



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES BACTERICIDAS DE NANOPARTÍCULAS DE CuO ,
 ZnO , CuFe_2O_4 Y ZnFe_2O_4

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. BLANCA PAZ DÍAZ

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

CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO 2022



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

**ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES BACTERICIDAS DE NANOPARTÍCULAS DE
CuO, ZnO, CuFe₂O₄ Y ZnFe₂O₄**

**TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. BLANCA PAZ DÍAZ

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



Ciudad de México,

2022

Agradecimientos

Al Proyecto PAPIIT IN108616 y al Proyecto PAPIIT IT200319 por parte del financiamiento aportado para la realización de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT, por el apoyo económico brindado en el transcurso de mis estudios de doctorado, CVU 621060.

A la Dra. América Vázquez, por su guía, paciencia y apoyo para la realización de este proyecto; así como también por su apoyo y consejo cuando lo necesité, por enseñarme a ser una mejor persona.

A Dra. Argelia Almaguer Flores por todo el tiempo, recursos y dedicación para llevar a cabo las pruebas de toxicidad; por su disponibilidad y apoyo para culminar este proyecto.

A la Dra. Ana Leticia Fernández Osorio de la FES Cuautitlán por las facilidades y la ayuda para la obtención de los espectros de Difracción de Rayos X.

Al Dr. Vicente Garibay Febles por el apoyo y la facilidad para el uso del Microscopio Electrónico de Transmisión.

Al Dr. Alejandro Solano por su tiempo para llevar a cabo el análisis de EPR en la Facultad de Química.

A la Dra. Selene Islas por su apoyo en la obtención e interpretación de espectros Raman e Infrarrojo en el ICAT, UNAM.

A los sinodales por su tiempo y dedicación para llevar a cabo la revisión de este trabajo, y por sus comentarios para la mejora de éste.

Agradezco infinitamente a mi familia, padres y hermano, quienes siempre han estado aquí para mí, por su paciencia, apoyo, y todos los buenos momentos que me han regalado hasta ahora y que forman parte de quien soy. A mis primos, tíos, y mi abue, quienes a la distancia siempre han estado presentes, y quienes han ayudado a que llegue a donde me encuentro hoy. Finalmente, quisiera agradecer a mi novio quien me ha apoyado sin importar el momento, siempre haciéndome reír y verle el lado amable a las cosas. A todos ustedes gracias.

Artículo publicado:

Paz-Díaz, B., Vázquez-Olmos, A. R., Almaguer-Flores, A., García-Pérez, V. I., Sato-Berrú, R. Y., Almanza-Arjona, Y. C., & Garibay-Febles, V. (20 de november de 2021). ZnFe₂O₄ and CuFe₂O₄ Nanocrystals: Synthesis, Characterization, and Bactericidal Application. *J Clust Sci* doi:10.1007/s10876-021-02203-4

Contenido

Abstract	1
Introducción	3
1. Antecedentes	3
1.1 Nanomateriales	3
1.2 Actividad antimicrobiana de los nanomateriales.	4
1.3 Mecanoquímica	9
1.4 Óxido de Zinc	10
1.4.1 Propiedades antimicrobianas del ZnO	11
1.5 Óxido de Cobre	12
1.5.1 Propiedades antimicrobianas del CuO	13
1.6 Ferrita de Zinc (ZnFe₂O₄)	14
1.6.1 Propiedades antimicrobianas del ZnFe₂O₄	15
1.7 Ferrita de Cobre (CuFe₂O₄)	16
1.7.1 Propiedades antimicrobianas del CuFe₂O₄	17
1.8 Staphylococcus epidermidis (S. epidermidis)	18
1.9 Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa)	19
1.10 La pared celular bacteriana	20
2. Planteamiento del problema	22
3. Justificación	23
4. Hipótesis	24
5. Objetivos	24
Objetivo General	24
Objetivos Particulares	24
6. Desarrollo Experimental	25
6.1 Reactivos empleados para la síntesis	25
6.2 Equipos empleados en la caracterización de las NPs	25
6.3 Síntesis de las NPs	26
6.3.1 NPs de ZnO	26
6.3.2 NPs de CuO	26
6.3.3 NPs de ZnFe₂O₄	27
6.3.4 NPs de CuFe₂O₄	27
6.4 Pruebas antimicrobianas	27

6.4.1	Antibiogramas.....	28
6.4.2	Concentración Mínima Bactericida (CMB)	29
6.4.3	Dispersión en Agar	30
6.5	Interacción de NPs con moléculas componentes de la pared celular	31
7.	Resultados	32
7.1	Óxido de Zinc	32
7.1.1	Caracterización por XRD de polvos.....	32
7.1.2	Caracterización por TEM	33
7.1.3	Caracterización por Espectroscopía de Absorción UV-Vis	34
7.1.4	Caracterización por Espectroscopía Raman	35
7.1.5	Caracterización por Espectroscopía FT-IR	36
7.1.6	Caracterización por EPR	37
7.2	Óxido de Cobre	40
7.2.1	Caracterización por XRD de polvos.....	40
7.2.2	Caracterización por TEM	41
7.2.3	Caracterización por Espectroscopía de Absorción UV-Vis	41
7.2.4	Caracterización por Espectroscopía Raman	42
7.2.5	Caracterización por Espectroscopía FT-IR	43
7.2.6	Caracterización por EPR	44
7.3	Ferrita de Zinc ($ZnFe_2O_4$).....	45
7.3.1	Caracterización por XRD de polvos.....	45
7.3.2	Caracterización por TEM	46
7.3.3	Caracterización por Espectroscopía de Absorción UV-Vis	47
7.3.4	Caracterización por Espectroscopía Raman	48
7.3.5	Caracterización por Espectroscopía FT-IR	49
7.3.6	Caracterización por EPR	50
7.4	Ferrita de Cobre ($CuFe_2O_4$).....	51
7.4.1	Caracterización por XRD de polvos.....	51
7.4.2	Caracterización por TEM	52
7.4.3	Caracterización por Espectroscopía de Absorción UV-Vis	53
7.4.4	Caracterización por Espectroscopía Raman	54
7.4.5	Caracterización por Espectroscopía FT-IR	55
7.4.6	Caracterización por EPR	56
7.5	Pruebas antimicrobianas	57
7.5.1	Antibiogramas.....	57
7.5.2	Concentración Mínima Bactericida.....	59

7.5.3	Dispersión en Agar	61
7.6	Interacción de las NPs con moléculas componentes de la pared celular	66
7.6.1	Caracterización por Espectroscopía Raman	66
8.	Conclusiones	77
9.	Bibliografía	78
APÉNDICE A	84
APÉNDICE B	86

Índice de Figuras

- Figura 1.** Mecanismos de acción antimicrobiana de las NPs^[3].
- Figura 2.** Esquema general de las etapas que involucra un proceso mecanoquímico.
- Figura 3.** Representación de la estructura tipo wurtzita del ZnO con constantes de red ^[7].
- Figura 4.** Representación de la estructura monoclinica del CuO con sus constantes de red^[10].
- Figura 5.** Representación de la estructura tipo espinela normal del ZnFe₂O₄^[14].
- Figura 6.** Representación de la estructura tipo espinela inversa del CuFe₂O₄^[16].
- Figura 7.** (a) Tinción Gram del *Staphylococcus epidermidis* y (b) imagen de microscopía electrónica de barrido^[20].
- Figura 8.** (a) Tinción Gram de *Pseudomonas aeruginosa* y (b) imagen de microscopía electrónica de barrido^[20].
- Figura 9.** Componentes del peptidoglicano de bacterias Gram-positivas.
- Figura 10.** Posición de los discos en la placa de agar para la prueba de antibiogramas.
- Figura 11.** Concentración aproximada de la dispersión de NPs para cada pozo.
- Figura 12.** Difractograma de los cristalitos de ZnO.
- Figura 13.** (a) Micrografía de TEM representativa de las NPs de ZnO y (b) histograma de distribución de tamaño de partícula.
- Figura 14.** (a) Espectro UV-Visible y (b) gráfica de Tauc de las NPs de ZnO.
- Figura 15.** Espectro Raman de las NPs de ZnO.
- Figura 16.** Espectro de Infrarrojo de las NPs de ZnO.
- Figura 17.** Espectro de EPR de las NPs de ZnO.
- Figura 18.** Propuesta de la distribución de los defectos paramagnéticos en las NPs de ZnO. Diagrama tomado de [24]
- Figura 19.** Difractograma de los cristalitos de CuO.
- Figura 20.** (a) Micrografía de TEM representativa de las NPs de CuO y (b) histograma de distribución de tamaño de partícula.
- Figura 21.** (a) Espectro UV-Visible y (b) gráfica de Tauc de las NPs de CuO.

