavina, y la regulación de una proteína asignada a la ruta crítica del metabolismo celular bacteriano, lo que resulta en una reducción de la actividad metabólica celular, lo que sugiere que las NPs regulan los procesos metabólicos de las bacterias actuando sobre las proteínas diana. Las NPs de CuO pueden regular la expresión de proteínas relacionadas con el metabolismo de nitrógeno bacteriano e inhibir significativamente la actividad del nitrato reductasa y la reductasa de nitrito.

Finalmente, también es importante considerar que los cationes presentes en la superficie de las NPs formadas por óxidos metálicos, son ácidos de Lewis con valencias insaturadas que podrían formar enlaces de tipo covalente dativo, con bases de Lewis (grupos nitrogenados y oxigenados) presentes en los aminoácidos y polisacáridos constituyentes de la pared celular. Dicha interacción también podría generar la lisis de la pared celular. Por todo lo anterior, es importante tener en cuenta que existen diversos mecanismos que pueden estar involucrados en la actividad antimicrobiana de las NPs de los óxidos metálicos. [26]

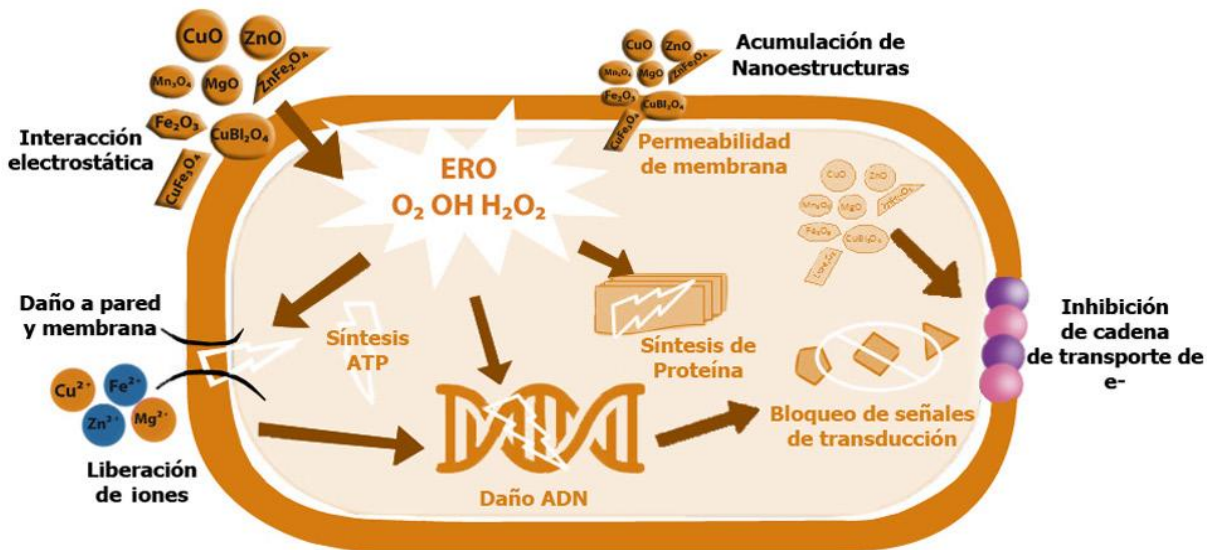


Figura 7. Posibles mecanismos del efecto antibacteriano de los óxidos metálicos nanoestructurados. [26]

2.- Desarrollo experimental

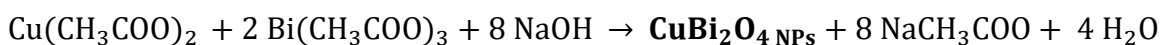
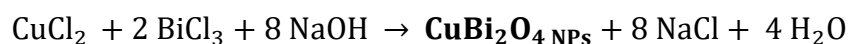
En esta sección se describe la metodología empleada para sintetizar las NPs de CuBi_2O_4 , así como los equipos empleados en su caracterización. También se presenta la metodología que se llevó a cabo para evaluar la actividad antibacteriana de las NPs obtenidas.

Las NPs de óxido de cobre y bismuto (CuBi_2O_4) se obtuvieron por triplicado a partir de los siguientes reactivos:

- Cloruro de cobre dihidratado ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), grado reactivo $\geq 99.0\%$, Sigma-Aldrich
- Cloruro de bismuto (BiCl_3), grado reactivo $\geq 98.0\%$, Sigma-Aldrich
- Acetato de cobre ($\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) 99.99%, Aldrich
- Acetato de bismuto ($\text{Bi}(\text{CH}_3\text{COO})_3$) 99.99 +%, Aldrich
- Agua destilada
- Hidróxido de sodio (NaOH), grado reactivo $\geq 97.0\%$, Sigma-Aldrich
- Acetona grado reactivo $\geq 99.5\%$ Sigma-Aldrich

2.1.- Obtención de las NPs de CuBi₂O₄

Las nanopartículas de CuBi₂O₄ se obtuvieron mediante reacciones en estado sólido, empleando como sales precursoras cloruros y acetatos de Cu(II) y Bi(III), en relación estequiométrica 1:2 y en presencia de una base, de acuerdo a las siguientes reacciones químicas:



Se emplearon dos concentraciones de partida de la sal de cobre: 5×10^{-4} y 2×10^{-3} moles. En la tabla 3 se presentan las cantidades que se emplearon de cada reactivo, para llevar a cabo la reacción.

Tabla 3: Pesos y concentración de los reactivos químicos empleados.

Reactivo químico	(moles) peso	(moles) peso
Cloruro de cobre di-hidratado (CuCl ₂ •2H ₂ O)	(5×10^{-4}) 0.08 g	(2×10^{-3}) 0.34 g
Cloruro de bismuto (BiCl ₃)	(1×10^{-3}) 0.31 g	(4×10^{-3}) 1.26 g
Acetato de cobre Cu(CH ₃ COO) ₂	(5×10^{-4}) 0.09 g	(2×10^{-3}) 0.36 g
Acetato de bismuto Bi(CH ₃ COO) ₃	(1×10^{-3}) 0.38 g	(4×10^{-3}) 1.54 g
Hidróxido de sodio (NaOH)	(4×10^{-3}) 0.16 g	(1.6×10^{-2}) 0.64 g

2.1.1.- Reacciones sin llevar a cabo un tratamiento térmico (mecanosíntesis)

En primer lugar, las sales metálicas se muelen en un mortero de ágata durante 10 minutos. Posteriormente se agrega el hidróxido de sodio (NaOH) a la mezcla de sales metálicas. La molienda se continúa hasta que el producto obtenido no presenta ningún cambio aparente, en general para este sistema, la molienda de todos los reactivos se lleva a cabo durante 30 minutos.

El producto obtenido se lava 4 veces con agua destilada y 3 veces con acetona, separando por centrifugación a 3500 rpm por 10 minutos, en cada ocasión. El producto obtenido se deja secar a temperatura ambiente.

2.1.2.- Reacciones tratadas térmicamente (activación mecánica)

Se siguió el procedimiento anterior, pero el producto obtenido fue tratado térmicamente a 600°C por dos horas.

En la figura 8, se presentan fotografías de la evolución de la reacción para obtener NPs de CuBi_2O_4 y en la figura 9 se presenta un esquema general del procedimiento experimental.



Figura 8. Evolución de la reacción para obtener NPs de CuBi_2O_4



Figura 9. Esquema general del procedimiento experimental.

2.1.3.- Equipos empleados en la caracterización de las NPs de CuBi_2O_4

- ✓ **Difractómetro de Rayos X Siemens D5000.** Los difractogramas se obtuvieron con una radiación $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda=1.5406 \text{ \AA}$) en el laboratorio de Estado Sólido de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FES-C), UNAM.
- ✓ **Microscopio electrónico de transmisión JEM-ARM200F** del Laboratorio Avanzado de Nanoscopía Electrónica (LANE) del Cinvestav, IPN.
- ✓ **Espectrofotómetro UV-Vis Ocean Optics USB2000** del laboratorio de Materiales y Nanotecnología del Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología (ICAT), UNAM.
- ✓ **Espectrofotómetro de dispersión Raman WITec.** Láser Nd: YVO_4 de 532nm con un aumento de 100x del Laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscópica (LUCE) del ICAT, UNAM.
- ✓ **Espectrómetro de Absorción Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR por sus siglas en inglés) Thermo Nexus** del Laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscópica (LUCE) del ICAT, UNAM.

- ✓ ***Espectrofluorómetro F7000 Hitachi***, con una lámpara de 150W de Xe como fuente de excitación del laboratorio de Estado Sólido de la FES-C, UNAM.
- ✓ ***Espectrómetro de Resonancia Paramagnética Electrónica (RPE) ELEXSYS E500 Bruker***, en banda X a temperatura ambiente, de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAII) y la Industria de la facultad de Química de la UNAM.

2.1.4- Ensayos de actividad antibacteriana.

Para llevar a cabo los ensayos de la actividad antibacteriana se emplearon los siguientes materiales:

- Asas bacteriológicas desechables
- Cajas Petri
- Tubos de 1.5 y 2 mL
- Placas de 96 pozos
- Agar soya tripticasa (TSA)
- Cepas de bacterias:
- *Pseudomonas aeruginosa* (Gram negativo) ATCC 43636
- *Staphylococcus aureus* (Gram positivo) ATCC 25923

2.1.4.1- Equipo usado para los ensayos de la actividad antibacteriana.

Todos los equipos pertenecen al laboratorio de Genética Molecular de la División de Estudios de Posgrado e Investigación (DEPeI) de la Facultad de Odontología de la UNAM.

- ✓ ***Contador de colonias automatizado Acolyte 3 HD el***
- ✓ ***Horno / Incubadora CLS-NHYBRID***
- ✓ ***Incubadora Felisa***
- ✓ ***Lector de micro-placas FilterMax F5***
- ✓ ***Bio-fotómetro Eppendorf D30***

2.4.1.2.- Nanopartículas en el medio de cultivo (Trypticase de soya-agar)

Se llevó a cabo una primera evaluación de la actividad antimicrobiana de las NPs de CuBi_2O_4 , para lo cual se prepararon dispersiones de dichas NPs en el medio de cultivo (agar soya tripticasa) en dos concentraciones: 25 mg y 50 mg de NPs por mL de medio de cultivo, respectivamente. El medio de cultivo con la dispersión de las NPs se colocó en cajas Petri de 60X15 mm y se dejó gelificar. Posteriormente fueron inoculadas con 10^3 unidades formadoras de colonias (UFC) de *P. aeruginosa* y *S. aureus*, respectivamente, y se incubaron por 24 h a 35 °C. En la figura 10 se presentan fotografías de una caja Petri con medio de cultivo y de una caja Petri con medio de cultivo y NPs de CuBi_2O_4 . Este experimento se llevó a cabo en sustitución de los antibiogramas debido a que se observó una pobre difusión de las NPs hacia el medio de cultivo. El porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano se obtuvo a partir de la ecuación 1:

$$\% \text{ de inhibición bacteriana} = X * \frac{C_o}{100 \%} \quad (\text{Ecuación 1})$$

En donde:

X= *Unidades Formadoras de Colonias (UFC) contabilizadas

Co = Concentración inicial de las UFC

*Unidades Formadoras de Colonias (UFC), término que debe utilizarse para reportar la cuenta de colonias en placa, las cuales pueden surgir de una célula o bacteria o de un cúmulo de células o bacterias [27].

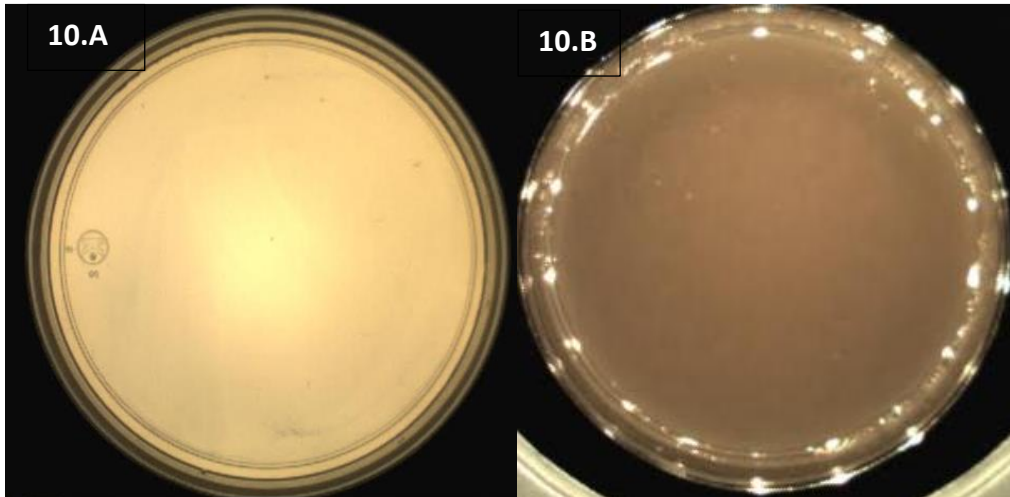


Figura 10. (10.A) Cajas Petri con medio de cultivo agar y (10.B) medio de cultivo agar y NPs de CuBi_2O_4

2.4.1.3- Ensayo de actividad metabólica bacteriana por sales de tetrazolio (XTT)

Este ensayo permite evaluar la viabilidad bacteriana a través de un método colorimétrico. Este experimento se llevó a cabo en placas con 96 pozos y se utilizaron las siguientes cepas de bacterias *P. aeruginosa* y *S. aureus*. Además, para cada cepa se utilizaron 3 filas de 10 pozos, de los cuales 3 pozos se utilizaron como controles. El octavo pozo fue el control positivo (+) que contiene 80 μL de clorhexidina al (2%), 100 μL de medio de cultivo y 20 μL de bacterias, el noveno pozo fue el control negativo (-) que contiene 180 μL medio de cultivo y 20 μL bacterias y el décimo pozo fue el control doble negativo (-/-) que sólo contiene 200 μL de medio de cultivo líquido.

Se pesaron 0.1 g de las NPs CuBi_2O_4 y se dispersaron con la ayuda de un vortex en 1 mL del medio de cultivo. Se tomaron 200 μL de la dispersión de nanopartículas y fueron añadidos al primer pozo, mientras que al resto de los pozos (del segundo al séptimo) se les agregó 100 μL de medio de cultivo. Posteriormente se tomaron 100 μL del primer pozo y se le agregaron al segundo pozo, se homogenizó la dispersión en este pozo y se volvió a tomar 100 μL para agregarlos al tercer pozo y así sucesivamente se repite esta metodología hasta el séptimo pozo, a este último

pozo se le retiran 100 μL de la dispersión. Esta acción se realiza con el objetivo de tener diferentes diluciones de las NPs. Finalmente se agregan 80 μL de medio de cultivo y 20 μL de la suspensión de bacterias (10^3 UFC) a cada pozo. Posteriormente, la placa se introdujo a una incubadora con una agitación de 120 RPM a una temperatura de 35°C durante 24 h. Al transcurrir 24 h, se agrega el reactivo XTT (que es la sal de sodio 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2-tetrazolium-5-carboxanilide y PMS (Fenasin Metosulfato). Posteriormente se deja en la obscuridad durante 2 h a 37 °C. Este experimento se fundamenta en la reducción del XTT hasta cristales de formazan (que absorben a 450 nm). Está reacción es acelerada por la adición de un acoplador de electrones como es el PMS. Finalmente, se tomó la lectura de la absorbancia en 450 nm de cada pozo con un lector de microplacas FilterMax F5. En la Figura 11 se muestra un diagrama de la placa empleada para determinar la viabilidad bacteriana en presencia de las NPs de CuBi_2O_4 , en éste se pueden observar la concentración de NPs en cada pozo.