Figura 22. Espectro Raman de las NPs de CuO.

Figura 23. Espectro de Infrarrojo de las NPs de CuO.

Figura 24. Espectro de EPR de las NPs de CuO.

Figura 25. Difractograma de los cristalitas de ZnFe₂O₄.

Figura 26. (a) Micrografía de TEM representativa de las NPs de ZnFe₂O₄ y (b) histograma de distribución de tamaño de partícula.

Figura 27. (a) Espectro UV-Visible y (b) gráfica de Tauc de las NPs de ZnFe₂O₄.

Figura 28. Espectro Raman de las NPs de ZnFe₂O₄.

Figura 29. Espectro de Infrarrojo de las NPs de ZnFe₂O₄.

Figura 30. Espectro de EPR de las NPs de ZnFe₂O₄.

Figura 31. Difractograma de los cristalitas de CuFe₂O₄.

Figura 32. (a) y (b) Micrografías de TEM representativas de las NPs de CuFe₂O₄ y (c) histograma de distribución de tamaño de partícula.

Figura 33. (a) Espectro UV-Visible y (b) gráfica de Tauc de las NPs de CuFe₂O₄.

Figura 34. Espectro Raman de las NPs de CuFe₂O₄.

Figura 35. Espectro de Infrarrojo de las NPs de CuFe₂O₄.

Figura 36. Espectro de EPR de las NPs de CuFe₂O₄.

Figura 37. Antibiograma de *S. epidermidis*.

Figura 38. Antibiograma de *P. aeruginosa*.

Figura 39. Gráfica del porcentaje de inhibición de crecimiento contra la bacteria *S. epidermidis* de las NPs a una concentración de 27mg/mL.

Figura 40. Gráfica del porcentaje de inhibición de crecimiento contra la bacteria *P. aeruginosa* de las NPs a una concentración de 27mg/mL.

Figura 41. Espectro Raman del aminoácido Glicina con la asignación de sus señales características.

Figura 42. Espectros Raman de la interacción de NPs de ZnO y CuO con los diferentes componentes de la pared celular.

Figura 43. Espectros Raman de la interacción de las NPs de ZnFe₂O₄ con algunas moléculas componentes de la pared celular.

Figura 44. Espectros Raman de la interacción de NPs de CuFe_2O_4 con los diferentes componentes de la pared celular.

Figura 45. Espectro de EPR de ZnO comercial

Figura 46. Espectro de EPR de CuO comercial

Figura 47. Determinación de CMB de las NPs de ZnO contra *S. epidermidis*.

Figura 48. Determinación de CMB de las NPs de CuO contra *S. epidermidis*.

Figura 49. Determinación de CMB de las NPs de ZnFe_2O_4 contra *S. epidermidis*.

Figura 50. Determinación de CMB de las NPs de CuFe_2O_4 contra *S. epidermidis*.

Índice de Tablas

Tabla 1. Priorización de patógenos para guiar la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos

Tabla 2. Tamaño promedio de cristalita del ZnO

Tabla 3. Valores de g.

Tabla 4. Tamaño promedio de cristalita del CuO

Tabla 5. Tamaño promedio de cristalita para la ferrita de ZnFe_2O_4 .

Tabla 6. Tamaño promedio de cristalita de la ferrita de CuFe_2O_4 .

Tabla 7. CMB para las nanopartículas sintetizadas contra *S. epidermidis* y *P. aeruginosa*.

Tabla 8. Imágenes de las placas de agar con las NPs dispersas antes y después de ser inoculadas con ambas cepas.

Tabla 9. Resumen de resultados de caracterización y pruebas antimicrobianas de las nanopartículas sintetizadas.

Abstract

An easy mechanochemical and eco-friendly method was employed to obtain ZnO, CuO, ZnFe₂O₄ and CuFe₂O₄ nanocrystals with an average size of about 15 nm, 9 nm, 6 nm and 7nm accordingly. Their corresponding X-ray diffraction (XRD) patterns reveal a hexagonal structure for ZnO, a monoclinic structure for CuO, a cubic crystal structure for ZnFe₂O₄, whereas in CuFe₂O₄ the tetragonal and cubic crystal phases coexist, the latter being the majority phase. The transmission electron microscopy (TEM) images of these nanoparticles corroborate the formation of nanocrystals with dimensions consistent with those obtained from the XRD patterns. Furthermore, their corresponding Raman spectra confirm the structure and composition of nano oxides and ferrites. The electron paramagnetic resonance (EPR) spectra were obtained for each nanoparticle. The ZnO nanocrystals present 3 bands, with $g = 1.97$, 2.085 and 2.001 corresponding to different types of vacancies in the crystal structure, while for the CuO the spectrum shows a band with $g = 2.2$ corresponding to Cu²⁺ monomers and dimers. In addition, both nano ferrites show an EPR spectrum with a wide band with $g = 2.0$, characteristic of ferromagnetic oxides. Besides, the antibacterial effect of ZnO, CuO, ZnFe₂O₄ and CuFe₂O₄ nanocrystals against two opportunistic pathogens, *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 14,990) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 43,636), was tested. The minimum bactericidal concentration (MBC) results showed that the oxides were more effective than the ferrites against *S. epidermidis*, and ZnFe₂O₄ was more effective than CuFe₂O₄. The activity against *P. aeruginosa* was greater for CuFe₂O₄ NPs than the other systems. On the other hand, when 27 mg/mL of nanocrystal were dispersed in the agar plates, the growth of *S. epidermidis* was 100% inhibited, whereas ZnO, CuO, ZnFe₂O₄ and CuFe₂O₄ inhibited 85 %, 86 %, 67 % and 78 % of *P. aeruginosa* growth, respectively.

Resumen

Un método mecanoquímico sencillo y amigable con el medio ambiente, fue empleado para obtener nanocristales de ZnO, CuO, ZnFe₂O₄ y CuFe₂O₄ con un tamaño promedio de 15 nm, 9 nm, 6 nm and 7nm, respectivamente. Los patrones de difracción de Rayos X (XRD) revelan una fase hexagonal tipo wurtzita para el ZnO, monoclinica para el CuO, cúbica para el ZnFe₂O₄, mientras que para el CuFe₂O₄ coexisten las fases tetragonal y cúbica, siendo esta última la fase mayoritaria. Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de estas nanopartículas (NPs) corroboran la formación de nanocristales con dimensiones consistentes con las obtenidas a partir de los patrones de XRD. Adicionalmente, los espectros Raman confirman la estructura y composición de los nano óxidos y nano ferritas. Los espectros de resonancia paramagnética electrónica (EPR) fueron obtenidos para cada nanopartícula. Los nanocristales de ZnO presentan 3 bandas, con $g = 1.97, 2.085$ y 2.001 correspondientes a diferentes tipos de vacancias en la estructura cristalina, mientras que para el CuO el espectro muestra una banda con $g = 2.2$ relacionada con monómeros y dímeros de Cu²⁺. En el caso de ambas nano ferritas, se muestra una banda ancha con $g = 2.0$, característica de los óxidos ferromagnéticos. El efecto antimicrobiano de las NPs de ZnO, CuO, ZnFe₂O₄ y CuFe₂O₄ contra dos patógenos oportunistas, *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 14,990) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 43,636), fue evaluado. Los resultados de la determinación de la concentración mínima bactericida (CMB) indican que los óxidos fueron más efectivos que las ferritas contra *S. epidermidis*, siendo el ZnFe₂O₄ más efectivo que CuFe₂O₄. La actividad contra *P. aeruginosa* fue mayor por parte de las NPs de CuFe₂O₄. Por otro lado, cuando 27 mg/mL de las NPs fueron dispersadas en las placas de agar, el crecimiento de *S. epidermidis* fue inhibido al 100%; mientras que las NPs de ZnO, CuO, ZnFe₂O₄ y CuFe₂O₄ inhibieron el crecimiento de *P. aeruginosa* en un 85 %, 86 %, 67 % y 78 %, respectivamente.

Introducción

Este trabajo de tesis está enfocado a la síntesis de NPs de ZnO y CuO, así como de las espinelas de zinc (ZnFe_2O_4) y cobre (CuFe_2O_4) a partir de un método mecanoquímico. Las NPs obtenidas fueron caracterizadas por XRD de polvos, TEM, espectroscopías de absorción UV-Visible, infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR, por sus siglas en inglés), Raman y por espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (EPR, por sus siglas en inglés). Además, se evaluaron las propiedades bactericidas de las NPs frente a dos cepas de bacterias; una bacteria Gram (+) *Staphylococcus epidermidis* y una Gram (-) *Pseudomonas aeruginosa*, para lo cual se emplearon diferentes metodologías como antibiogramas, dispersión en agar y la determinación de la concentración mínima bactericida. Finalmente, se presenta un estudio de la interacción de los sistemas sintetizados con diferentes moléculas componentes de la pared celular, a partir de un estudio por espectroscopía Raman.

En la siguiente tesis se presentan los antecedentes correspondientes a los nanomateriales, y a los diferentes sistemas con los que se trabajaron; así como los estudios presentados con relación a su actividad antimicrobiana contra diferentes bacterias. Se introduce a las bacterias con las que se evaluó la actividad antimicrobiana y sus generalidades. Posteriormente se plantea el problema, la justificación, la hipótesis y los objetivos del trabajo presentado. Las siguientes secciones se refieren al procedimiento experimental de síntesis, el cual se realizó en el Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología (ICAT), y los ensayos biológicos, los cuales se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biointerfases de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología. Finalmente se presentan los resultados obtenidos de cada prueba y las conclusiones.

1. Antecedentes

1.1 Nanomateriales

En los últimos tiempos se ha desarrollado una gran cantidad de investigación alrededor de los nanomateriales, es decir, aquéllos en los que al menos una de sus tres dimensiones presenta un tamaño entre 1 y 100 nm. En 2011, la Comisión Europea adoptó una recomendación sobre la definición de nanomaterial, entendiéndose como “un material natural, accidental o fabricado que contenga partículas, sueltas o formando un agregado o aglomerado, en el que al menos el 50 %

de las partículas presente una o más de las dimensiones externas en el intervalo de tamaños comprendido entre uno y 100 nanómetros^[1]”.

El término nanomaterial también incluye a los materiales manufacturados diseñados intencionadamente con unas propiedades específicas muy diferentes, en muchos casos, a las que presenta el mismo material en bulto. El cambio en sus propiedades físicas y químicas se debe a la reducción de tamaño de partícula y hace que las NPs tengan aplicaciones en áreas como la catálisis, el almacenamiento y conversión de energía, en sensores, y más recientemente en el ámbito de la medicina. Los nanomateriales manufacturados pueden presentarse en diferentes formas; como nanopelículas, nanofibras o nanopartículas (NPs), dependiendo si tienen una, dos o tres dimensiones en la nanoescala, respectivamente. Durante el proceso de producción de los diferentes nano-objetos, las partículas tienden a unirse unas con otras para dar lugar a agregados en los que las dimensiones externas pueden alcanzar tamaños superiores a los 100 nm; mientras la estructura interna o la estructura superficial se encuentre en la escala nanométrica, los materiales pueden ser considerados como nanoestructurados. Los materiales nanoestructurados pueden presentar una distribución de tamaño de partícula, o tener poros o precipitados en dicha escala.

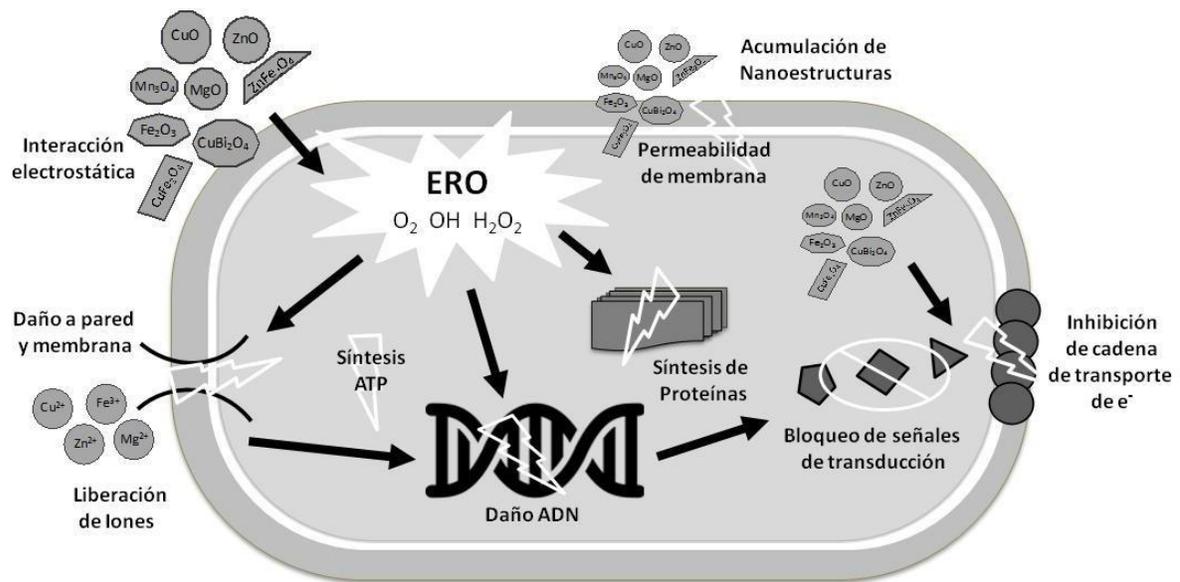
Por otro lado, uno de los retos de mayor importancia en el área médica es la lucha contra diferentes patógenos que ocasionan enfermedades que pueden llegar a ser letales. En particular se han investigado diversas NPs que puedan presentar actividad antimicrobiana, esto debido a sus dimensiones de unos cuantos nanómetros y a su gran superficie específica que las hacen candidatos ideales para interactuar con las bacterias.

1.2 Actividad antimicrobiana de los nanomateriales.

Debido al uso indiscriminado de los antibióticos, las bacterias han desarrollado una multirresistencia a éstos, ocasionando que las terapias contra las infecciones bacterianas sean inútiles, resultando en millones de muertes al año. Se calcula que aproximadamente 70% de los patógenos bacterianos son resistentes a más de un antibiótico. En este sentido, las NPs se han propuesto como una alternativa para la lucha contra estos patógenos, siendo auxiliar en la prevención de infecciones. Dentro de los sistemas más estudiados por sus propiedades antimicrobianas se encuentran las NPs de plata (Ag^0), oro (Au^0), cobre (Cu^0) y más recientemente las constituidas por óxidos metálicos de la primera serie de transición, como el óxido de titanio (TiO_2), óxido de zinc (ZnO), óxido cúprico (CuO), la espinela de manganeso (Mn_3O_4), la magnetita (Fe_2O_4) y la hematita (Fe_2O_3)^[2]. La toxicidad de los sistemas nanoestructurados está determinada

por la morfología y el tamaño de partícula principalmente; características que dependen del método de síntesis utilizado. Por lo tanto, las condiciones de síntesis, así como los precursores utilizados, son de suma importancia para la obtención de NPs con posible aplicación bactericida^[2].