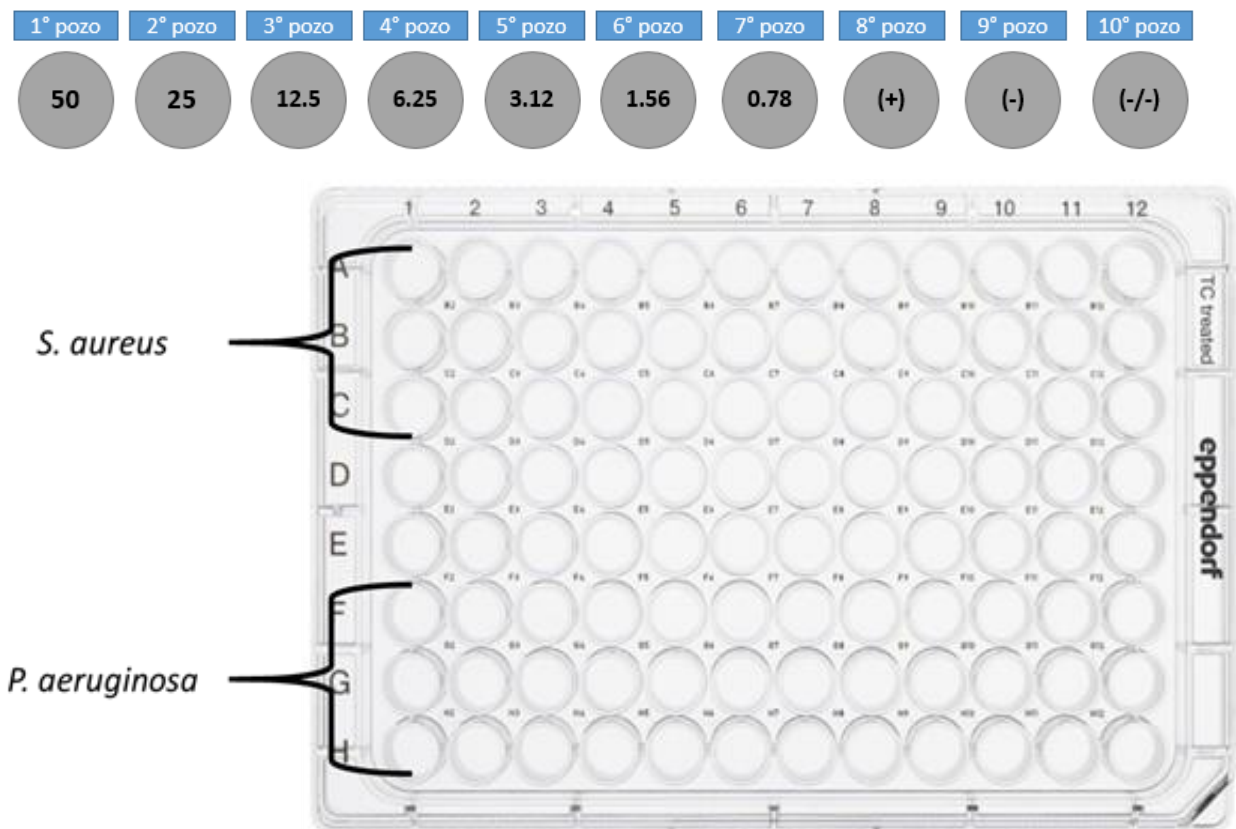


Figura 11. Esquema de las placas y concentración de las NPs en los pozos.

3.- Resultados y discusión





En esta sección se presentan y discuten los resultados obtenidos a partir de las diferentes técnicas analíticas empleadas en la caracterización de los sistemas obtenidos.

3.1.- Caracterización por Difracción de Rayos X de polvos

En primer lugar, se presentan los difractogramas del producto obtenido a partir de las reacciones en donde se partió de 5×10^{-4} moles de la sal de cobre (acetatos ó cloruros), 1×10^{-3} moles de la sal de bismuto y 4×10^{-3} moles de sosa. Se comparan los difractogramas de los productos obtenidos sin llevar a cabo ningún tratamiento térmico y de los productos que fueron calcinados a 600°C por dos h.

Se ha asignado un color para referirnos a las condiciones en que se obtuvieron las NPs de CuBi_2O_4 , ver tabla 4. Es importante notar que el CuBi_2O_4 se obtiene aún sin llevar a cabo un tratamiento térmico Figuras 12 y 13. Los valores de $2(\theta)$ se presentan en la tabla 5.

Tabla 4: Colores para identificar las condiciones en que se obtuvieron las NPs de CuBi_2O_4 , cuando se partió de 5×10^{-4} moles de la sal de Cu(II).

Color	Reacción para obtener NPs de CuBi_2O_4	Tratamiento térmico
 Verde	$\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 + 2\text{Bi}(\text{CH}_3\text{COO})_3 + 8\text{NaOH}$	Sin calentar
 Azul	$\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 + 2\text{Bi}(\text{CH}_3\text{COO})_3 + 8\text{NaOH}$	$600^\circ\text{C}/2\text{h}$
 Gris	$\text{CuCl}_2 + 2\text{BiCl}_3 + 8\text{NaOH}$	Sin calentar
 Rojo	$\text{CuCl}_2 + 2\text{BiCl}_3 + 8\text{NaOH}$	$600^\circ\text{C}/2\text{h}$

Es importante mencionar que el CuBi_2O_4 se obtuvo como fase única, es decir que todos los picos de difracción corresponden con los informados en la tarjeta cristalográfica (*International Centre for Diffraction Data*) ICDD 01-079-1810, para el CuBi_2O_4 , en un arreglo cristalino tetragonal, con un grupo espacial $P4/ncc$ y parámetros de red $a = b = 8.48 \text{ \AA}$, $c = 5.79 \text{ \AA}$.

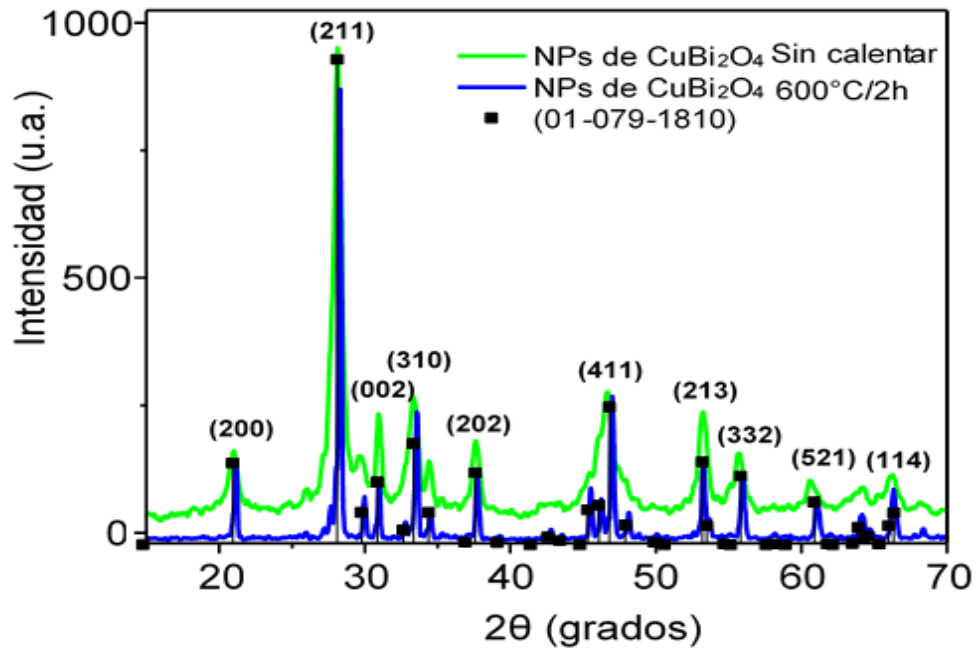


Figura 12. Difractogramas de las NPs de CuBi_2O_4 , obtenidas a partir de las sales metálicas de acetato

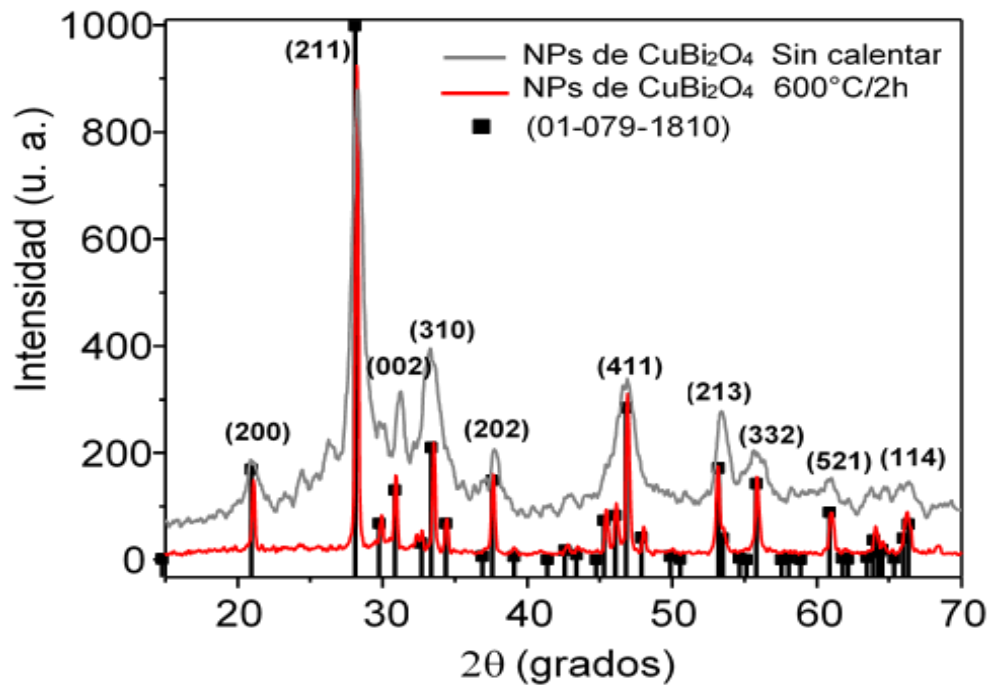






Figura 13. Difractogramas de las NPs de CuBi_2O_4 , obtenidas a partir de las sales metálicas de cloruros.

Tabla 5. Posición de los picos de difracción de las NPs de CuBi₂O₄

Plano	Posición de los picos de difracción 2θ (grados) presentes en los patrones de DRX en polvo de las NPs de CuBi ₂ O ₄				
	Tarjeta Cristalográfica (01-079-1810)				
(200)	20.81	20.94	20.93	20.97	20.99
(211)	28.22	28.26	28.11	28.12	28.18
(002)	31.05	31.03	30.87	31.15	31.15
(310)	33.01	33.51	33.36	33.22	33.23
(202)	37.81	37.88	37.55	37.86	37.98
(411)	46.86	46.83	46.67	46.87	46.89
(213)	53.26	53.35	53.19	53.26	53.43
(332)	55.93	55.96	55.8	55.94	55.65
(521)	60.91	61.02	60.69	61.02	61.01
(600)	66.25	66.41	66.23	66.27	66.49





El tamaño promedio de las NPs fue determinado a partir de los picos de difracción correspondientes a los planos; (200), (211) y (202), empleando la ecuación de Scherrer (ecuación 2) a partir de los datos del ancho medio (*Full Width at Half Maximum, FWHM*) de los picos de interés, para los planos representativos de las NPs incorporándolos a la corrección de Warren que incluye como patrón de difracción.

$$\varepsilon = \frac{\kappa x \lambda}{FWHM x \cos \theta} \quad (\text{Ecuación 2})$$

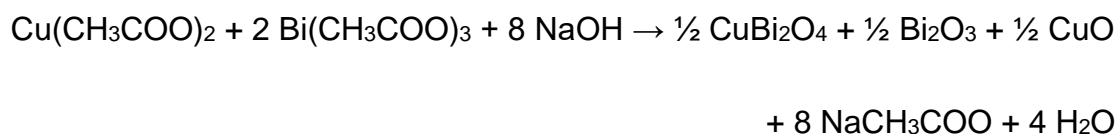
Donde ε es el tamaño promedio del cristal, λ es la longitud de onda de la radiación, κ es una función de forma que tiene un valor de 0,9. FWHM determinado por el del ancho medio del pico experimental en radianes y θ es el ángulo de incidencia en radianes. [16]. En la tabla 6, se presenta el tamaño promedio calculado para las NPs

de CuBi_2O_4 obtenidas sin calentar y después de calcinar a $600^\circ\text{C}/2\text{ h}$. En general se puede observar que las NPs que fueron sometidas a un tratamiento térmico son alrededor de 2.5 veces el tamaño de las NPs que se obtuvieron sin necesidad de llevar a cabo un tratamiento térmico posterior a la molienda.

Tabla 6: Tamaños promedio de las NPs de CuBi_2O_4

NPs de CuBi_2O_4	Plano/ diámetro promedio(nm)			Promedio
	(200)	(211)	(202)	
a partir de acetatos sin calentar 	23.8	24.4	23.8	24.0
a partir de acetatos $600^\circ\text{C}/2\text{h}$ 	52.1	52.8	53.9	52.9
a partir de cloruros sin calentar 	19.5	20.0	21.1	20.2
a partir de cloruros $600^\circ\text{C}/2\text{h}$ 	53.7	52.8	51.8	52.7

Por otro lado, en las reacciones que se llevaron a cabo partiendo de 2×10^{-3} moles de la sal de cobre, 4×10^{-3} moles de la sal de bismuto y 1.6×10^{-2} moles de sosa, se favorece la formación de óxido de bismuto; Bi_2O_3 (JCPDF 74-1374), óxido cúprico; CuO (JCPDF 80-1268) y óxido de cobre y bismuto; CuBi_2O_4 (ICDD 01-079-180) Figura 14, de acuerdo al siguiente equilibrio químico:



Estas reacciones se llevaron a cabo por triplicado, y al no obtener una fase pura, se decidió no continuar con su caracterización.

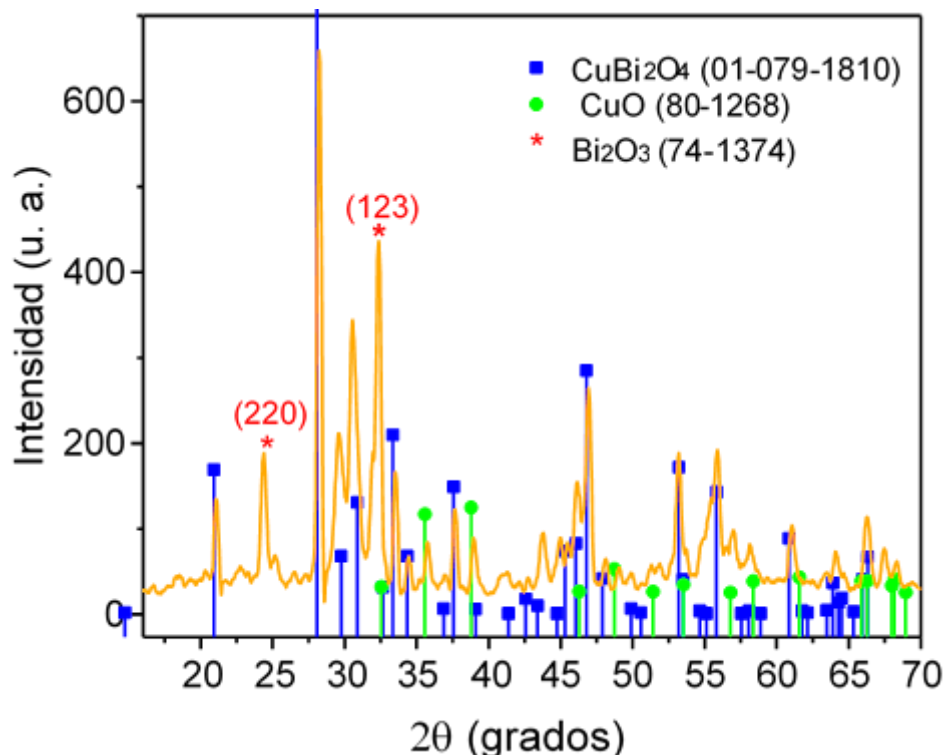


Figura 14. Difractograma de la mezcla de NPs de CuBi_2O_4 , CuO y Bi_2O_3 .

3.2.- Caracterización de las NPs de CuBi_2O_4 por microscopía electrónica de transmisión de alta resolución HR-TEM (*High-resolution transmission electron microscopy*).

Para obtener las micrografías correspondientes, se prepararon las muestras como se describe a continuación. Se dispersaron 0.1 gramos de las NPs de CuBi_2O_4 en 2 mL de etanol. La dispersión se colocó en un baño ultrasónico durante un minuto, con la finalidad de conseguir una dispersión homogénea de las NPs en el disolvente. Posteriormente, con el uso de una micro pipeta se tomaron 60 μL de la dispersión de las NPs de CuBi_2O_4 y se depositaron en una rejilla S160-3 Carbon Film de 300 Mesh Cu (50). En las figuras 15 y 16, se presentan algunas micrografías representativas de las NPs de CuBi_2O_4 de tamaño promedio de 20 y 50 nm, respectivamente. En las figuras 15.A y (15.C,15. D), se pueden apreciar NPs aisladas con tamaños de 21 X 17 nm y una más pequeña de 10.3 X 10.3 nm, respectivamente. Es importante mencionar que, no obstante que estas NPs se

obtuvieron sin llevar a cabo un tratamiento térmico posterior a la molienda, se obtienen NPs de CuBi_2O_4 muy cristalinas.