A pesar de los numerosos sistemas con propiedades antimicrobianas, el mecanismo exacto de la acción bactericida de las nanoestructuras no ha sido completamente dilucidado. Se han propuesto diferentes formas de acción de éstas, las cuales se mencionan a continuación y se ilustran en la Figura 1^[3]:



Fuente. Imagen diseñada en base a (Hemeg, 2017; Lemire et al., 2013; Raghunath and Perumal, 2017; Stankic et al., 2016; Wang et al., 2017)

Figura 1. Mecanismos de acción antimicrobiana de las NPs^[3].

- **Estrés oxidativo a partir de la 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 ($\cdot\text{OH}$) 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 polinsaturados 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 ZnO pueden generar H_2O_2 y $\cdot OH$, pero no $O_2\cdot^-$. Por otro lado, las NPs de CuO pueden producir los cuatro tipos de oxígeno reactivo. El $O_2\cdot^-$ 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 $\cdot OH$ y el $O_2\cdot^-$ pueden conducir a la muerte microbiana aguda.

- **Daño en pared – membrana celular.**

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. Los poros de las membranas se encuentran en el orden de nanómetros, por lo tanto, entre menor sea el tamaño de partícula y mayor 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 la pared celular crean fosas en ella, llevando a un cambio en la permeabilidad debido a la liberación sostenida de LPS, proteínas de la membrana y factores intracelulares. Además, se ha vinculado este mecanismo con la interrupción de la replicación del ATP y 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.

- **Pérdida de homeóstasis 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 las LPS y aumentan la permeabilización de la membrana externa. Por ejemplo, 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 Fe^{2+}/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 generando la lisis de las células 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 volviéndolos inactivos.

- **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 NPs desfosforilan los residuos de fosfotirosina, lo que inhibe la transducción de señales y en última instancia, obstruye el crecimiento de bacterias. 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.

Por otro lado, es importante considerar que actualmente la resistencia de las bacterias a los antibióticos se ha incrementado debido a un mal uso y abuso de éstos. La resistencia en un organismo o locación se puede propagar rápida e impredeciblemente. Una bacteria resistente puede circular en poblaciones de humanos y animales, a través de la comida, el agua y el ambiente. Si bien, parece que la resistencia antimicrobiana es un problema del sector salud, en realidad es un problema que afecta a una gran variedad de sectores, impactando en la economía de un país. Cuando los microorganismos se vuelven resistentes, las opciones de tratamiento disminuyen, las enfermedades se prolongan, la mortalidad aumenta y las estancias en los hospitales se incrementan, generando una disminución en la productividad de la población.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) sugiere mejorar en la investigación básica con el fin de buscar alternativas a los usos no terapéuticos de agentes antimicrobianos; ya que la mejor

infección es aquella que no llega a suceder. Los casos más serios y difíciles de tratar son las infecciones resistentes a los antibióticos que se dan en hospitales y clínicas. Así que, para enfocar la investigación en las enfermedades más persistentes, se ha desarrollado una lista de prioridad de patógenos. El objetivo es descubrir y desarrollar nuevas alternativas con blancos novedosos y mecanismos de acción sin resistencia cruzada a clases de antibióticos ya existentes. La lista divide a los microorganismos en 3 categorías de prioridad, basada en la gravedad de la infección, así como su incidencia en la población^[4] (Tabla 1).

Tabla 1. Priorización de patógenos para guiar la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos.

Prioridad	Bacteria	Resistencia a antibióticos
Crítica	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Carbapenem (β -lactámicos)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	<i>Enterobacteriaceae</i>	Carbapenem, cefalosporinas de 3 ^a generación
Alta	<i>Enterococcus faecium</i>	Vancomicina
	<i>Helicobacter pylori</i>	Claritromicina
	<i>Salmonella sp.</i>	Fluoroquinolonas
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Vancomicina, meticilina
	<i>Campylobacter sp.</i>	Fluoroquinolona
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Cefalosporina de 3 ^a generación, fluoroquinolonas
Media	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Penicilina
	<i>Haemophilus influenzae</i>	Ampicilina
	<i>Shigella sp.</i>	Fluoroquinolona

Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis. Geneva: World Health Organization; 2017(WHO/EMP/IAU/2017.12).

Como se mencionó previamente, la síntesis de NPs puede llevarse a cabo por una gran variedad de métodos, de tal manera que las propiedades que éstas exhiban se verán influidas por el método empleado. Sin embargo, es deseable que la síntesis se lleve a cabo en condiciones de reacción suaves, que sea rápida, sencilla y de bajo costo. En este sentido la síntesis de NPs empleando un método mecanoquímico, resulta una buena alternativa.

1.3 Mecanoquímica

La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) define una reacción mecanoquímica como aquella “que es inducida por absorción directa de energía mecánica”. Por otro lado, Gaffet *et al.* se refieren a la mecanoquímica como “aquellos procesos en los que se induce una reacción química en las materias de partida, debido únicamente a la acción de molienda continua^[5]”. La mecanoquímica 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 ende, no es necesario pasar por los puntos de fusión de los compuestos participantes en la reacción. Este procedimiento presenta una reducción de costos comparado con aquellos que usualmente involucran cambios de estado. Las reacciones en estado sólido, 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, lo que genera defectos cristalinos y acumulación de tensión en la red cristalina. El método general consiste en una serie de 4 fases que se ilustran en la Figura 2. 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 mecánico, la velocidad de reacción vuelve a disminuir (fase 4).

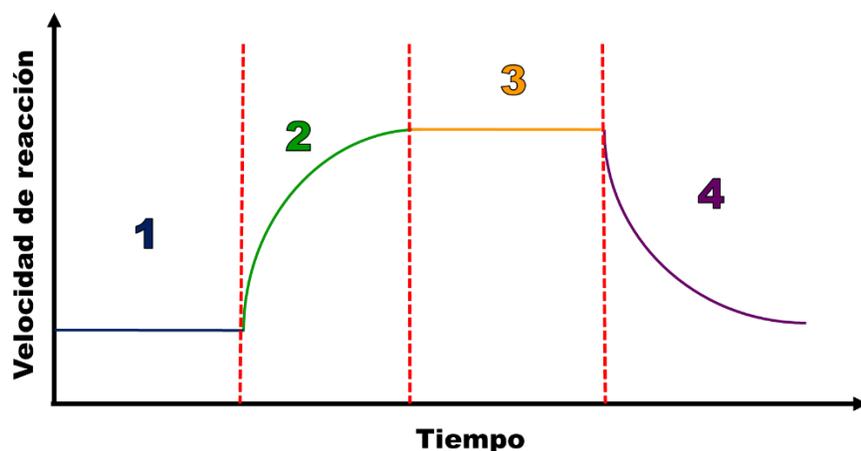


Figura 2. Esquema general de las etapas que involucra un proceso mecanoquímico.

Por otra parte, el proceso de activación mecanoquímica trabaja inyectando energía mecánica a los reactivos en estado sólido, produciendo la energía necesaria para superar la barrera energética y llevar a cabo la reacción. Este método de síntesis presenta múltiples ventajas como: una ruta simple que en ocasiones involucra un solo paso, tiempos de reacción cortos, alto rendimiento, y bajo costo para obtener materiales complejos de óxidos nanoestructurados. Adicionalmente, la mecanoquímica cumple con 6 de los principios de la química verde ya que se emplean menos pasos de reacción (principio 2), se generan subproductos salinos no tóxicos (principios 3 y 8), no se utiliza o se emplea una pequeña cantidad de disolventes (principio 5) y se realiza a bajas temperaturas (por debajo de 800°C) (principio 6) [6].

1.4 Óxido de Zinc

El óxido de zinc es un semiconductor II-VI con una brecha energética (*band gap*) amplia con valor de 3.37 eV y una energía de enlace de excitón de 60 meV. Es un compuesto que puede presentar tres estructuras cristalinas: una hexagonal tipo wurtzita y dos cúbicas: blenda y sal de Rochelle. La blenda de zinc sólo es estable cuando crece sobre sustratos cúbicos; mientras que la sal de Rochelle, sólo se logra obtener a altas presiones. La fase termodinámicamente más estable en condiciones normales es la wurtzita.

La estructura hexagonal tipo wurtzita tiene una celda unitaria con dos parámetros de red a y c con c/a igual a 1.633 en un cristal ideal. Esta estructura pertenece al grupo $C6v4$ en la notación Schoenflies y $P63mc$ en la notación Hermann-Mauguin. La Figura 3 muestra la estructura hexagonal de la wurtzita en donde se observa que un anión está rodeado de 4 cationes en las esquinas de un tetraedro, y viceversa. En un cristal real hay una desviación de los parámetros ideales, ya que la razón c/a suele ser más pequeña.

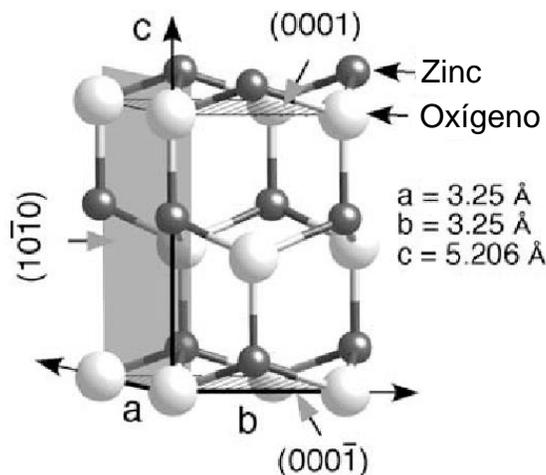


Figura 3. Representación de la estructura tipo wurtzita del ZnO con constantes de red ^[7].

El ZnO es un compuesto de color blanco sobre el cual se ha desarrollado mucha investigación debido a sus propiedades eléctricas, químicas y ópticas. Hoy en día se le ha dado importancia en cuanto a su síntesis a nivel nanométrico, ya que su aplicación va desde celdas solares, electrodos, sensores de gas y como catalizador, entre otros. Los parámetros más importantes para controlar son la morfología y el tamaño; a partir de estas dos características las NPs podrán tener diferentes propiedades de acuerdo con la aplicación deseada.

Existen diversos métodos de síntesis informados en la literatura. Sin embargo, la tendencia es buscar siempre métodos que sean de bajo costo, sencillos, y que se lleven a cabo en condiciones de reacción suaves. Debido a que la morfología y el tamaño definirá la aplicación de las NPs obtenidas, los parámetros a modificar, además del método de síntesis, son los precursores y con ello las condiciones de trabajo. NPs de óxido de zinc se han logrado obtener utilizando métodos como la emulsión, la mecanoquímica, la coprecipitación, a partir de extractos naturales y por el método sol-gel, entre otros. Hay que considerar que el método de síntesis determinará las propiedades que exhiban las NPs, así como su tamaño y morfología.

1.4.1 Propiedades antimicrobianas del ZnO

El ZnO ha sido muy investigado debido a sus propiedades únicas que lo hacen adecuado para varias aplicaciones en el campo biomédico y de la salud. NPs de ZnO han sido eficientemente utilizadas en terapia de cáncer e imagenología, pero también en el desarrollo de varios productos antimicrobianos. El óxido de zinc ha sido utilizado desde hace tiempo en productos dermatológicos a nivel industrial por sus propiedades bactericidas, siendo un compuesto

altamente compatible con la piel humana. También se ha reportado su uso en pintura en hospitales para reducir las infecciones nosocomiales. A pesar de ser un compuesto conocido y estudiado en el área médica, los mecanismos por los cuales las NPs de ZnO interactúan con las bacterias no están del todo entendidos.

Se ha informado que el efecto bactericida del ZnO se debe principalmente a la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) por la presencia de moléculas de agua en la superficie de las NPs que llevan a la generación de radicales libres de OH y de oxígeno. Las NPs también pueden liberar iones al interior de la célula, lo que genera una interferencia con las funciones celulares. Estos mecanismos se presentan cuando las NPs son lo suficientemente pequeñas como para introducirse en las bacterias. Pero cuando esto no es posible, también pueden suceder interacciones electrostáticas por las cuales las NPs se pueden unir a la membrana bacteriana interfiriendo con sus funciones normales. La interacción puede ser hidrofóbica, electrostática y/o van der Waals.

Debido a sus propiedades fotocatalíticas, también se ha descubierto que cuando el compuesto se expone a la luz ultravioleta, sus propiedades bactericidas aumentan. Se ha probado su efecto en bacterias Gram (+) y Gram (-) así como en esporas, las cuales son muy difíciles de erradicar por los medios actualmente conocidos. Se ha probado un efecto positivo contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e incluso contra cepas altamente resistentes causantes de enfermedades graves como *Campylobacter jejuni* (enteritis, síndrome de Guillain-Barré), *Shigella dysenteriae* (gastroenteritis aguda). Se ha logrado probar, con resultados favorables, contra bacterias que se encuentran en el agua y que generan cerca de 485 000 muertes al año (OMS 2022) como *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli*^{8, 9}.

1.5 Óxido de Cobre

El óxido cúprico se encuentra en la naturaleza como el mineral tenorita, el cual es un semiconductor tipo p con una brecha energética de 1.7-2.2 eV. Pertenece al grupo espacial C2/c (*Csh6*), teniendo una estructura cristalina monoclinica. En la Figura 4 se muestra la celda unitaria del CuO, en ésta se puede observar que cada átomo de cobre está localizado en el centro de un paralelogramo, en donde cada esquina está ocupada por un átomo de oxígeno. Por otro lado, cada átomo de oxígeno está coordinado por 4 átomos de cobre en una estructura tetraédrica distorsionada.

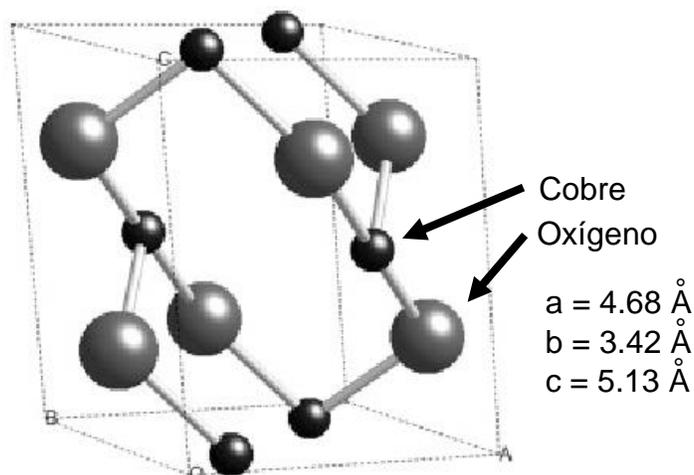


Figura 4. Representación de la estructura monoclinica del CuO con sus constantes de red^[10].

Este compuesto ha sido ampliamente estudiado debido a la gama de aplicaciones que presenta. Se ha utilizado como sensor de gases, para conversión de energía solar, en baterías, y su uso más conocido es como material catalítico debido a su gran actividad y selectividad en procesos de oxidación y reducción. La investigación alrededor de este óxido se ha enfocado en los últimos tiempos en mejorar sus propiedades superconductoras y de magnetorresistencia. Los métodos de síntesis más desarrollados buscan siempre ser de bajo costo, con una alta eficiencia para obtener productos de gran calidad.

Algunos métodos de síntesis informados en la literatura para obtener CuO son descomposición térmica, hidrotermal, reacciones en estado sólido, sol-gel, sonoquímico y coprecipitación. Las condiciones de síntesis y los precursores utilizados son de suma importancia para poder controlar el tamaño y la morfología de las NPs resultantes

1.5.1 Propiedades antimicrobianas del CuO

El mecanismo que explica la actividad antibacteriana del cobre no está totalmente dilucidado. Un elemento crucial en la actividad antibacteriana es la capacidad del cobre para ceder y aceptar electrones en un proceso continuo. Algunos estudios sugieren que el cobre, en concentraciones elevadas, tiene un efecto tóxico sobre las bacterias debido a la liberación de radicales de hidropéroxido, los iones de cobre potencialmente podrían sustituir iones esenciales para el metabolismo bacteriano como el hierro, interfiriendo inicialmente con la función de la membrana celular y luego a nivel del citoplasma alterando la síntesis proteica, ya sea inhibiendo la formación

de proteínas o provocando la síntesis de proteínas disfuncionales, alterando la actividad de enzimas esenciales para el metabolismo bacteriano.