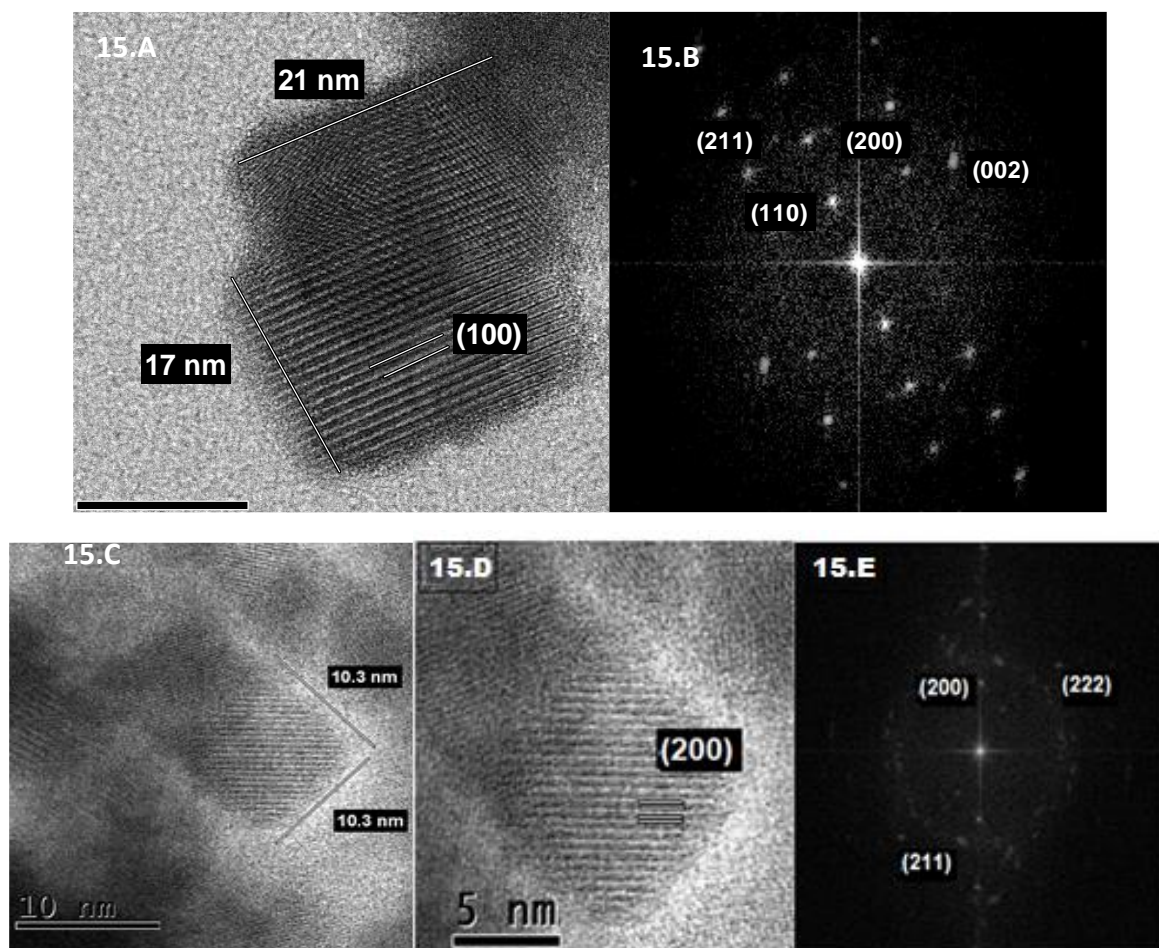


Figura 15. Micrografías de HRTEM y patrones de difracción de electrones, representativos de las NPs de CuBi_2O_4 obtenidas sin llevar a cabo un tratamiento térmico posterior a la molienda

Por otro lado, las NPs de CuBi_2O_4 obtenidas después de calentar a 600°C por 2 h forman nanoestructuras alargadas tipo *nanorods* con dimensiones de alrededor de 12.64×58.68 nm, Figura 16.A. En la figura 16.B se aprecia un acercamiento en la dirección más larga del *rod* en donde se observa un crecimiento en la dirección del plano (211) con una distancia interplanar de 3.18 \AA . Las distancias observadas en los correspondientes patrones de difracción de electrones; resumidos en la tabla 7,

corresponden a los planos del CuBi_2O_4 (ICDD 01-079-1810), lo que corrobora la composición de las NPs.

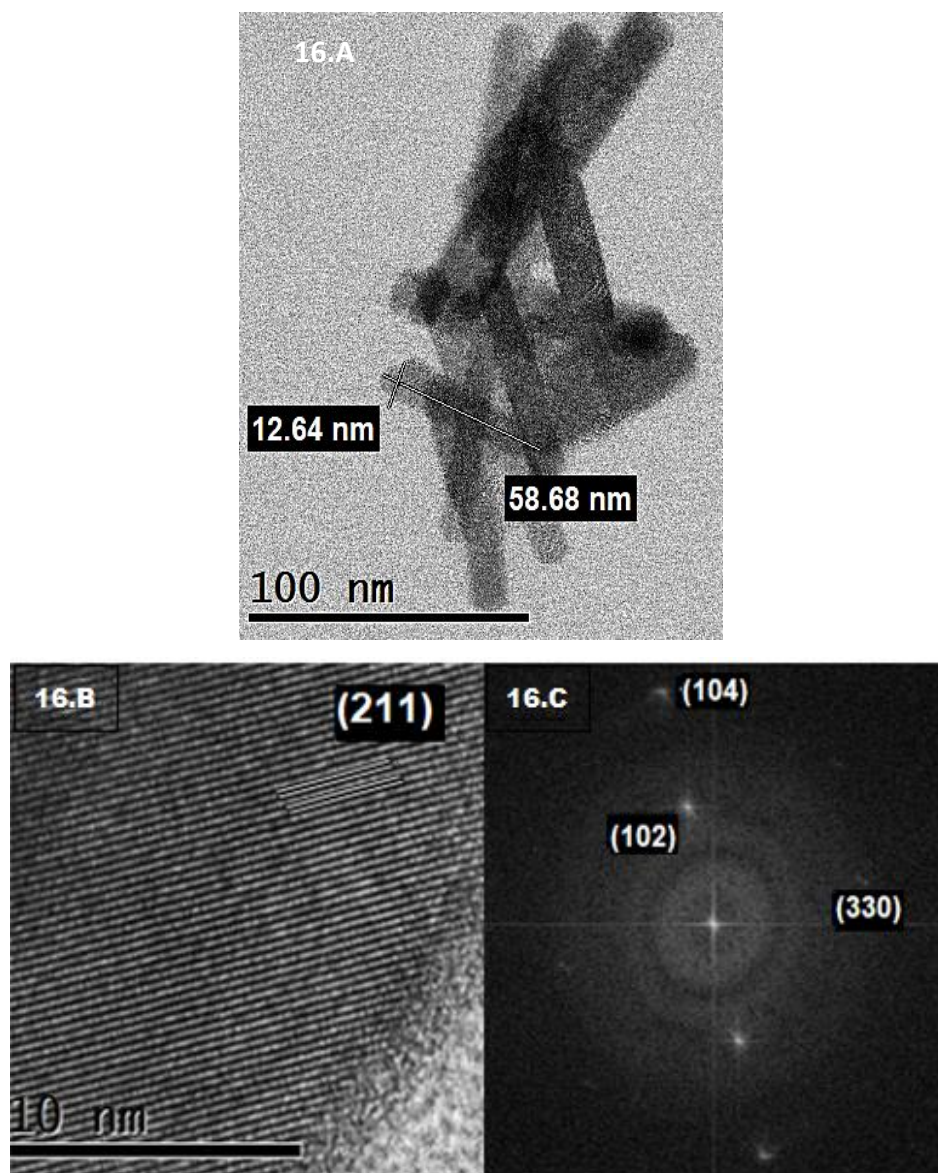


Figura 16. Micrografías de HRTEM representativas de las NPs de CuBi_2O_4 obtenidas después de calentar a 600°C por 2 h

Tabla 7. Distancias interplanares observadas en las micrografías de las NPs de CuBi_2O_4 , así como en sus correspondientes patrones de difracción de electrones

Tamaño de las NPs de CuBi_2O_4	Distancia interplanar (Å) y plano correspondiente (micrografía)	Distancia interplanar (Å) y plano correspondiente, obtenidos del patrón de difracción de electrones
Figura 14.A 21 X 17 nm	5.99 (110)	2.87 (002) , 3.15 (211) , 4.24 (200) , 6.05 (110)
Figura 14.C 10.3 X 10.3 nm	4.20 (200)	2.09 (222) , 3.15 (211) , 4.22 (200)
Figura 15.A 58 nm	3.18 (211)	1.41 (104) , 2.01 (330) , 2.73 (102)

3.3.- Caracterización de las NPs de CuBi_2O_4 por espectroscopías de absorción y emisión electrónica en la región UV-Visible.

Los espectros de absorción electrónica UV-Visible (Figura 17) de los polvos de las NPs de CuBi_2O_4 de tamaño promedio de 50 y 20 nm, fueron obtenidos por la técnica de reflectancia difusa, empleando un espectrofotómetro de fibra óptica *Ocean Optics* USB 2000. Se puede observar una clara diferencia entre ambos espectros, no obstante que los tamaños de las NPs de CuBi_2O_4 obtenidas en este trabajo, presentan un confinamiento electrónico muy débil. La diferencia observada entre los espectros es el resultado de la forma y el tamaño de las nanoestructuras que se favorece en uno u otro caso. En primer lugar, las NPs de menor tamaño forman estructuras mayoritariamente cúbicas, presentando un espectro de absorción que va de 250 a 550 nm. Por otro lado, las NPs de mayor tamaño absorben de 250 a 650 nm, ya que adicionalmente forman estructuras tipo *rod*, lo que se refleja en un espectro de absorción más extendido hacia la región del visible. En dicho espectro no se observan transiciones de tipo d-d debidas a la formación de compuestos moleculares de Cu (II). En el apéndice B se presenta una tabla en donde se resumen

los intervalos de energía en donde absorben los compuestos moleculares de Cu (II), con diferentes geometrías.

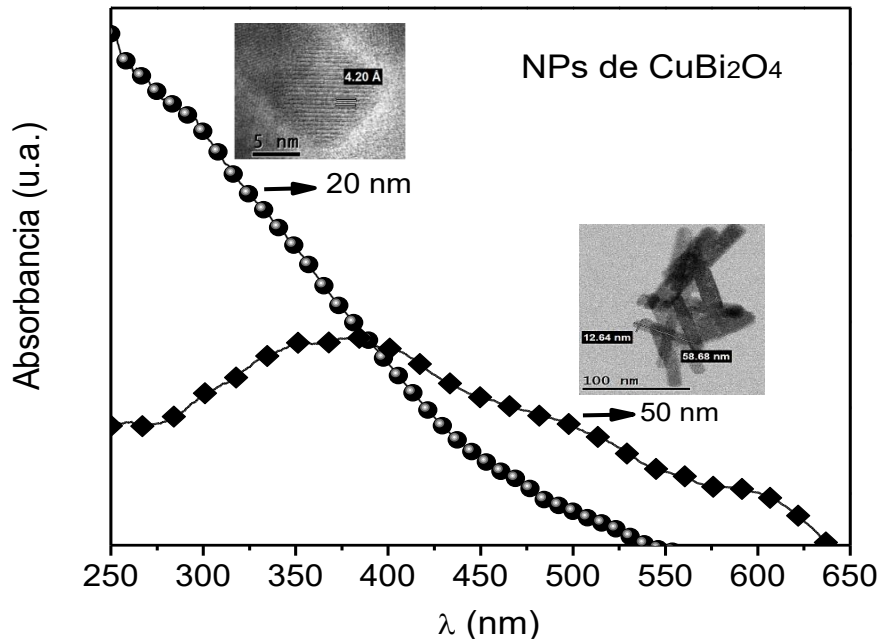


Figura 17. Espectros de absorción electrónica en la región UV-Visible de las NPs de CuBi_2O_4 de 20 y 50 nm

Por otro lado, los espectros de emisión de los polvos formados por las NPs de CuBi_2O_4 fueron colectados en un espectrofluorímetro F7000 Hitachi, empleando una longitud de onda de excitación (λ_{exc}) de 270 nm. En la figura 18 se presentan dichos espectros, se puede observar que ambos presentan un máximo de emisión en 828 nm. A partir de este valor se determinó el *band gap* de las NPs de CuBi_2O_4 obtenidas en este trabajo, mediante la siguiente ecuación 3:

$$E_g = \frac{hc}{\lambda_g} = \frac{(4.13 \times 10^{-15} \text{ eV} \cdot \text{s}) \times (3 \times 10^8 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1})}{(8.28 \times 10^{-7} \text{ m})} \approx 1.50 \text{ eV} \quad (\text{Ecuación 3})$$

En donde:

E_g = energía de brecha prohibida

h = constante de Planck

c = velocidad de la luz

λ_g = longitud de onda asociada a la energía de brecha prohibida

El valor de 1.50 eV corresponde con el *band gap* informado en la literatura para el CuBi_2O_4 másico. La diferencia de intensidades puede estar relacionada con la formación de defectos en la superficie de las NPs. De acuerdo a lo observado, pareciera que las NPs de mayor tamaño poseen una mayor cantidad de defectos. Debido al tamaño de las NPs obtenidas, no se esperaba obtener un valor del *band gap* desplazado hacia el ultravioleta.

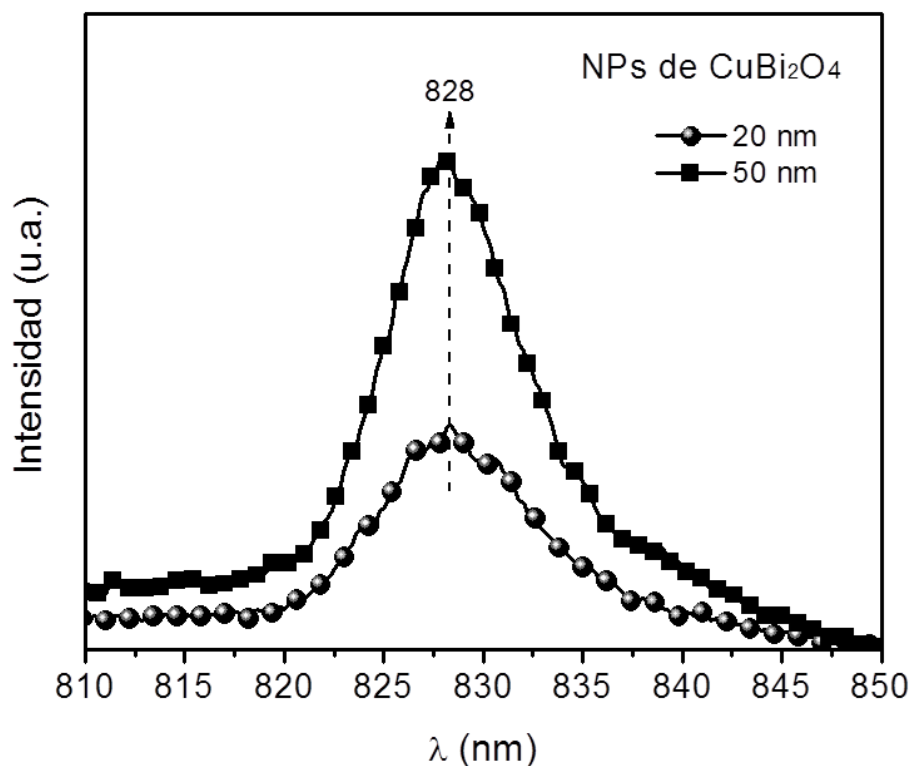


Figura 18. Espectros de fluorescencia de las NPs de CuBi_2O_4 de 20 y 50 nm, obtenidos en polvo empleando una λ_{exc} de 270 nm.

3.4.- Caracterización por espectroscopias Raman e Infrarroja

Las NPs de CuBi_2O_4 fueron caracterizadas por las espectroscopías vibracionales; infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) y de dispersión Raman.

De acuerdo a lo informado en la literatura la representación irreducible de los modos activos en Raman e IR para el CuBi_2O_4 con el grupo espacial $P4/ncc$ es:

$$\Gamma_{\text{opt}} = 5A_{1g}, +5B_{1g}, +4B_{2g} +11E_g +5A_{2u}+10E_{2u}$$

de los cuales, experimentalmente, solo se observan 6 modos activos en Raman, con simetrías: $4A_{1g}, +B_{2g} +E_g$.

Los espectros Raman de las NPs de 50 y 20 nm, se obtuvieron directamente sobre los polvos formados por dichas NPs, empleando un láser de de 532 nm y una potencia de 3.5 mW.