Por otro lado, el cobre también ha demostrado capacidad para destruir virus de gran importancia médica, entre ellos el virus de la influenza A y el virus de inmunodeficiencia humana, VIH, en concentraciones tan bajas como 0.16 a 1.6 mM. La elaboración de filtros con óxido de cobre ha permitido eliminar en forma eficiente el riesgo de transmisión de VIH a través de fluidos. Los mecanismos involucrados en la actividad antiviral son la inactivación de una enzima proteasa importante para la replicación viral y daño a nivel de la envoltura fosfolipídica.

De la misma manera, diferentes especies de hongos, entre ellos *Candida albicans*, patógeno importante en pacientes inmunodeprimidos, son inhibidas en su crecimiento y luego destruidas en contacto con superficies de cobre. Estudios recientes indican que la actividad antifúngica ocurre mediante un proceso complejo denominado “muerte por contacto”, en el cual se produce fundamentalmente un daño a la membrana citoplasmática que se despolariza; no está claro si el daño afecta a las proteínas o los lípidos de la membrana. Esto facilita la entrada de iones de cobre a la célula, amplificando el daño y produce subsecuentemente un aumento en el estrés oxidativo sin apreciar daño aparente del ADN de estas células^[11].

Algunas de las bacterias contra las cuales se ha observado efecto antimicrobiano positivo son *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris*, entre otras^[12]. A partir de diferentes técnicas de caracterización, como microscopía de fuerza atómica y microscopía electrónica de barrido, se ha observado que las NPs de CuO generan un daño en la membrana. También se ha encontrado que el óxido de cobre puede prevenir la adhesión bacteriana y la formación de biopelículas en dispositivos médicos. Aunque la actividad antibacteriana depende las propiedades fisicoquímicas y de la cepa bacteriana. El cobre y sus aleaciones han sido registrados recientemente en la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos de América (EPA, por sus siglas en inglés) como el único metal con propiedades antimicrobianas, lo que permite su uso en diferentes áreas para prevenir el contagio y transmisión de diferentes microorganismos en hospitales.

1.6 Ferrita de Zinc (ZnFe₂O₄)

NPs de ferritas metálicas, con fórmula general AB₂O₄ han recibido reciente atención debido a sus propiedades superparamagnéticas, catalíticas y su gran superficie específica. Dentro de estos sistemas, han sido de especial interés las ferritas de metales de transición las cuales tienen una

estructura tipo espinela, y tienen propiedades magnéticas, catalíticas, ópticas y electrónicas muy deseables para diferentes aplicaciones. El ZnFe_2O_4 es un óxido mixto con estructura tipo espinela normal, donde el ión divalente (zinc) se encuentra en los sitios tetraédricos mientras que el ión trivalente (hierro) ocupa los sitios octaédricos. La estructura cristalina de este sistema es cúbica centrada en las caras y pertenece al grupo espacial $Fd-3m$. En la Figura 5 se observa la celda unitaria de la ferrita de zinc. La ferrita de zinc es un semiconductor con una brecha energética de 1.9 eV, el cual se ve recorrida hacia 2.6 eV cuando el tamaño de partícula se ve reducido a tamaños nanométricos. El ZnFe_2O_4 es un compuesto que en su forma másica tiene comportamiento paramagnético; sin embargo, cuando se tiene en forma de NPs presenta un comportamiento ferromagnético debido a la migración parcial del Zn^{2+} hacia los sitios octaédricos. Sus aplicaciones son diversas debido a sus propiedades magnéticas, puede ser aplicado en sensores de gas, catálisis, fotocatalisis y material absorbente, sistemas acarreadores de fármacos, hipertermia magnética y en el área de Resonancia Magnética de Imagen. Se ha reportado la síntesis de NPs de ferrita de zinc por coprecipitación, método solvotermal, hidrotermal, autocombustión y por microondas^[13].

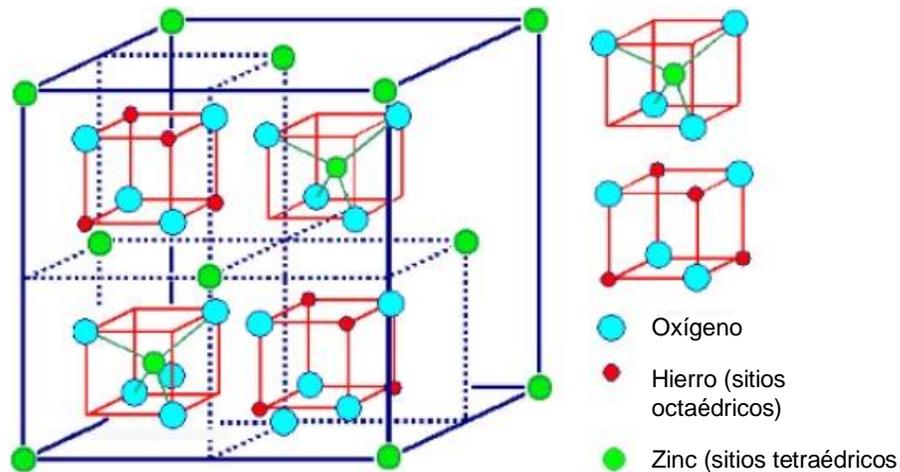


Figura 5. Representación de la estructura tipo espinela normal del ZnFe_2O_4 ^[14].

1.6.1 Propiedades antimicrobianas del ZnFe_2O_4

La ferrita de zinc es un compuesto biocompatible, y por lo tanto de gran interés en el área biomédica y de la salud. La presencia de zinc en un sistema como la ferrita se ha visto que incrementa su toxicidad, y el sistema de óxido mixto genera un estrés oxidativo en la célula lo que disminuye su viabilidad. Se ha estudiado su posible aplicación para el tratamiento de agua y

de aguas residuales, ya que es capaz de remover diferentes contaminantes, como metales pesados y colorantes; así como tener actividad para matar diferentes microorganismos. El $ZnFe_2O_4$ tiene actividad antimicrobiana contra diferentes bacterias tanto Gram (+) como Gram (-), tales como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, además de reportar actividad contra una levadura de importancia clínica como *Candida albicans*. El uso de este tipo de sistemas contra microorganismos patógenos es de gran importancia, debido a que no se ha reportado resistencia por parte de dichos microorganismos. Esto se debe a que no hay un blanco específico en la célula bacteriana por parte de las NPs. Se ha visto que el mecanismo de acción se debe principalmente a la interacción electrostática de las NPs con la pared celular. La presencia de ión Fe^{3+} en el sistema, y que éste se pueda liberar en el medio, puede llegar a promover el crecimiento bacteriano, aunque en altas concentraciones puede promover el estrés oxidativo de las células debido a la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO)^[15].

1.7 Ferrita de Cobre ($CuFe_2O_4$).

La ferrita de cobre es un óxido mixto tipo espinela, con fórmula mínima $CuFe_2O_4$, donde el ión cobre, ocupa los lugares octaédricos mientras que el hierro ocupa los sitios tetraédricos y octaédricos; siendo una espinela inversa. Dado que el Cu^{2+} se encuentra en el sitio octaédrico, se genera una estructura tipo espinela distorsionada, debido al efecto Jahn-Teller. El sistema puede cristalizar de manera cúbica, perteneciente al grupo espacial, $Fd-3m$ o con una estructura tetragonal del grupo espacial $I4_1/amd$. En la Figura 6 se puede observar la estructura de una espinela inversa. La estructura tetragonal se ha reportado cuando la síntesis se lleva a cabo a bajas temperaturas, mientras que cuando se aplica un tratamiento térmico por arriba de los $350^\circ C$ ya se observa la estructura cúbica e incluso se observa migración parcial del cobre a sitios tetraédricos. La ausencia de cationes de cobre en sitios octaédricos lleva a la ausencia de la distorsión de Jahn Teller y se favorece la estructura cúbica. El $CuFe_2O_4$ es un semiconductor con una brecha energética de 1.5 eV el cual puede recorrerse a 2.1 eV cuando el tamaño de partícula disminuye, además presenta propiedades ferromagnéticas.