En la figura 19 se presentan los espectros Raman de dichas NPs, se puede observar que no existen diferencias significativas entre los espectros de las NPs más pequeñas, con respecto a las de tamaños mayores. Las 6 señales observadas coinciden con las informadas en la literatura, para este sistema. La banda en 88 cm^{-1} , está asociada con el modo vibracional de flexión en el plano con simetría B_{2g} , del bismuto romboédrico. La siguiente banda localizada en 122 cm^{-1} , con simetría A_{1g} , se asigna a la vibración de traslación del plano de CuO_4 a lo largo del eje Z. La señal que se encuentra en 182 cm^{-1} con simetría E_g , está asociada a la vibración Cu-Cu. Por otro lado, la banda intensa en 255 cm^{-1} con simetría A_{1g} , corresponde a la rotación de dos cuadrados de CuO_4 , apilados en dirección opuesta. La banda que se observa en 392 cm^{-1} es atribuida a la vibración de estiramiento del enlace Bi-O, con simetría A_{1g} y finalmente la señal en 573 cm^{-1} de menor intensidad es asignada a la vibración de tipo “breathing” en el plano de los cuadrados de CuO_4 , con simetría A_{1g} .

Estos valores coinciden con los informados en la literatura para el CuBi_2O_4 con estructura cristalina tetragonal.

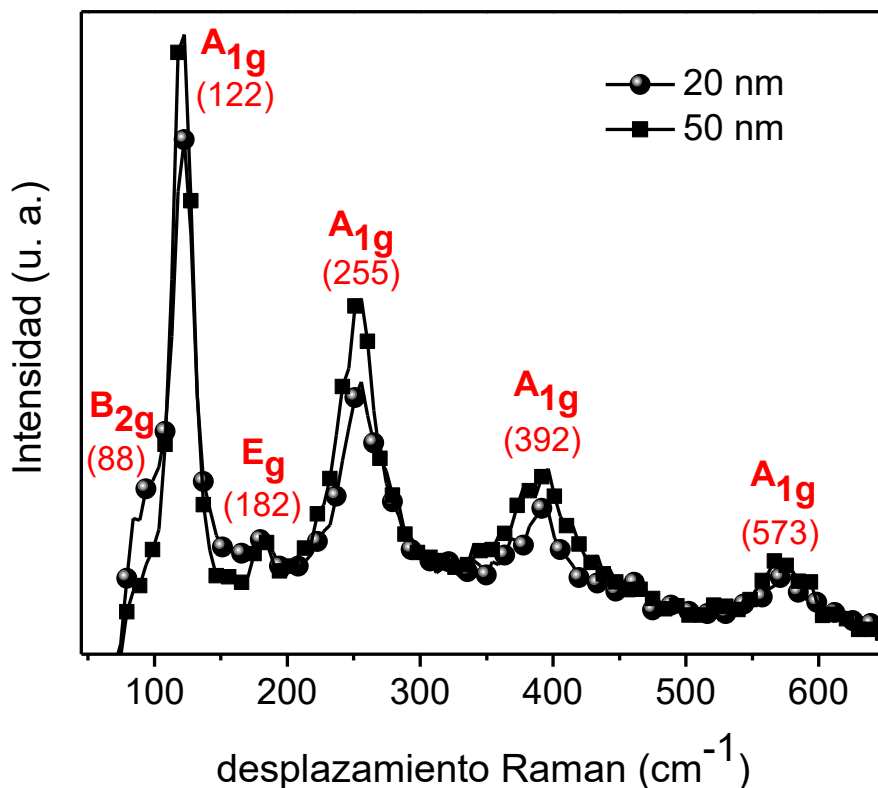


Figura 19. Espectros Raman de las NPs de CuBi_2O_4

Para obtener los correspondientes espectros de IR de las NPs de 20 y 50 nm del óxido de cobre y bismuto, se prepararon pastillas de bromuro de potasio (KBr) en una relación de 1 mg de muestra (CuBi_2O_4) por 99 mg de KBr. En la figura 20, se presenta un espectro de FTIR característico de las NPs sintetizadas en esta tesis, en donde se observan dos señales intensas en 517 y 411 cm^{-1} , asignadas a las vibraciones de estiramiento del enlace Bi-O del octaedro BiO_6 y del enlace Cu-O respectivamente. En este espectro, no se observan señales intensas debido a la absorción de agua.

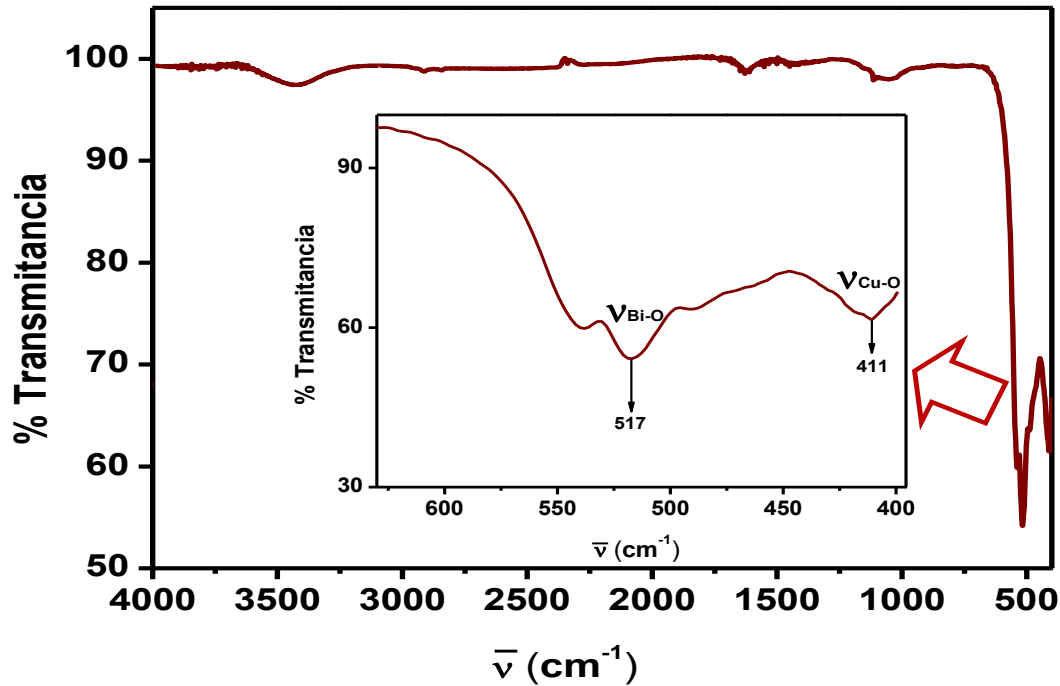


Figura 20. Espectro FTIR de las NPs de CuBi_2O_4 obtenidas en esta tesis.

3.5.- Caracterización por Resonancia Paramagnética Electrónica (RPE)

Los espectros de RPE de las NPs de CuBi_2O_4 se obtuvieron en polvo, a temperatura ambiente en banda X, empleando una frecuencia de 9.8586×10^9 Hertz, una potencia de 0.002 Wats y una ganancia de 50, con un campo centrado en 3350 Gauss. Los espectros RPE de las NPs de 50 y 20 nm del CuBi_2O_4 , se presentan en la figura 21. En dichos espectros solamente se puede ver la contribución del Cu (II), ya que es un catión paramagnético ($3d^9$ con $S= 1/2$) con un spin nuclear ($I= 3/2$). Para ambos espectros el valor calculado de la constante giromagnética (g) es cercano a 2. La constante giromagnética se calculó a partir de la ecuación de resonancia (ecuación 4):

$$h\nu = g\beta H \quad (\text{Ecuación 4})$$

- h = constante de Planck (6.625×10^{-27} erg•s)
- ν = frecuencia de las microondas (Hertz)
- β = magnetón nuclear de Bohr (9.27×10^{-21} erg/G)
- H = campo magnético (Gauss)

Se ha informado en la literatura que la existencia de Cu^{2+} con carga no compensada (monómeros y dímeros de Cu^{2+}) dentro de la estructura de las NPs, presentan espectros RPE de tipo isotrópico, con un valor de g cercano a 2. Dichos cobres con carga no compensada pueden ser el resultado de vacancias de oxígeno (V_o) en las NPs.

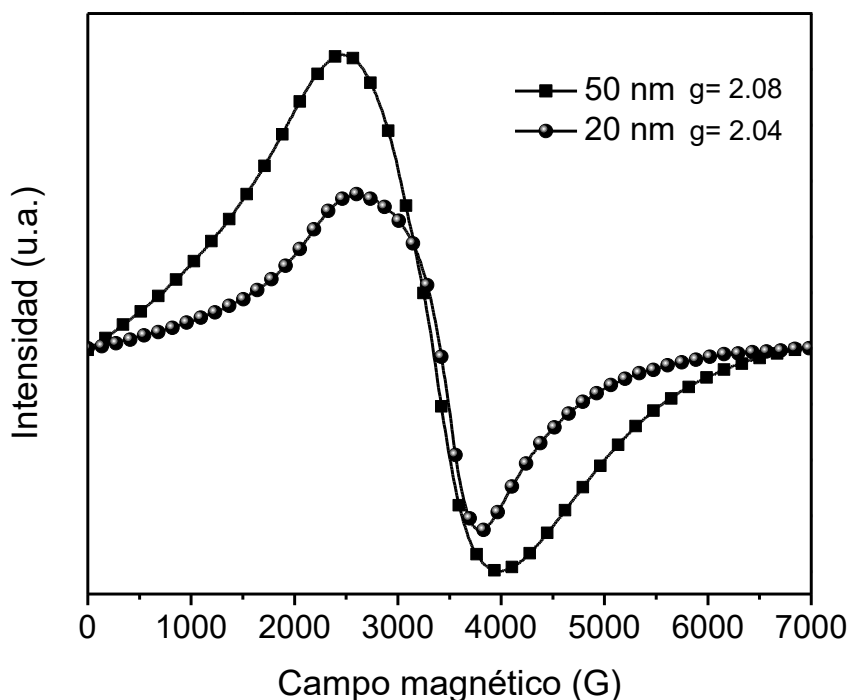


Figura 21. Espectros de RPE de las NPs de CuBi_2O_4 obtenidas en este trabajo

A partir de todos los resultados presentados hasta el momento, podemos decir que obtuvimos de manera satisfactoria, NPs de CuBi_2O_4 como fase única, con diámetros promedio de tamaño de cristalito de 50 y 20 nm.

3.6.- Resultados de las pruebas para la evaluación de la actividad antibacteriana

Los resultados que se presentan a continuación, se obtuvieron en colaboración con la Dra. Argelia Almaguer Flores en el laboratorio de Genética Molecular de la

División de Estudios de Posgrado e Investigación (DEPEI) de la Facultad de Odontología de la UNAM.

Se llevó a cabo un estudio preliminar de la actividad antibacteriana de las NPs de CuBi_2O_4 de 20 nm, por ser las de menor tamaño. En primer lugar, se presentan los resultados obtenidos para *P. aeruginosa*. En la figura 22 se presenta una gráfica de las unidades formadoras de colonias (UFC's) en función de la concentración de las NPs de CuBi_2O_4 de 20 nm. Cuando dicha concentración fue de 50 mg/mL, las UFC's de la bacteria *P. aeruginosa*, presentó un valor promedio de 118 UFC's / mL (+/- 9.28) y de 436 UFC's / mL (+/- 8.04) en una concentración de 25 mg/mL. El análisis de estos resultados indico que las UFC's se redujeron en 89% en las cajas Petri que contenían 50 mg/ mientras que la reducción de las UFC's fue de 57.3% cuando la concentración de NPs fue de 25 mg/ml. En la figura 23 se muestran las fotografías de las cajas Petri correspondientes, donde se aprecia claramente la disminución de las UFC's, cuando la concentración fue de 50 mg de NPs/ mL de medio de cultivo. En el caso de la bacteria *S. aureus* se observó un mejor efecto antibacteriano debido a que no hubo crecimiento de la bacteria para ambas concentraciones 50 y 25 mg de NPs / mL, respectivamente (figuras 23 y 24). En la tabla 8 se presenta el resumen de los resultados anteriores.

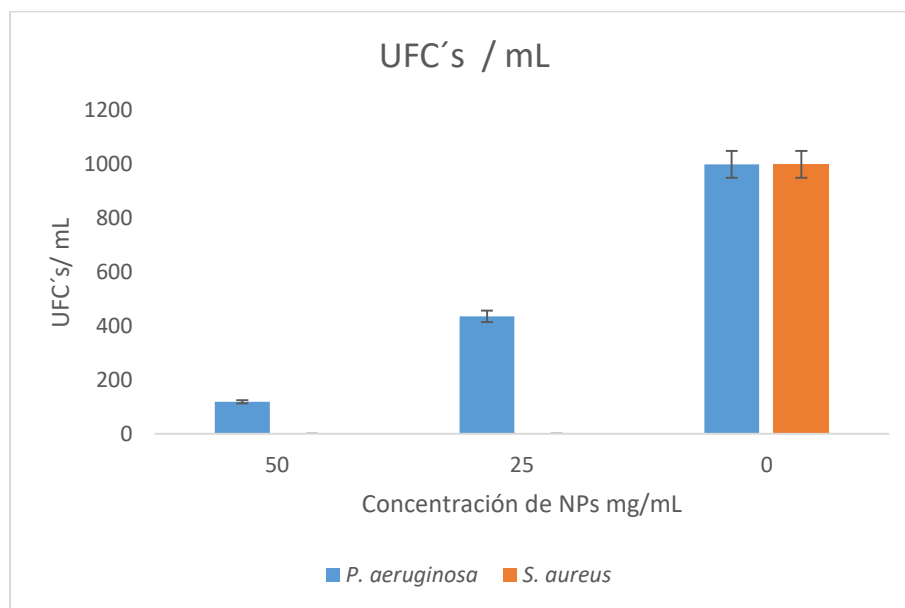


Figura 22. Gráfica del conteo de las UFC's de acuerdo a la concentración de las NPs de CuBi_2O_4 (25 y 50 mg).

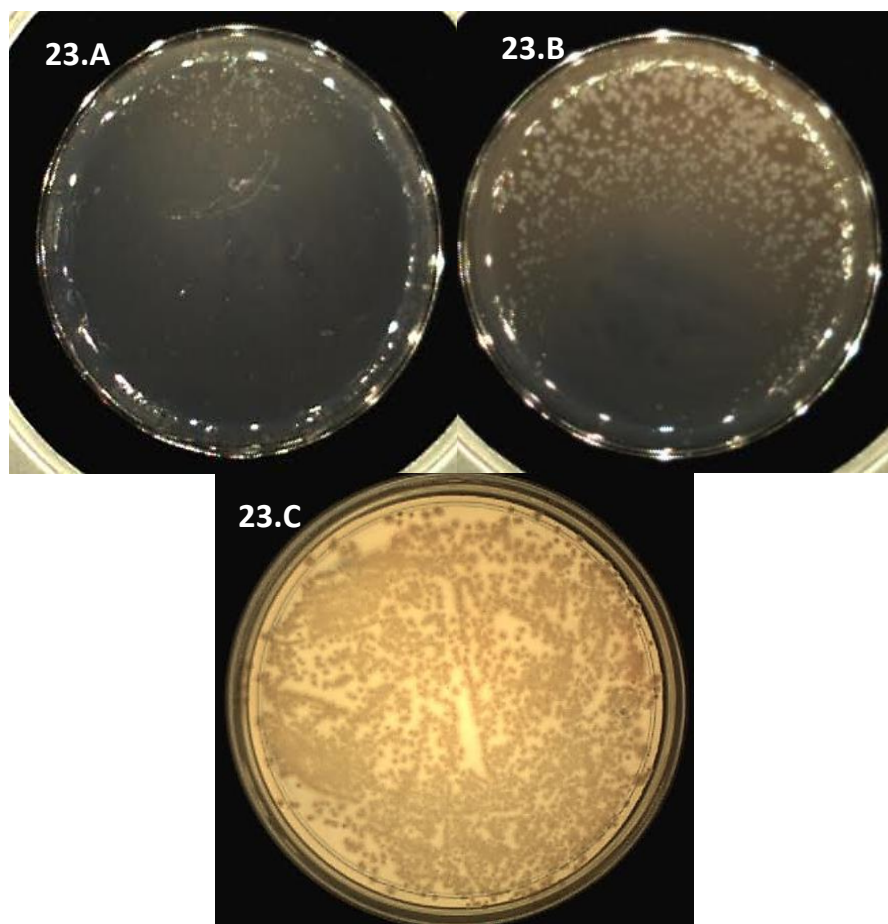


Figura 23. Fotografías de las cajas Petri con la bacteria *P. aeruginosa* y las diferentes concentraciones de NPs. (23.A) 50 mg de NPs /mL (89% de reducción de crecimiento bacteriano), (23.B) 25 mg de NPs/mL (57% de reducción de crecimiento bacteriano) y (23.C) Medio de cultivo sin NPs.

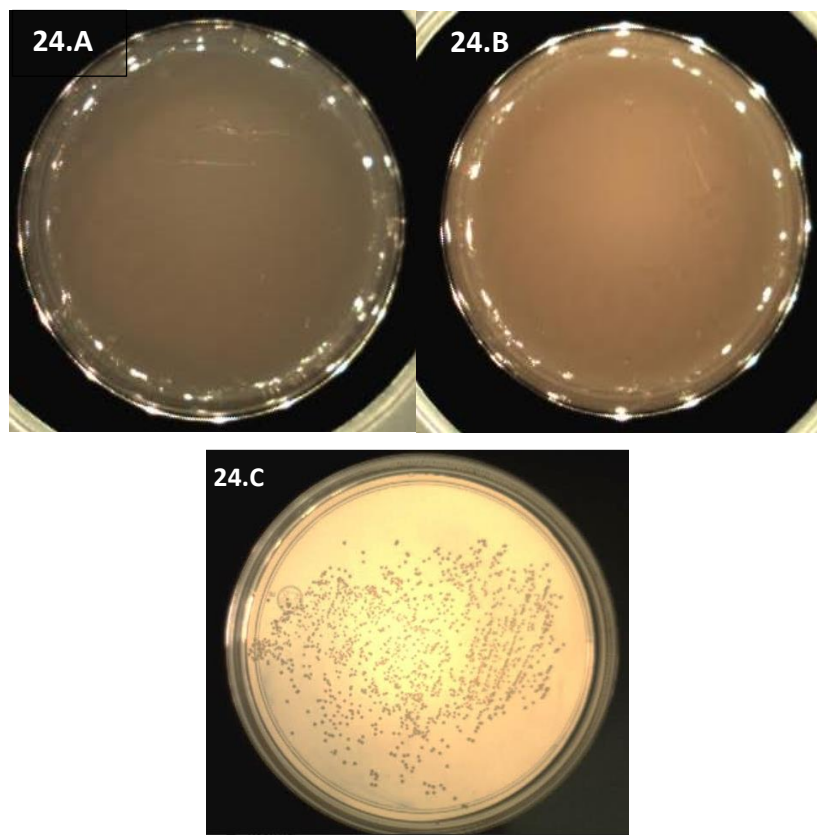


Figura 24. Fotografías de las cajas Petri con la bacteria *S. aureus* y las diferentes concentraciones de NPs. (24.A) 50 mg de NPs /mL (100% de inhibición de crecimiento bacteriano). (24.B) 25 mg de NPs /mL (100% de inhibición de crecimiento bacteriano) y (24.C) medio de cultivo sin NPs.

Tabla 8. Resultados del conteo de las unidades formadoras de colonias

Bacteria	UFC's Inicial	Concentración de las NPs de CuBi_2O_4 (mg/mL)	UFC's/ mL Promedio (% en que se redujo las UFC's)	Desviación estándar
<i>P. aeruginosa</i>	10^3	50	118 (89%)	9.28
		25	436 (57.3%)	8.04
		0	1000	0
<i>S. aureus</i>	10^3	50	(100%)	0
		25	(100%)	0
		0	1000	0

3.7.- Ensayo de actividad metabólica bacteriana por sales de tetrazolio (XTT).

Para determinar la viabilidad bacteriana, se llevó cabo la reducción del XTT. Este ensayo consiste en que el reactivo de XTT contiene una sal de tetrazolio (2,3-bis [2-Metoxi-4-nitro-5- sulfofenil] 2H-tetrazolio-5-carboxianilida, sal interna) y PMS, un reactivo de acoplamiento de electrones (N- metildibenzopyrazine sulfato de metilo), que se combina con XTT para formar una solución estable. La reducción del compuesto de XTT se produce en la superficie celular facilitada por el sistema de transporte de electrones (ETS) que se lleva a cabo gracias a la conversión realizada por NADPH o NADH producidas por las enzimas oxidorreductasas. El PMS media la reducción de XTT al tomar los electrones en la superficie celular, formando un compuesto intermedio que reduce la sal de tetrazolio a formazán. En las bacterias, la respiración puede proporcionar una medida adecuada de la actividad metabólica de células y dar información sobre los efectos de diferentes condiciones sobre la viabilidad celular. Las bacterias con un ETS activo reducen estos colorantes redox a formazán.

En las figuras 25 y 26 se presentan los resultados obtenidos del experimento para medir la viabilidad bacteriana de *P. aeruginosa* y de *S. aureus*, respectivamente, en presencia de las NPs de CuBi_2O_4 (20 nm). Es muy importante considerar que las NPs de CuBi_2O_4 , presentan un espectro de absorción que va de 250 a 550 nm. Por lo tanto, en la medida de absorción a 450 nm, siempre tendremos una contribución de la absorción de las NPs. En consecuencia, se observa que en el pozo de mayor concentración de NPs, la absorción observada a 450 nm pertenece fundamentalmente a las NPs. No obstante, este problema experimental, se puede observar cierta disminución del crecimiento bacteriano, a medida que se incrementa la concentración de NPs y que tienen un mejor efecto antibacteriano que la clorhexidina al 2%, en el caso de *P. aeruginosa*. Sin embargo, al parecer la clorhexidina al 2% presenta un mejor efecto bactericida para *S. aureus*.

La efectividad antibacteriana se determinó a partir de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Efectividad antibacteriana} = \left(\frac{A1-A2}{A1} \right) (100) \quad (\text{Ecuación 5})$$

Donde:

A1 = Absorbancia a 450 nm de los pozos con bacteria en medio de cultivo (control negativo).

A2 = Absorbancia a 450 nm en presencia de bacteria e inhibidor de crecimiento; Clorexidina a 2% (control positivo) o NPs de CuBi_2O_4

Los resultados obtenidos se presentan en las figuras 25 y 26, en donde se puede observar que para *P. aeruginosa* se tiene un % de efectividad antibacteriana que va de 86% a 56%, para las concentraciones de 25 mg y 0.78mg de NPs de CuBi_2O_4 /mL de medio de cultivo, respectivamente. Para esas mismas concentraciones, en el caso de *S. aureus*, el % de efectividad es del 100% al 65%, respectivamente.

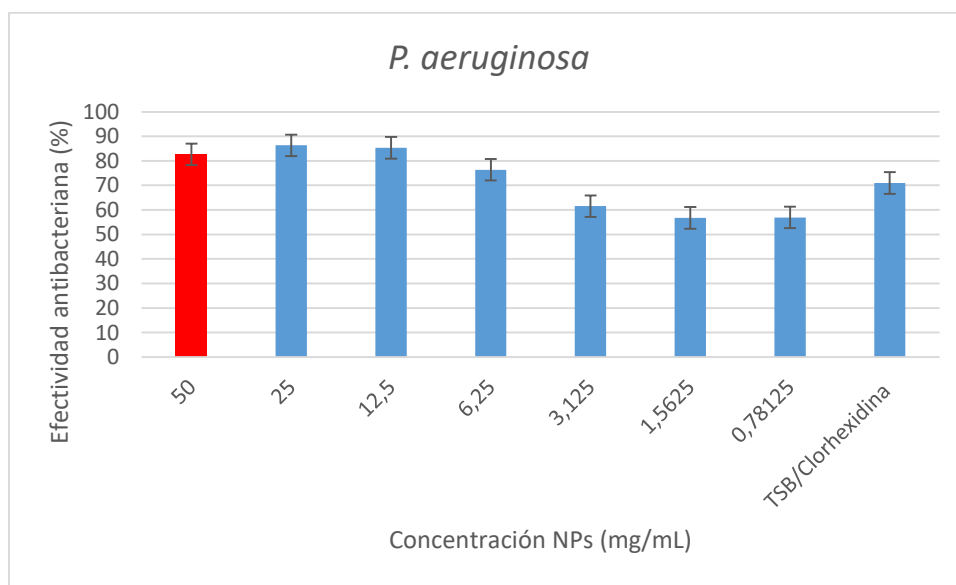


Figura 25. Gráfica del porcentaje de efectividad antibacteriana de las NPs de CuBi_2O_4 para *P. aeruginosa*

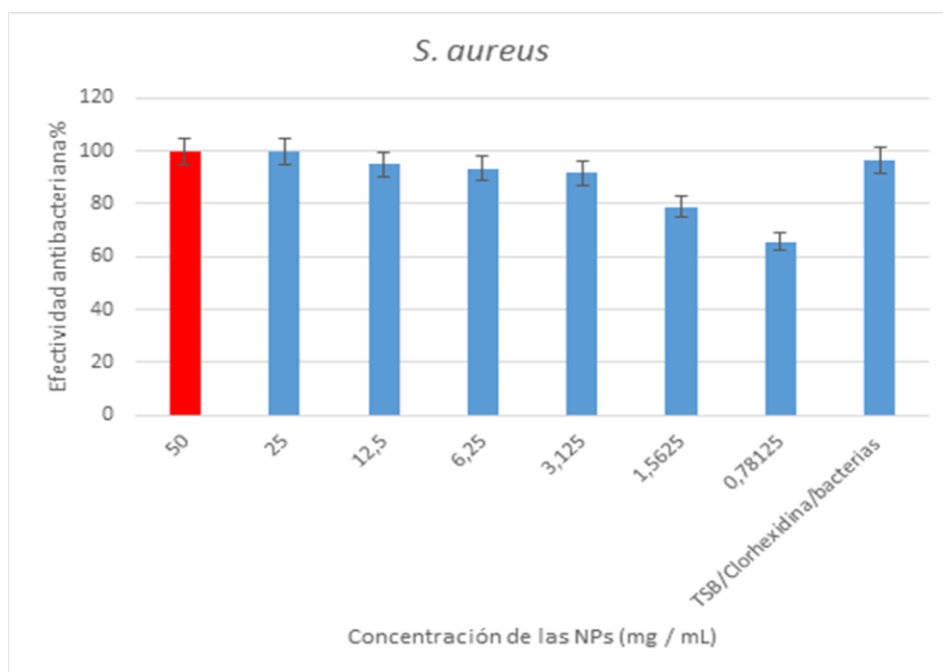


Figura 26. Gráfica del porcentaje de efectividad bacteriana de las NPs de CuBi₂O₄ para *S. aureus*.

Como se mencionó previamente, una de las motivaciones de este trabajo de tesis fue evaluar la actividad antibacteriana que pudieran presentar las NPs de CuBi₂O₄, esperando observar una actividad sinérgica entre el CuO y el Bi₂O₃, ya que se ha informado que éstos presentan actividad antibacteriana frente a varias cepas Gram positivas y Gram negativas (ver tabla 1 de esta tesis).

Sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos podemos decir que dicha sinergia no fue observada, ya que en la literatura se han informado CMI's de NPs de CuO (23 nm) de 12.5 mg/mL para cepas de *P. aeruginosa*, y de 6.25 mg/mL para cepas de *S. aureus*. Por otro lado, NPs de Bi₂O₃ (15-30 nm) han presentado CMI's de 2.5 mg/mL para ambas cepas. En nuestro caso, las NPs de CuBi₂O₄ (20 nm) obtenidas en esta tesis presentaron una inhibición máxima del 86% para una concentración de 25 mg/mL para *P. aeruginosa* y del 100% para *S. aureus*, para la misma concentración de NPs. Estos resultados se resumen en la tabla 9.

Tabla 9. Comparación de actividad antibacteriana de NPs de CuO, Bi₂O₃ y CuBi₂O₄ frente a cepas de *P. aeruginosa* y *S. aureus*

Compuesto NPs	Tamaño de NPs (nm)	Concentración de inhibición (mg/mL)	
		<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
CuO [4]	23	12.5	6.25
Bi ₂ O ₃ [6]	15-30	-	1.5
CuBi ₂ O ₄ esta tesis	20	50 (86 % de inhibición)	25 (100% de Inhibición)

Finalmente, podemos sugerir que la actividad antibacteriana observada en las NPs de CuBi₂O₄ obtenidas en este trabajo, se deba predominantemente a la carga de las NPs debido a vacancias de oxígeno (V_o) que genera la formación de centros de Cu²⁺ con cargas no compensadas (monómeros y dímeros), lo que favorecería la interacción de las NPs de CuBi₂O₄ con la membrana celular bacteriana, con carga negativa. Sin embargo, es solo uno de los mecanismos posibles de acción que pudiera favorecer la actividad antibacteriana de las NPs estudiadas en este trabajo.

4.- Conclusiones

Se sintetizaron de manera satisfactoria NPs de óxido de cobre bismuto CuBi_2O_4 como fase única y con tamaños de cristalito promedio de 20 a 50 nanómetros, cuando se partió de: 5×10^{-4} moles de la sal de cobre (acetatos ó cloruros), 1×10^{-3} moles de la sal de bismuto y 4×10^{-3} moles de sosa.

Todas las técnicas espectroscópicas, microscopia electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM) y difracción de rayos X (XRD), (corroboran la pureza de la fase).

Cuando se incrementó la concentración de los reactivos de partida, el equilibrio químico se desplazó hacia la formación de los óxidos más estables de cobre (CuO) y bismuto (Bi_2O_3), en adición a las NPs de CuBi_2O_4 .

El método de síntesis empleado en este trabajo resultó ser un método sencillo, reproducible, de bajo costo y amigable con el medio ambiente. Además, si se compara con otros métodos de obtención de NPs que requieren de 10 a 24 h y un gran consumo energético, la mecano-síntesis es un método relativamente rápido ya que en un lapso de 1 a 4 h se pueden obtener diversas nanoestructuras.

En cuanto a la evaluación de la actividad antibacteriana de las NPs de CuBi_2O_4 , se encontró que la metodología que se emplea normalmente para evaluar sistemas solubles en agua, no son los más adecuados para NPs de óxidos metálicos. Esto se debe, por un lado, a la pobre difusión de dichas NPs hacia el medio de cultivo (antibiogramas) y, por otro lado, los espectros de absorción de las NPs (de 250 a 550 nm) influyen drásticamente en la respuesta óptica observada en 450 nm (prueba de viabilidad bacteriana).

Sin embargo, a pesar de las dificultades experimentales podemos sugerir que existe un efecto bactericida de las NPs de CuBi_2O_4 moderado para las cepas estudiadas,

ya que el porcentaje de efectividad antibacteriana para *P. aeruginosa* va de 86% a 56% y para *S. aureus* de 100% a 65%.

El efecto antibacteriano de las NPs de CuBi_2O_4 se observó para ambas bacterias *P. aeruginosa* y *S. aureus*. Y uno de los mecanismos propuestos por el cual se pudo observar este efecto es debido a la descompensación de las cargas generadas por las vacancias de oxígeno en la red cristalina del óxido y esto podría favorecer la interacción de las cargas negativas de la membrana celular con las cargas positivas de las NPs y eso favorece a la actividad antibacteriana.

5.- Bibliografía.