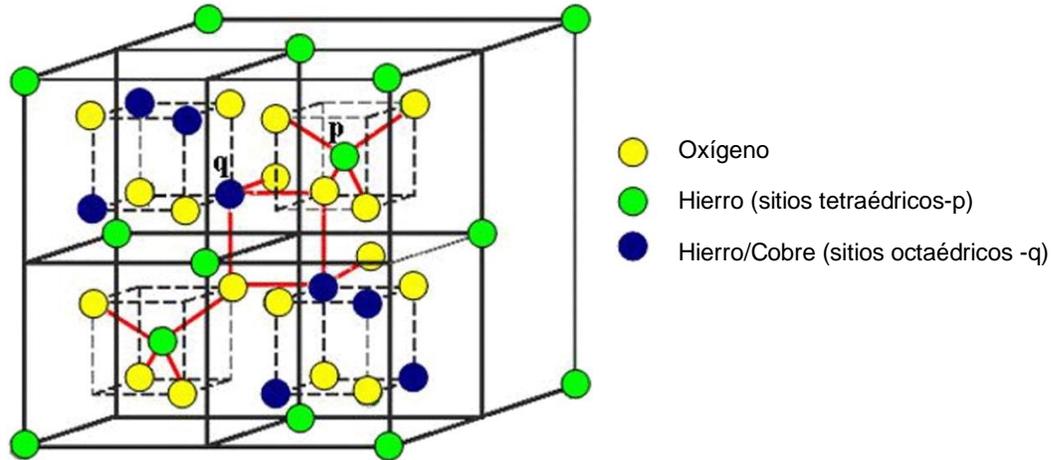


Figura 6. Representación de la estructura tipo espinela inversa del CuFe_2O_4 ^[16].

Este tipo de compuestos son de importancia tecnológica, sobre todo los composites formados con otras fases ya que hay una sinergia de propiedades. Las aplicaciones propuestas para este sistema son en biomedicina, acarreadores de medicamentos, separación magnética de células cancerosas, resonancia magnética de imagen, almacenamiento de energía, almacenamiento de medios magnéticos, en el área de la espintrónica y dispositivos electromagnéticos, para fotocatalisis y catálisis. La estructura cristalina impacta en las propiedades de estos sistemas, ya que son altamente sensibles a la distribución de los cationes, y esta distribución junto con el tamaño y morfología determina el potencial uso de estos materiales. El método de síntesis impacta de manera directa en las propiedades que las NPs presentan; por tanto, es de vital importancia la elección del método adecuado para la posible aplicación de dichas partículas. La estructura tetragonal es ideal para aplicaciones en catálisis, mientras que la estructura cúbica exhibe mejores propiedades magnéticas. Algunos métodos reportados para la obtención de NPs de CuFe_2O_4 son el método sol-gel, sonoquímico, hidrotérmico, solvotérmico, coprecipitación, emulsión y microemulsión, micelas inversas, combustión y asistido por microondas. La morfología y estructura cristalina de la ferrita de cobre puede ser modulada de manera fina, lo que la hace muy relevante para su aplicación en diferentes campos. Se han reportado en la literatura morfologías como nanotubos, nanorods, nanofibras y nanoesferas, entre otras^[17].

1.7.1 Propiedades antimicrobianas del CuFe_2O_4

Se ha visto de manera general que las NPs de ferritas metálicas pueden inhibir la actividad vital de microorganismos patógenos. Se ha observado que para las NPs de ferrita de cobre, el

principal mecanismo de acción contra las bacterias no es la liberación de iones de cobre o hierro, más bien hay una pérdida de la integridad de la membrana lo cual ha sido identificado debido a la presencia de la enzima Lactato deshidrogenasa (LDH). Específicamente, cuando la CuFe_2O_4 entra en contacto con los microorganismos ésta puede entrar a la célula y generar especies reactivas de oxígeno, lo que llevará a un estrés oxidativo de la célula, generando más daño a la membrana y eventualmente ocasionando la muerte de la bacteria. Se ha visto su acción antimicrobiana con *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* resistente a la Meticilina (MRSA), *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, y *Pseudomonas aeruginosa*.^{[18,}

19]

En este trabajo, se estudió la actividad antimicrobiana de los sistemas mencionados contra dos patógenos oportunistas que han ganado relevancia en los últimos tiempos; *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa*.

1.8 Staphylococcus epidermidis (*S. epidermidis*)

S. epidermidis es una bacteria Gram-positiva que se observa al microscopio como cocos agrupados en racimos (Figura 7). Es inmóvil y su metabolismo es anaerobio facultativo, por lo que puede obtener energía de la respiración aerobia o la fermentación. Esta bacteria es coagulasa negativa y además, la mayor parte de las cepas presentan cápsula. Este patógeno es parte de la microflora del epitelio humano; sin embargo, se ha convertido en un patógeno oportunista que provoca diferentes infecciones, siendo el causante más frecuente de infecciones relacionadas con cualquier tipo de dispositivo médico como catéteres intravenosos periféricos o centrales. Específicamente, las infecciones relacionadas con los catéteres se asocian con un aumento de la mortalidad y contribuyen a una mayor duración de la estancia hospitalaria y mayores costos de atención médica.

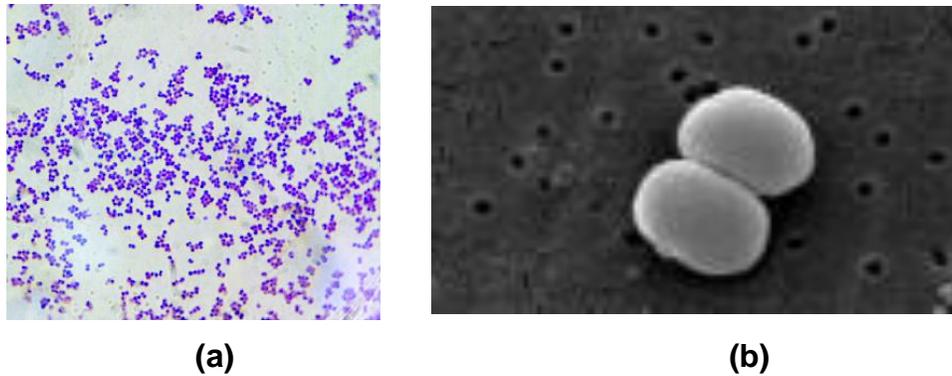


Figura 7. (a) Tinción Gram del *Staphylococcus epidermidis* y (b) imagen de microscopía electrónica de barrido^[20].

1.9 *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*)

P. aeruginosa es una bacteria Gram-negativa, no formadora de esporas. Es un bacilo con una longitud aproximada de 1 a 3 μm de largo y de 0.5 a 1 μm de ancho (Figura 8). Posee un flagelo polar constituido por una estructura proteica compleja que le proporciona movilidad en medios líquidos y respuesta a estímulos químicos. Además, le permite ligarse a las membranas de las células. Presenta pequeños filamentos denominados pili, los cuales se localizan en su exterior, estas estructuras son utilizadas para desplazarse en los medios semisólidos y al igual que el flagelo, se adhiere a las superficies.