- 1) Zanella, R. (2012). Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencia y Nanotecnología*, 5(1).
- 2) Berglund, S. P., Abdi, F. F., Bogdanoff, P., Chemseddine, A., Friedrich, D., & van de Krol, R. (2016). Comprehensive evaluation of CuBi_2O_4 as a photocathode material for photoelectrochemical water splitting. *Chemistry of Materials*, 28(12), 4231-4242.
- 3) Henmi, C. (1995). Kusachiite, CuBi_2O_4 , a new mineral from Fuka, Okayama Prefecture, Japan. *Mineralogical Magazine*, 59(3), 545-548
- 4) Ahamed, M., Alhadlaq, H. A., Khan, M. A., Karupiah, P., & Al-Dhabi, N. A. (2014). Synthesis, characterization, and antimicrobial activity of copper oxide nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*, 2014, 17.
- 5) Hou, J., Wang, X., Hayat, T., & Wang, X. (2017). Ecotoxicological effects and mechanism of CuO nanoparticles to individual organisms. *Environmental Pollution*, 221, 209-217.
- 6) Sonkusare, V. N., Chaudhary, R. G., Bhusari, G. S., Rai, A. R., & Juneja, H. D. (2018). Microwave-mediated synthesis, photocatalytic degradation and antibacterial activity of $\alpha\text{-Bi}_2\text{O}_3$ microflowers/novel $\gamma\text{-Bi}_2\text{O}_3$ microspindles. *Nano-Structures & Nano-Objects*, 13, 121-131.
- 7) Ding, L. L., Zhao, Q., Zhu, J. L., Fan, Z. J., & Liu, B. (2016, March). The Preparation and Property Research of Bismuth Oxide Nanospheres. In *International Conference on Materials Chemistry and Environmental Protection 2015*. Atlantis Press.
- 8) Zhu, L., Basnet, P., Larson, S. R., Jones, L. P., Howe, J. Y., Tripp, R. A., & Zhao, Y. (2016). Visible Light-Induced Photoelectrochemical and Antimicrobial Properties of Hierarchical CuBi_2O_4 by Facile Hydrothermal Synthesis. *ChemistrySelect*, 1(8), 1518-1524
- 9) Wing, C. E. G. (2006). Las NANOPARTÍCULAS: pequeñas estructuras con gran potencial. *El Inin Hoy, Contacto Nuclear*, 24-29

- 10) Ávalos, A., Haza, A. I., Mateo, D., & Morales, P. (2013). Nanopartículas de plata: Aplicaciones y riesgos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 7(2), 1-24.
- 11) Garcia-Martinez, J., Abellán Sáez, G., Carrillo Gómez, A. I., & Linares Pérez, N. (2006). *Nanomateriales para aplicaciones avanzadas*.
- 12) Gersten, B. (2005). Solvothermal synthesis of nanoparticles. *Chemfiles*, 5, 11-12.
- 13) Pierre, A. C. (2013). *Introduction to sol-gel processing (Vol. 1)*. Springer Science & Business Media.
- 14) James, S. L., Adams, C. J., Bolm, C., Braga, D., Collier, P., Friščić, T., ... & Krebs, A. (2012). Mechanochemistry: opportunities for new and cleaner synthesis. *Chemical Society Reviews*, 41(1), 413-447.
- 15) Baláž, P., Achimovičová, M., Baláž, M., Billik, P., Cherkezova-Zheleva, Z., Criado, J. M., ... & Kumar, R. (2013). Hallmarks of mechanochemistry: from nanoparticles to technology. *Chemical Society Reviews*, 42(18), 7571-7637
- 16) Baláž, P. (2008). Mechanochemistry and nanoscience. In *Mechanochemistry in Nanoscience and Minerals Engineering* (pp. 1-102). Springer, Berlin, Heidelberg.
- 17) Rodríguez, V. A. P. Mecano Síntesis. *Revista de Investigación de Física*, 1(01).
- 18) Wang, F., Yang, H., Zhang, Y., & Li, R. (2017). Electrochemical performance of CuBi₂O₄ nanoparticles synthesized via a polyacrylamide gel route. *International Journal of Materials Research*, 108(4), 298-307.
- 19) Chen, M., Yang, Q., Li, L., Liu, M., Xiao, P., & Zhang, M. (2016). Solid-state synthesis of CuBi₂O₄/MWCNT composites with enhanced photocatalytic activity under visible light irradiation. *Materials Letters*, 171, 255-258.
- 20) Zhang, J., Jiang, Y., Gao, W., & Hao, H. (2015). Synthesis and visible photocatalytic activity of new photocatalyst MBi₂O₄ (M= Cu, Zn). *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 26(3), 1866-1873.

- 21) Xie, Y., Zhang, Y., Yang, G., Liu, C., & Wang, J. (2013). Hydrothermal synthesis of CuBi₂O₄ nanosheets and their photocatalytic behavior under visible light irradiation. *Materials Letters*, 107, 291-294.
- 22) Soleimani, F., Salehi, M., & Gholizadeh, A. (2017). Hydrothermal Synthesis, Structural and Catalytic Studies of CuBi.
- 23) Abdulkarem, A. M., Li, J., Aref, A. A., Ren, L., Elssfah, E. M., Wang, H., ... & Yu, Y. (2011). CuBi₂O₄ single crystal nanorods prepared by hydrothermal method: growth mechanism and optical properties. *Materials Research Bulletin*, 46(9), 1443-1450.
- 24) Soberón, G. (2007). *Pseudomonas aeruginosa*. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- 25) Zakaria, Z., Sreenivasan, S., & MOHAMAD, M. (2007). Antimicrobial Activity of Piper ribesoides Root Extract Against Staphylococcus aureus. *Journal of Applied Biological Sciences*, 1(3).
- 26) Vázquez Olmos, A. R., Vega Jiménez, A. L., & Paz Díaz, B. (2018). Mecanosíntesis y efecto antimicrobiano de óxidos metálicos nanoestructurados. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencia y Nanotecnología*, 11(21), 29-44.
- 27) Mexicana, N. O. (1994). NOM-092-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. *Diario Oficial de la Federación*, 12(6)
- 28) Hathaway, B. J. (1972). The correlation of the electronic properties and stereochemistry of mononuclear {CuN 4–6} chromophores. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, (12), 1196-1199.
- 29) Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A., & Mietzner, T. A. (2014). *Microbiología Médica de Jawetz, Melnick & Adelberg-26*. AMGH Editora.
- 30) Villafañe, H. H. M. (2008). *Microbiología básica para el área de la salud y afines. 2*. Universidad de Antioquia.

Apéndice A

ICDD 01-079-1810 del CuBi₂O₄

01-079-1810

Aug 14, 2017 5:28 PM (ma)

Status Alternate QM: Star Pressure/Temperature: Temperature (Non-ambient) Chemical Formula: Bi₂ Cu O₄
 Empirical Formula: Bi₂ Cu O₄ Weight %: Bi76.62 Cu11.65 O11.73 Atomic %: Bi28.57 Cu14.29 O57.14
 ANX: AB2X₄ Compound Name: Bismuth Copper Oxide Common Name: dibismuth copper oxide

Radiation: CuK α : 1.5406Å d-Spacing: Calculated Intensity: Calculated I/c: 15.79

SYS: Tetragonal SPGR: P4/ncc (130)

Author's Cell [AuthCell a: 8.4875(1)Å AuthCell c: 5.7901(1)Å AuthCell Vol: 417.11Å³ AuthCell Z: 4.00
 AuthCell MoVol: 104.28] Author's Cell Axial Ratio [c/a: 0.682]
 Density [Dcalc: 8.687g/cm³ Dstruc: 8.69g/cm³] SS/FOM: F(30) = 999.9(0.0000, 31)
 Temp: 27.000K (Author provided temperature) R-factor: 0.01

Space Group: P4/ncc (130) Molecular Weight: 545.50
 Crystal Data [XtlCell a: 8.488Å XtlCell b: 8.488Å XtlCell c: 5.790Å XtlCell : 90.00° XtlCell : 90.00°
 XtlCell : 90.00° XtlCell Vol: 417.11Å³ XtlCell Z: 4.00]
 Crystal Data Axial Ratio [c/a: 0.682 a/b: 1.000 c/b: 0.682]
 Reduced Cell [RedCell a: 5.790Å RedCell b: 8.488Å RedCell c: 8.488Å RedCell : 90.00°
 RedCell : 90.00° RedCell : 90.00° RedCell Vol: 417.11Å³]

Crystal (Symmetry Allowed): Centrosymmetric

Pearson: tP28.00 Subfile(s): ICSD Pattern, Alternate Pattern, Inorganic, Superconducting Material, Common Phase
 Entry Date: 07/27/2010 Last Modification Date: 01/17/2013

References:

Type	DOI	Reference
Primary Reference		Calculated from ICSD using POWD-12++ (1997).
Structure		*Exchange striction and exchange constants in Bi ₂ Cu O ₄ . Atfield, J.P. J. Phys.: Condens. Matter 1, 7045 (1989).

Database Comments: ANX: AB2X₄. Analysis: Bi₂ Cu O₄. Formula from original source: Bi₂ Cu O₄. ICSD Collection Code: 67018. Structures: Magnetic structure also determined. Temperature of Data Collection: 27 K. Wyckoff Sequence: g f c(P4/NCCZ). Unit Cell Data Source: Powder Diffraction.

d-Spacings (164) - 01-079-1810 (Fixed Slit Intensity) - Cu K1 1.54056Å

2	d(Å)	I	h	k	l	*	2	d(Å)	I	h	k	l	*	2	d(Å)	I	h	k	l	*
14.7481	6.001570	2	1	1	0		65.9850	1.414580	41	6	0	0		89.8950	1.090340	13	6	4	2	
20.9154	4.243750	169	2	0	0		66.3346	1.407970	67m	1	1	4		90.8392	1.081450	1	7	2	2	
28.0863	3.174420	999	2	1	1		66.3346	1.407970	m	4	1	3		92.3065	1.068060	1	6	5	1	
29.7479	3.000780	68	2	2	0		67.6227	1.384250	4	5	2	2		92.5250	1.066110	1	5	2	4	
30.8608	2.895050	131	0	0	2		68.4217	1.370020	17	2	0	4		92.8453	1.063270	1	3	1	5	
32.6541	2.740040	32	1	0	2		69.2000	1.356500	1	6	1	1		93.1101	1.060940	2	8	0	0	
33.3559	2.683980	210	3	1	0		69.4334	1.352510	1m	2	1	4		95.3635	1.041740	1	4	4	4	
34.3638	2.607530	68	1	1	2		69.4334	1.352510	m	4	2	3		95.5670	1.040060	5	7	3	2	
36.8818	2.435080	7	3	1	1		70.0569	1.341990	6	6	2	0		96.0927	1.035760	40	7	4	1	
37.5780	2.391550	149	2	0	2		70.6532	1.332120	1	4	4	2		96.9009	1.029260	3	8	2	0	
39.0995	2.301920	6	2	1	2		72.2000	1.307340	1	6	2	1		97.2618	1.026400	8	5	3	4	
41.3699	2.180680	1	3	2	1		72.4296	1.303760	3	2	2	4		98.4195	1.017400	1	6	5	2	
42.5713	2.121880	18	4	0	0		72.6421	1.300470	19	5	3	2		99.1693	1.011710	16	6	0	4	
43.3950	2.083490	10	2	2	2		73.1887	1.292100	49	5	4	1		99.4938	1.009280	21	4	1	5	
44.7521	2.023410	1	3	0	2		74.3989	1.274050	20m	3	1	4		100.1264	1.004600	1m	6	1	4	
45.2924	2.000520	74	3	3	0		74.3989	1.274050	m	4	3	3		100.1264	1.004600	m	6	4	3	
46.0774	1.968250	83	3	1	2		74.6099	1.270970	36	6	0	2		100.7221	1.000260	10	6	6	0	
46.7985	1.939590	285	4	1	1		75.5862	1.256960	1	6	1	2		101.0476	0.997916	22	7	2	3	
47.8910	1.897860	42	4	2	0		77.3196	1.233050	1	3	2	4		101.2940	0.996154	7	8	0	2	
49.8891	1.826430	7	3	2	2		78.2455	1.220760	35	5	2	3		102.2581	0.989363	1	7	4	2	
50.5692	1.803450	2	4	2	1		78.4922	1.217540	26	6	2	2		103.0176	0.984127	10	6	2	4	
53.1967	1.720400	172	2	1	3		79.4540	1.205200	1	5	4	2		103.7632	0.979082	1	8	3	1	
53.4979	1.711420	41	4	0	2		79.8425	1.200310	2	5	5	0		103.9882	0.977578	1	5	4	4	
54.6635	1.677650	4	4	1	2		80.2062	1.195780	8	4	0	4		105.1731	0.969794	2	8	2	2	
55.1305	1.664540	1	5	1	0		81.1632	1.184080	1	4	1	4		105.9178	0.965017	5m	0	0	6	
55.8123	1.645810	143	3	3	2		81.7549	1.177000	4	6	4	0		105.9178	0.965017	m	7	3	3	
57.5673	1.599740	1	5	1	1		82.1166	1.172730	34	3	3	4		106.9017	0.958839	1	1	0	6	
58.0648	1.587210	4	4	2	2		83.2728	1.159360	1	6	3	2		107.2608	0.956622	1	4	3	5	
58.8884	1.566960	1	3	1	3		84.0184	1.150960	2	4	2	4		107.9155	0.952629	1m	1	1	6	
60.8633	1.520760	89	5	2	1		84.7475	1.142910	28	7	2	1		107.9155	0.952629	m	6	3	4	
61.7793	1.500390	4	4	4	0		85.8749	1.130770	1	6	1	3		108.5315	0.948931	3	8	4	0	
62.1416	1.492510	2	3	2	3		87.0629	1.118370	1	7	0	2		109.1248	0.945422	12	6	6	2	
63.4746	1.464340	5	5	0	2		87.4454	1.114460	8	7	3	0		109.8860	0.940994	3	2	0	6	
63.9011	1.455590	37	5	3	0		88.1241	1.107620	26	2	1	5		110.1268	0.939611	1	8	3	2	
64.2995	1.447530	14	0	0	4		88.7480	1.101440	2	4	3	4		110.5344	0.937288	6	9	1	0	
64.5248	1.443020	19	5	1	2		89.6534	1.092650	27m	5	1	4		111.2607	0.933206	14m	5	2	5	
65.3428	1.426920	3	1	0	4		89.6534	1.092650	m	5	4	3		111.2607	0.933206	m	7	5	2	

© 2017 International Centre for Diffraction Data. All rights reserved.

Page 1 / 2

01-079-1810

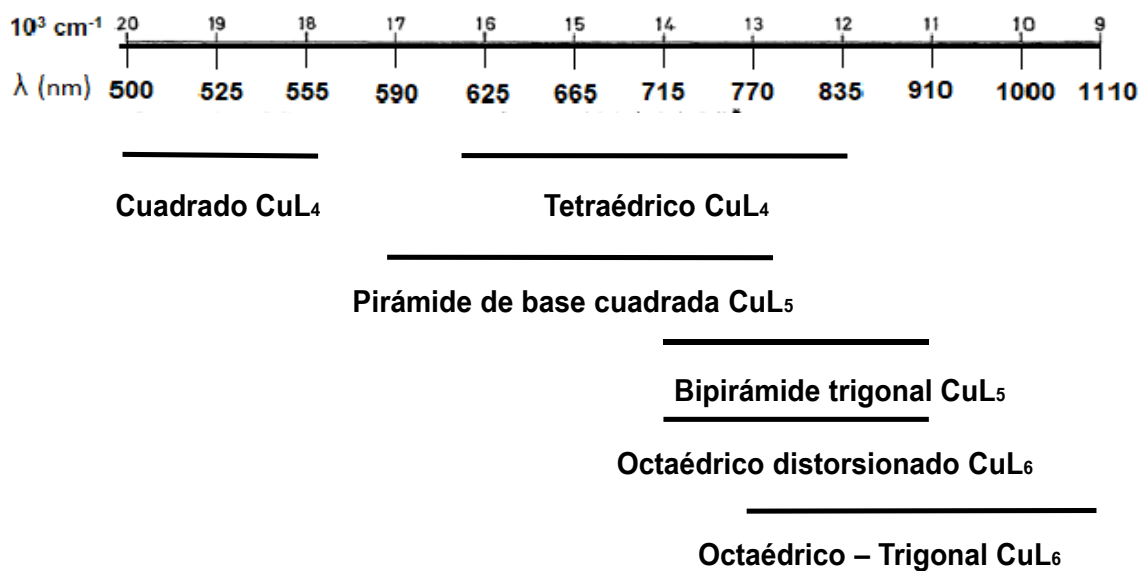
Aug 14, 2017 5:28 PM (ma)

2θ	d(Å)	I	h	k	l	*	2θ	d(Å)	I	h	k	l	*	2θ	d(Å)	I	h	k	l	*	
111.9320	0.929498	1	7	0	4		122.8043	0.877311	1m	6	2	5		135.9518	0.830915	1	9	2	3		
112.9108	0.924200	32m	7	1	4		122.8043	0.877311	m	7	6	2		137.6844	0.825958	1	9	4	2		
112.9108	0.924200	m	7	4	3		124.0757	0.872090	13	5	4	5		138.2552	0.824379	5	9	5	0		
113.9563	0.918681	2	2	2	6		124.8040	0.869175	8m	3	3	6		138.7968	0.822905	10m	5	2	6		
115.0192	0.913215	6m	3	0	6		124.8040	0.869175	m	6	5	4		138.7968	0.822905	m	6	6	4		
115.0192	0.913215	m	6	4	4		127.1365	0.860201	3	4	2	6		139.2849	0.821597	12m	7	2	5		
116.0393	0.908103	8m	3	1	6		127.4208	0.859144	1	8	5	2		139.2849	0.821597	m	7	7	2		
116.0393	0.908103	m	7	2	4		128.3597	0.855709	6	8	0	4		140.2509	0.819064	1	8	3	4		
117.3490	0.901727	1	8	4	2		128.6189	0.854776	24m	6	3	5		141.6878	0.815432	12m	7	5	4		
118.4167	0.896681	1	9	0	2		128.6189	0.854776	m	9	3	2		141.6878	0.815432	m	8	5	3		
118.8523	0.894661	10	9	3	0		129.2909	0.852386	1	9	4	1		142.0798	0.814469	12	10	0	2		
119.4955	0.891718	4m	6	1	5		129.5736	0.851393	1	8	1	4		143.2631	0.811633	1m	4	4	6		
119.4955	0.891718	m	9	1	2		130.3369	0.848750	2	8	6	0		143.2631	0.811633	m	9	3	3		
120.0978	0.889005	11	8	5	1		133.3528	0.838826	2m	4	3	6		143.6430	0.810745	1	10	1	2		
121.4503	0.883061	3m	7	3	4		133.3528	0.838826	m	8	2	4		144.7629	0.808190	11	2	1	7		
121.4503	0.883061	m	8	3	3		134.3588	0.835695	14	10	1	1		146.5464	0.804312	9	5	3	6		
122.5357	0.878436	2m	4	0	6		135.1163	0.833395	1	7	1	5		148.7330	0.799871	1	10	2	2		
122.5357	0.878436	m	7	5	3		135.4935	0.832268	1	10	2	0									

Figura A1 Tarjeta cristalográfica del óxido de cobre bismuto CuBi_2O_4

Apéndice B

Intervalos de energía en donde absorben los compuestos moleculares de Cu (II), con diferentes geometrías. [28]



Apéndice C

Generalidades de las bacterias

Las características distintivas de las procariotas son su tamaño relativamente pequeño, casi siempre del orden de 1 μm de diámetro, y la ausencia de una membrana nuclear. El DNA de casi todas las bacterias es un círculo con una longitud aproximada de 1 mm; este es el cromosoma procariótico.

Tipos de bacterias

A) Eubacterias Gram negativas

Este es un grupo heterogéneo de bacterias con una cubierta celular compleja (tipo Gram negativa) que consta de una membrana externa, un espacio periplásmico que contiene una capa delgada de peptidoglucano y una membrana citoplásmica. La forma de la célula (figura A.2) puede ser esférica, ovalada, como bastón recto o curvo, helicoidal o filamentosa; algunas se encuentran recubiertas o encapsuladas. [29]

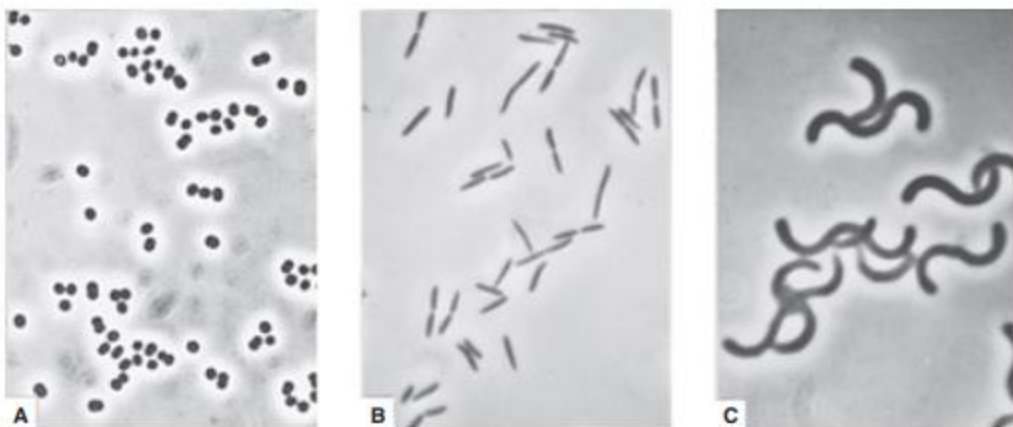


Figura A.2 Formas celulares entre las bacterias verdaderas unicelulares. (A) Cocos. (B) Bastones (bacilos). (C) Espirales. (Contraste de fase, 1500 \times) [29]

B) Eubacterias Gram positivas

En estas bacterias el perfil de la pared celular es similar al del tipo Gram positivo; las células por lo general, pero no siempre, son Gram positivas. La cubierta celular de los organismos Gram positivos consta de una pared gruesa que establece la forma de la célula y una membrana citoplásmica. Estas células pueden ser encapsuladas y tener motilidad por medio de flagelos. Las células son esféricas, bacilares, filamentosas o bastones.

La pared celular es una estructura rígida que le da forma a la bacteria. Se puede decir que ésta limita la célula bacteriana propiamente dicha. Está constituida principalmente, por una sustancia llamada peptidoglicano. La función principal de la pared es proveer a la bacteria de una envoltura mecánicamente fuerte.

C) Archeobacterias

Estos organismos habitan principalmente los ambientes terrestres y acuáticos extremos (concentración elevada de sal, temperaturas elevadas, ambiente anaerobio) y a menudo se les llama “extremófilas”; algunas son simbioses en el tubo digestivo de los animales. Las archeobacterias comprenden organismos aerobios, anaerobios y anaerobios facultativos que son quimiolitótrofos, heterótrofos o heterótrofos facultativos. Las archeobacterias se distinguen de las eubacterias en parte, por la ausencia de una pared celular de peptidoglucano, la posesión de lípidos de isoprenoide diéter o diglicerol tetraéter y las secuencias características de RNA ribosómico. [29].

Manual de Bergey de bacteriología sistemática	
I. Eubacterias gramnegativas con paredes celulares	
Grupo 1: Espiroquetas	<i>Treponema</i> <i>Borrelia</i> <i>Leptospira</i>
Grupo 2: Bacterias aerobias/microaerófilas, móviles helicoidales/vibroides gramnegativos	<i>Campylobacter</i> <i>Helicobacter</i> <i>Spirillum</i>
Grupo 3: Bacterias curvas inmóviles (o rara vez móviles)	Ninguna
Grupo 4: Bacilos y cocos gramnegativos aerobios/microaerófilos	<i>Alcaligenes</i> <i>Bordetella</i> <i>Brucella</i> <i>Francisella</i> <i>Legionella</i> <i>Moraxella</i> <i>Neisseria</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Rochalimaea</i> <i>Bacteroides</i> (algunas especies) <i>Escherichia</i> (y bacterias coliformes afines) <i>Klebsiella</i>
Grupo 5: Bacilos gramnegativos anaerobios facultativos	<i>Proteus</i> <i>Providencia</i> <i>Salmonella</i> <i>Shigella</i> <i>Yersinia</i> <i>Vibrio</i> <i>Haemophilus</i> <i>Pasteurella</i> <i>Bacteroides</i> <i>Fusobacterium</i> <i>Prevotella</i>
Grupo 6: Bacilos gramnegativos, anaerobios, rectos, curvos y helicoidales	Ninguna
Grupo 7: Bacterias desasimiladoras de sulfato o reductoras de azufre	Ninguna
Grupo 8: Cocos gramnegativos anaerobios	Ninguna
Grupo 9: Rickettsias y clamidias	<i>Rickettsia</i> <i>Coxiella</i> <i>Chlamydia</i>
Grupo 10: Bacterias fotótrofas anoxígenas	Ninguna
Grupo 11: Bacterias fotótrofas oxígenas	Ninguna
Grupo 12: Bacterias aerobias quimiolitótrofas y microorganismos variados	Ninguna
Grupo 13: Bacterias con apéndice o yemas	Ninguna
Grupo 14: Bacterias envainadas	Ninguna
Grupo 15: Bacterias deslizantes no fotosintéticas y no formadoras de grupos fructíferos	<i>Capnocytophaga</i>
Grupo 16: Bacterias deslizantes formadoras de grupos fructíferos: mixobacterias	Ninguna
II. Bacterias grampositivas con pared celular	
Grupo 17: Cocos grampositivos	<i>Enterococcus</i> <i>Peptostreptococcus</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Streptococcus</i>
Grupo 18: Bacilos y cocos grampositivos formadores de endosporas	<i>Bacillus</i> <i>Clostridium</i>
Grupo 19: Bacilos grampositivos regulares no formadores de esporas	<i>Erysipelothrix</i> <i>Listeria</i>
Grupo 20: Bacilos grampositivos irregulares no formadores de esporas	<i>Actinomyces</i> <i>Corynebacterium</i> <i>Mobiluncus</i>
Grupo 21: Micobacterias	<i>Mycobacterium</i>
Grupo 22-29: Actinomicetos	<i>Nocardia</i> <i>Streptomyces</i> <i>Rhodococcus</i>
III. Eubacterias sin pared celular: Micoplasmas o Mollicutes	
Grupo 30: Micoplasmas	<i>Mycoplasma</i> <i>Ureoplasma</i>
IV. Archeobacterias	
Grupo 31: Metanógenos	Ninguna
Grupo 32: Arqueorreductores de sulfato	Ninguna
Grupo 33: Archeobacterias excesivamente halófilas	Ninguna
Grupo 34: Archeobacterias sin pared celular	Ninguna
Grupo 35: Metabolizadores excesivamente termófilos y metabolizadores de azufre excesivamente termófilos	Ninguna

Figura A.3. Categorías principales y grupos de bacterias patógenas en seres humanos como parte de un esquema de identificación descrito en el *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed. [29]

Entre las bacterias, la pared celular varía en su complejidad arquitectónica. Esta diferencia sirve de base para dividir las en 2 grandes grupos: Las bacterias **Gram positivas** y las **Gram negativas**. Esta división se basa en el hecho de que, por diferencias en la estructura y la composición de la pared celular, las bacterias se tiñen de diferente color cuando se utiliza una técnica de tinción desarrollada por Christian Gram en 1884.

La tinción diferencial de Gram consiste, básicamente, en teñir el frotis, fijado al calor, con un colorante llamado cristal violeta, y después de lavado con agua, tratarlo sucesivamente con una solución de lugol (yodo más yoduro de potasio), un agente decolorante como el alcohol o una mezcla de alcohol y acetona y, por último, con un colorante de contraste como la safranina. Las bacterias Gram positivas retienen el cristal violeta, por lo tanto, se ven de un color violeta intenso; mientras que las Gram negativas, que pierden color el violeta con el agente decolorante, toman un color rojo claro a rosa, al teñirse con la safranina.

La pared celular de las bacterias Gram negativas es más delgada que la de las Gram positivas, y contiene además del peptidoglicano, una capa externa con un porcentaje alto de lípidos (Figura A2). [30]

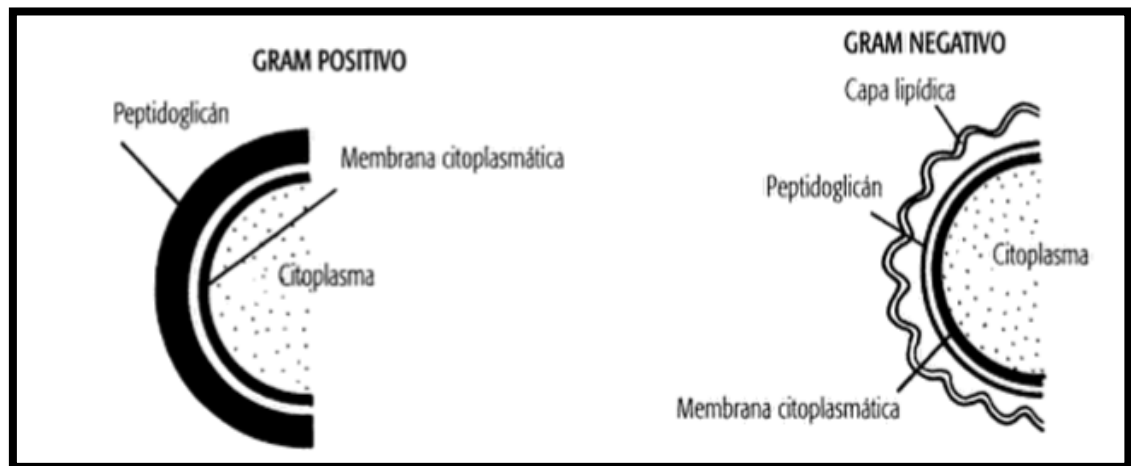
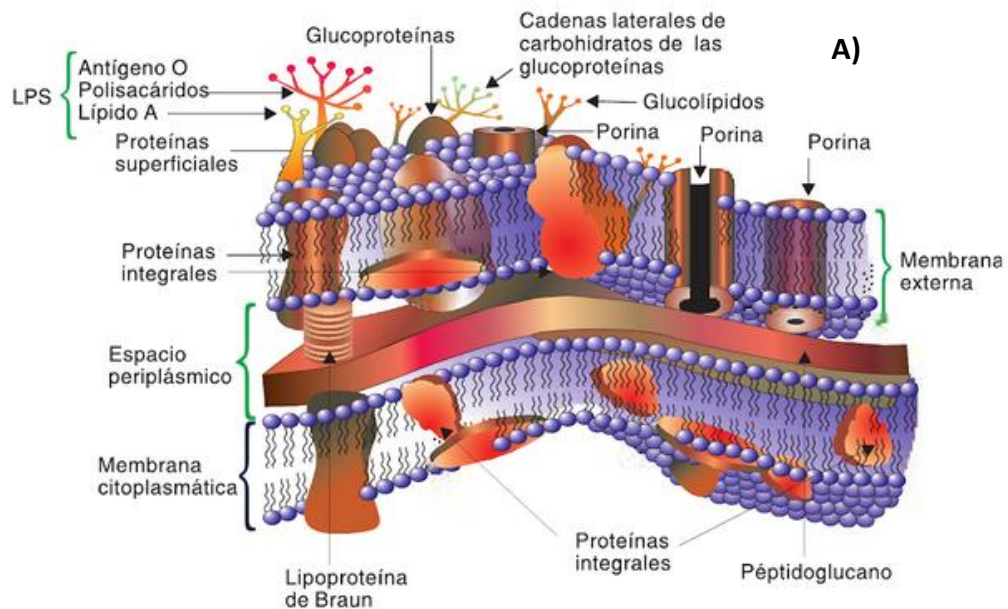


Figura A2. Esquema comparativo de las paredes celulares de bacterias Gram positivas y Gram negativas. [30]

Las bacterias Gram positivas y negativas no sólo se diferencian por esta característica. Existen, además, otras diferencias tanto bioquímicas como morfológicas. Por ejemplo, todas las bacterias con flagelos polares son Gram negativas, y las bacterias Gram positivas son más sensibles a los antibióticos que las Gram negativas.

En la figura A3 se observan modelos tridimensionales de las bacterias (a) Gram negativa, que consta de una membrana densa externa, un periplasma o espacio periplásmico, una capa intermedia compuesta por peptidoglicano y una membrana citoplasmática subyacente. (b) Gram positiva, que consta de una capa gruesa de peptidoglicano y una membrana citoplasmática subyacente. Obsérvese que en este tipo de bacterias no existe el periplasma. [30]



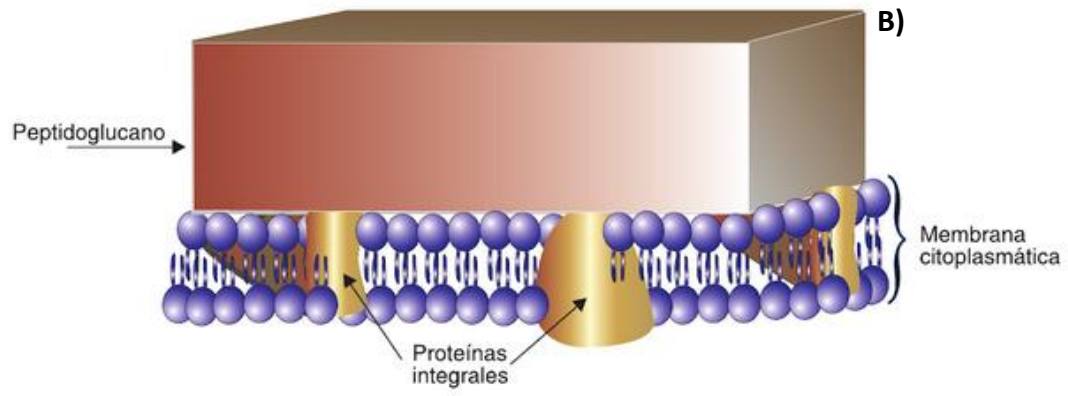


Figura A3. Modelo tridimensional de la “envoltura o cubierta” de una bacteria A) Gram negativa y una B) Gram positiva. [30]

Trabajos presentados en Congresos

- 1) América R Vázquez-Olmos, Alejandro Rubiales-Martínez, Ana Leticia Fernández-Osorio, Roberto Y. Sato-Berrú. “Mecanosíntesis y caracterización de nanopartículas de CuBi_2O_4 ”.
Evento Académico QuimiUNAM 2018, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), CDMX.
7 de agosto 2018.

- 2) América R Vázquez-Olmos, Alejandro Rubiales-Martínez, Ana Leticia Fernández-Osorio, Roberto Y. Sato-Berrú. “Mecanosíntesis de nanopartículas de CuBi_2O_4 ”.
Simposio Internacional en Ciencia de Materiales y Equidad de Género. Instituto de Ciencias Físicas-Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad S/N. Colonia Chamilpa, Cuernavaca Morelos México.
7-8 de marzo de 2019

- 3) Rubiales Martínez Alejandro, Vázquez Olmos América, Almaguer Flores Argelia, Sato Berrú Roberto, Fernández Osorio Ana Leticia. “Obtención de nanopartículas de CuBi_2O_4 ”.
IX Encuentro de Química Inorgánica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Orizaba, Veracruz.
25- 28 de junio de 2019



Obtención de nanopartículas de CuBi_2O_4

Rubiales Martínez Alejandro ¹, Vázquez Olmos, América ¹; Almaguer Flores, Argelia ²,
Sato Berrú, Roberto ¹; Fernández Osorio, Ana Leticia ³

¹ Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, (ICAT, Universidad Nacional Autónoma de México)

² Laboratorio de Genética Molecular. (División de Estudios de Posgrado e Investigación de la
Facultad de

Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México)

³ Facultad de Estudios Superiores Cuatitlán, (FES-C, Universidad Nacional Autónoma de México)

alex91hirdck@gmail.com

1. Introducción

En este trabajo se presenta la obtención, caracterización y evaluación de las propiedades antibacterianas de nanopartículas (NPs) de óxido de cobre y bismuto (CuBi_2O_4) con diámetro promedio de cristalito de 50 y 20 nm, obtenidas por mecano-síntesis. La mecano-síntesis es una técnica basada generalmente en reacciones en estado sólido, lo que significa que los procesos involucrados en la evolución de la microestructura ocurren sin salir de la fase sólida. Por lo tanto, no requieren pasar por los puntos de fusión de los elementos participantes en la reacción. En términos prácticos, esto puede significar una reducción de costos frente a otros procedimientos comúnmente empleados en la obtención de nanoestructuras.

Las NPs de CuBi_2O_4 fueron caracterizadas por difracción de rayos-X en polvo, microscopía electrónica de transmisión de alta resolución, espectroscopías de absorción y emisión electrónica en la región del UV-Visible, FTIR, espectroscopia Raman, y Resonancia Paramagnética Electrónica. Finalmente, se llevó a cabo un estudio preliminar de la actividad antimicrobiana de las NPs de CuBi_2O_4 obtenidas, frente a cepas de bacterias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) y Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*).

El óxido de cobre y bismuto (CuBi_2O_4) es de color negro con brillo metálico, se presenta en la naturaleza como el mineral “kusachiite”; y tiene una densidad de 8.53 g/cm^3 . Su composición química es de óxido de bismuto (III) (Bi_2O_3 85.42% - 86.00%) y óxido de cobre (II) (CuO (13.91% - 14.58 %)). Presenta un arreglo cristalino tetragonal, con un grupo espacial $P4/ncc$ y parámetros de red $a = b$

= 8.50 Å y c = 5.81 Å (figura 1). El CuBi₂O₄ es un material semiconductor tipo-p con una energía de brecha prohibida o band gap de 1.5 - 1.8 eV. [1]

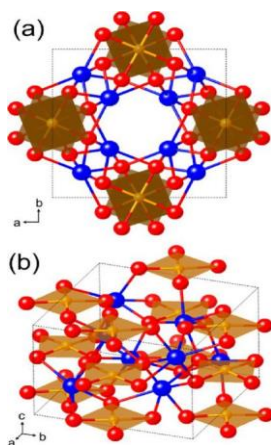
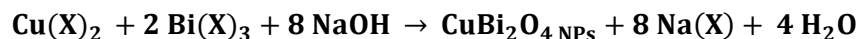


Figura 1. Representación de la estructura cristalina del CuBi₂O₄. (a) Vista desde el eje C, (b) vista desde un ángulo arbitrario. Los átomos se representan por esferas; azules = Bi, naranjas = Cu y rojas = O. [1]

2. Sección experimental

Las nanopartículas se obtuvieron mediante reacciones en estado sólido, empleando como sales precursoras cloruros y acetatos de Cu(II) y Bi(III), en relación estequiométrica 1:2 y en presencia de una base, de acuerdo a la siguiente reacción química:



En donde X⁻ = Cl⁻ ó CH₃COO⁻

En primer lugar, las sales metálicas se muelen en un mortero de ágata durante 10 minutos. Posteriormente se agrega el hidróxido de sodio (NaOH) a la mezcla de sales metálicas. La molienda se continúa hasta que el producto obtenido no presenta ningún cambio aparente, en general para este sistema, la molienda de todos los reactivos se lleva a cabo durante 30 minutos. El producto obtenido se lava 4 veces con agua destilada y 3 veces con acetona, separando por centrifugación a 3500 rpm por 10 minutos, en cada ocasión. El producto obtenido se deja secar a temperatura ambiente para las NPs o también, se calcina a 600°C por dos horas. Las nanopartículas obtenidas se caracterizaron por Difracción de Rayos X en polvo (DRX), espectroscopia electrónica UV- Vis, espectroscopia de Infrarrojo (FTIR), espectroscopia Raman y Resonancia Paramagnética Electrónica (RPE). Se llevó a cabo la evaluación de la actividad antimicrobiana de las NPs de CuBi₂O₄, para lo cual se prepararon dispersiones de dichas NPs en el medio de cultivo (Tripticasa de soya-agar) en dos concentraciones: 25 mg y 50 mg de NPs por mL de medio de cultivo, respectivamente. El medio de cultivo con la dispersión de las NPs se colocó en cajas Petri de 60X15 mm y se dejó gelificar. Posteriormente fueron inoculadas con 10³ unidades formadoras de colonias (UFC) de *P. aeruginosa* y *S. aureus*, respectivamente, y se incubaron por 24 h a 35 °C.

3. Resultados y discusión

En el difractograma (figura 2) se observa que el CuBi_2O_4 se obtuvo como fase única, es decir que todos los picos de difracción corresponden con los informados en la tarjeta cristalográfica (Joint Committee on Powder Diffraction Standards) JCPDF 01-079-1810, para el CuBi_2O_4 , en un arreglo cristalino tetragonal, con un grupo espacial $P4/ncc$ y parámetros de red $a = b = 8.48 \text{ \AA}$, $c = 5.79 \text{ \AA}$. Además, se aprecia en el difractograma que se obtienen 2 diferentes tamaños de partícula dependiendo si las NPs se calcinan.

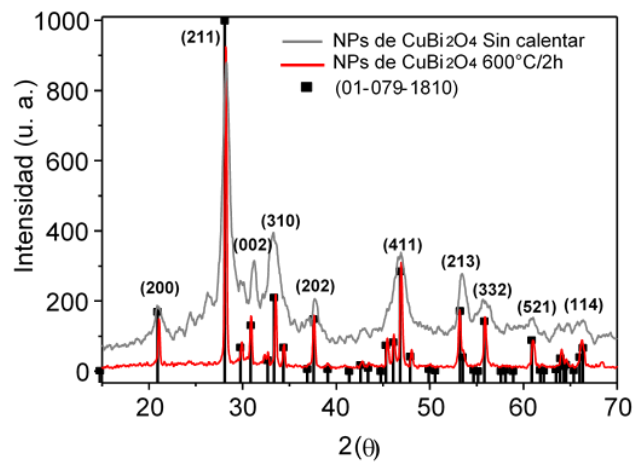


Figura 2. Difractograma de las NPs de CuBi_2O_4 . Las NPs con un tamaño promedio de 20 nm se representan de color gris, las Nps con un tamaño promedio de 50 nm de representan con color rojo y la tarjeta cristalográfica (01-079-1810) que corresponde al CuBi_2O_4 se representa de color negro

En el espectro de absorción electrónica en la región UV-Visible (Figura 3), se puede observar una clara diferencia entre ambos espectros, a pesar de que en los tamaños obtenidos de las NPs de CuBi_2O_4 , los efectos de confinamiento electrónico son muy débiles. La diferencia observada entre los espectros es el resultado de la forma y el tamaño de la nanoestructura que se favorece en uno y otro caso. Al parecer las NPs de menor tamaño forman estructuras mayoritariamente cúbicas, presentando un espectro de absorción que va de 550 a 250 nm. Por otro lado, las NPs de mayor tamaño absorben de 250 a 650 nm, ya que adicionalmente forman estructuras tipo *rod*, lo que se refleja en un espectro de absorción más extendido a hacia la región del visible.

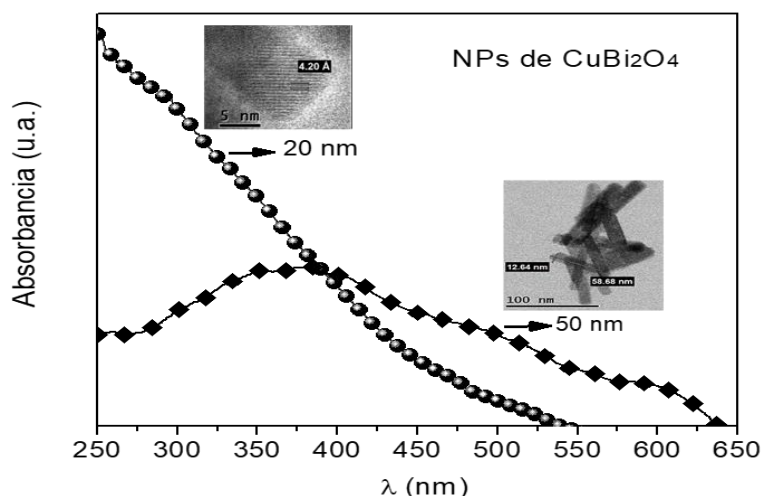


Figura 3. Espectros de absorción electrónica en la región UV-Visible de las NPs de CuBi_2O_4 de 20 y 50 nm

Resultados del ensayo de actividad antibacteriana

En la tabla 1 se muestran los resultados del conteo de las unidades formadoras de colonia (UFC) de la bacteria *P. aeruginosa*, formados en las cajas Petri donde se tiene la dispersión de las NPs de CuBi_2O_4 de 20 nm en el medio de cultivo, en concentraciones de 50 mg de NPs en 1 mL de medio de cultivo (110 UFC), así como de 25 mg de NPs en 1 mL de medio de cultivo (427 UFC). A partir de dichos resultados, podemos decir que las UFC se redujo en 89% en la caja Petri que contenía 50 mg de NPs de CuBi_2O_4 (20 nm) por 1 mL de medio de cultivo. Por otro lado, las UFC se redujeron en un 57.3% cuando la concentración de NPs fue de la mitad (25 mg de NPs/ mL de medio de cultivo). En la figura 4 se muestran las fotografías de las cajas Petri correspondientes, en donde se aprecia claramente la disminución de las UFC, Cuando la concentración fue de 50 mg de NPs/ mL de medio de cultivo. Por otro lado (Figura 5) se observa que, en el caso del *S. aureus* no hubo crecimiento de la bacteria para ambas concentraciones 50 y 25 mg de NPs / mL de medio de cultivo, respectivamente.

Tabla 1. Resultados del conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC)

Bacteria	UFC Inicial	Concentración de las NPs de CuBi_2O_4 (mg/mL)	UFC's/ mL (% en que se redujo las UFC)
<i>P. aeruginosa</i>	10^3	50	110 (89%)
		25	427 (57.3%)
		0	1000
<i>S. aureus</i>	10^3	50	Ø (100%)
		25	Ø (100%)
		0	1000

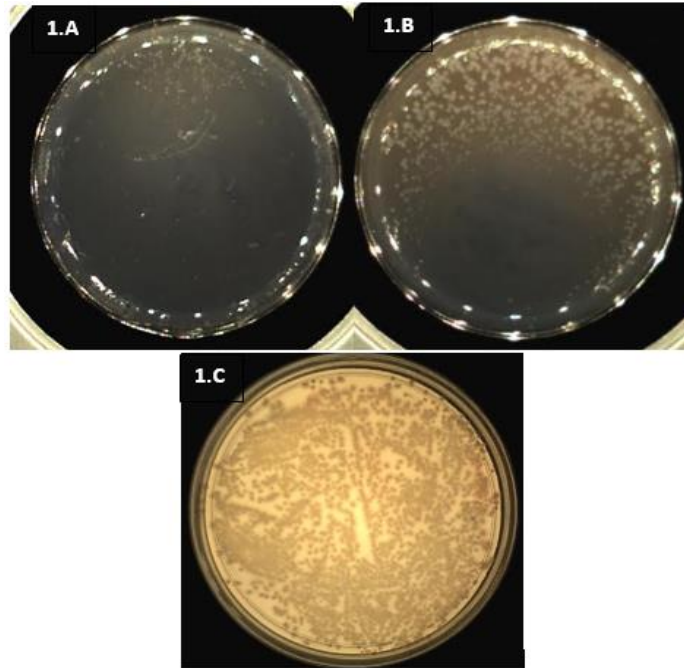


Figura 4. Fotografías de las cajas Petri con la bacteria *P. aeruginosa* y las diferentes concentraciones de NPs. Caja Petri con 50 mg/mL de NPs (1.A). Caja Petri con 25 mg de NPs/mL (1.B) y caja Petri sin NPs (1.C).

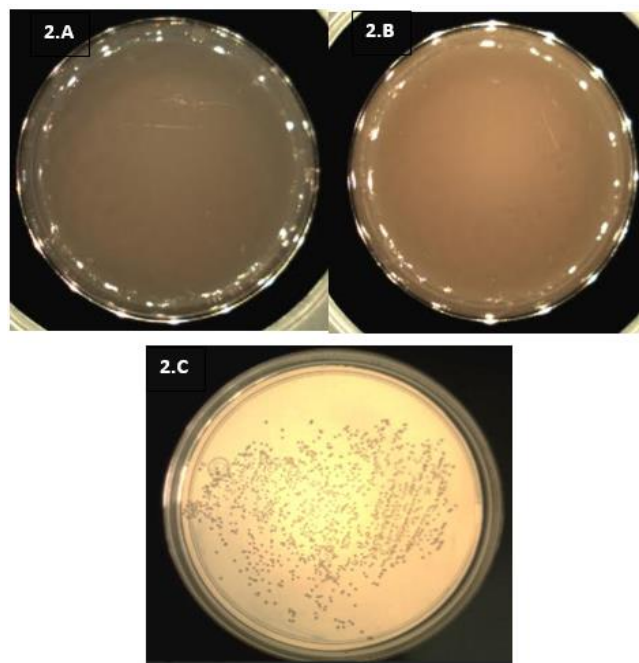


Figura 5. Fotografías de las cajas Petri con la bacteria *S. aureus* y las diferentes concentraciones de NPs. Caja Petri con 50 mg/mL de NPs (2.A). Caja Petri con 25 mg/mL (2.B) y caja Petri sin NPs (2.C).

5. Conclusión

- Se sintetizaron de manera satisfactoria NPs de óxido de cobre bismuto CuBi_2O_4 como fase única y con tamaños de cristalito promedio de 20 a 50 nanómetros.
- Todas las técnicas espectroscópicas, de microscopia electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM) y difracción de rayos X (XRD), corroboran la pureza de la fase.
- El método de síntesis empleado en este trabajo resultó ser un método sencillo, reproducible, de bajo costo y amigable con el medio ambiente. Además, si se compara con otros métodos de obtención de NPs que requieren de 10 a 24 hrs y un gran consumo energético, la mecano-síntesis es un método relativamente rápido ya que en un lapso de 1 a 4 hrs se pueden obtener diversas nanoestructuras

6. Agradecimientos

Proyecto PAPIIT IN108696 por el financiamiento.

LUCE-ICAT, por el uso de algunos equipos empleados para la caracterización de las NPs.

7. Referencias

- [1] Berglund, S. P., Abdi, F. F., Bogdanoff, P., Chemseddine, A., Friedrich, D., & van de Krol, R. (2016). Comprehensive evaluation of CuBi_2O_4 as a photocathode material for photoelectrochemical water splitting. *Chemistry of Materials*, 28(12), 4231-4242.
- [2] Henmi, C. (1995). Kusachiite, CuBi_2O_4 , a new mineral from Fuka, Okayama Prefecture, Japan. *Mineralogical Magazine*, 59(3), 545-548
- [3] Wing, C. E. G. (2006). Las NANOPARTÍCULAS: pequeñas estructuras con gran potencial. *El Inin Hoy, Contacto Nuclear*, 24-29
- [4] James, S. L., Adams, C. J., Bolm, C., Braga, D., Collier, P., Frišćić, T., ... & Krebs, A. (2012). Mechanochemistry: opportunities for new and cleaner synthesis. *Chemical Society Reviews*, 41(1), 413-447.