Se encuentra en el agua, las plantas, el suelo y la epidermis de los animales. En la naturaleza, se encuentra comúnmente como plancton nadando a través del agua o como biopelícula. Excepcionalmente, *P. aeruginosa* puede sobrevivir en una variedad de temperaturas y medios con mala nutrición. Al ser un patógeno oportunista, *P. aeruginosa* requiere de una inmunodeficiencia para infectar a su huésped; y por esta razón, es una amenaza nosocomial tan importante para los pacientes con máquinas de ventilación, cánceres y quemaduras. La colonización de *P. aeruginosa* en el tracto respiratorio se asocia con sepsis y muerte.

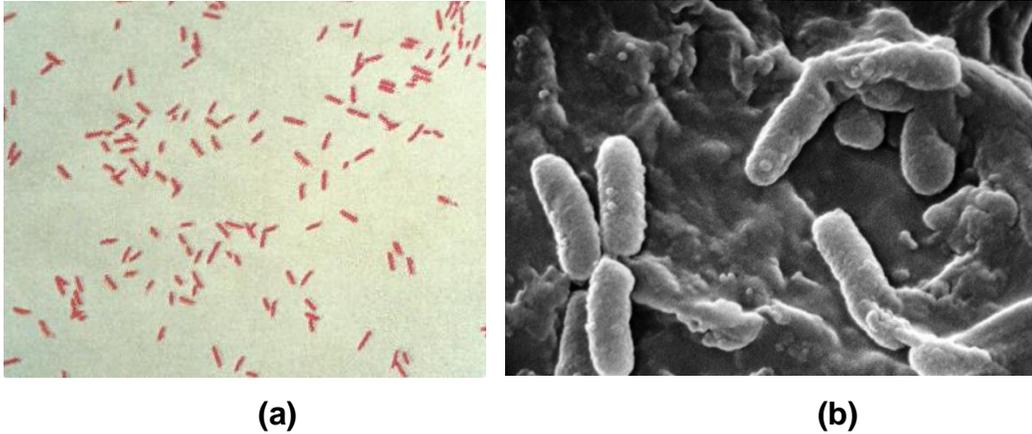


Figura 8. (a) Tinción Gram de *Pseudomonas aeruginosa* y (b) imagen de microscopía electrónica de barrido^[20].

Por otro lado, en este trabajo de tesis también se presenta un estudio preliminar sobre la interacción de las NPs de ZnO, CuO, ZnFe₂O₄ y CuFe₂O₄ con algunos componentes de la pared celular.

1.10 La pared celular bacteriana

La pared celular, también conocida como pared bacteriana; es una estructura fundamental para la bacteria. Se ubica inmediatamente antes de la membrana citoplasmática, es decir que es el elemento más externo de la bacteria; es una cubierta rígida que le da forma peculiar a la bacteria y la protege de los elementos externos, principalmente de los posibles cambios de presión osmótica que puedan surgir en el medio donde se encuentra.

La pared puede visualizarse mediante una técnica de tinción bacteriana de tipo diferencial, desarrollada por el científico Danés Christian Gram en 1884, la cual se conoce popularmente como tinción de Gram. Esta técnica de tinción se basa en la capacidad de las bacterias de retener el componente primario (cristal violeta), aún después de haber sido decoloradas con alcohol-acetona. Este comportamiento se debe a las diferencias estructurales de las paredes celulares de las bacterias. El resultado de la técnica clasifica a las bacterias como Gram-positivas (color violeta) y Gram-negativas (color rojo claro o rosado). En general el esqueleto de la pared celular bacteriana está constituido por un heteropolímero, el peptidoglicano o mureína. El peptidoglicano y las enzimas que intervienen en su síntesis, son una característica general de todas las bacterias.

El peptidoglicano o mureína está formado por una secuencia alterna de N-acetil-glucosamina y ácido N-acetilmurámico, unidos mediante enlaces β -1,4. La cadena es recta y no ramificada, constituyendo la estructura básica de la pared celular. El ácido N-acetilmurámico es un éter resultante de la unión del hidroxilo del C3 de la molécula de N-acetil-glucosamina con el hidroxilo del ácido láctico. El grupo ácido se enlaza con una pequeña cadena peptídica. Entre los aminoácidos típicos de esta cadena se encuentran la L-alanina, ácido D-glutámico, L-lisina, D-alanina y pentaglicina para las bacterias Gram-positivas, mientras que para las bacterias Gram-negativas se encuentran la L-alanina, D- glutámico, ácido m-diaminopimélico y la D-alanina, como se muestra en la Figura 9.

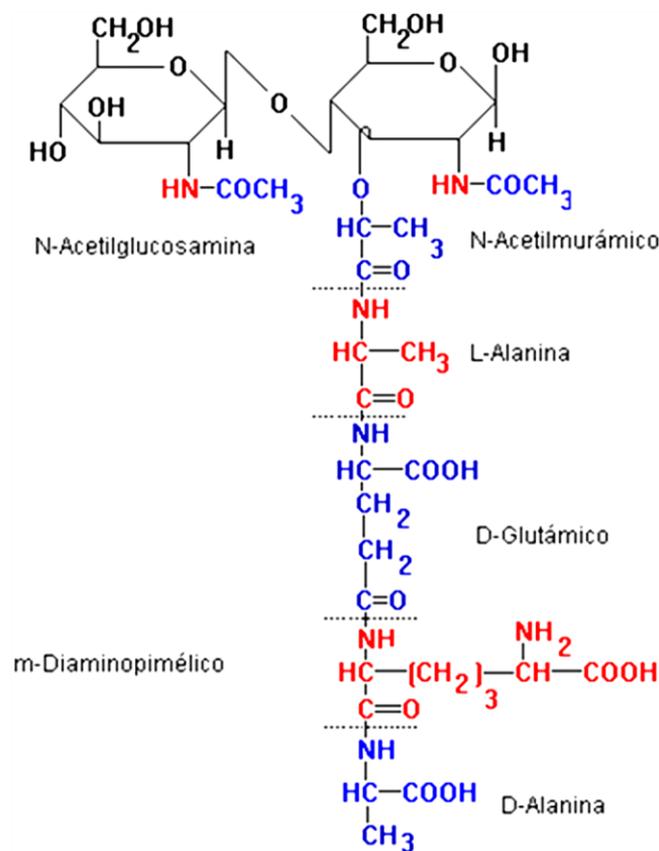


Figura 9. Componentes del peptidoglicano de bacterias Gram-positivas.

Los diaminoácidos al tener dos grupos amino pueden formar enlaces peptídicos con aminoácidos dicarboxílicos de otra cadena. A través de estas uniones peptídicas se unen entre sí las cadenas de heteropolímeros formando una molécula gigante, el sáculo de mureína o peptidoglucano.

2. Planteamiento del problema

Los antimicrobianos son los medicamentos que utilizamos para prevenir y tratar infecciones en humanos, animales y plantas. La resistencia antimicrobiana (RAM) ocurre cuando las bacterias, virus, hongos y parásitos no responden a los medicamentos, ocasionando que las infecciones sean cada vez más difíciles de tratar y así aumentando el riesgo de diseminación del patógeno, enfermedad severa y eventualmente la muerte. La RAM ha sido declarada por la OMS como una de las 10 primeras amenazas de la salud pública que enfrenta la humanidad y ésta se desarrolla principalmente debido al mal uso y sobre uso de las antimicrobianos que se utilizan en la actualidad; además de la falta de aplicación de protocolos para el correcto desecho de los medicamentos. El costo de la RAM a nivel mundial es significativo ya que no sólo es una carga para el sistema de salud de un gobierno, sino que también afecta la productividad de los pacientes y del personal de salud debido a estancias prolongadas en hospitales y la necesidad de cuidados intensivos y caros. Durante el 2019 se estima que 4.95 millones de personas fallecieron debido a una bacteria resistente a antimicrobianos, ya sea de manera directa o indirecta^[21]; siendo *P. aeruginosa* causante de aproximadamente 0.3 millones de muertes. Existen otras causas por las cuales un microorganismo se puede volver multirresistente y por lo tanto, otros aspectos por los cuales se puede evitar el desarrollo de infecciones por parte de estos microorganismos, como lo son la falta de acceso a agua limpia, poco acceso a los medicamentos de calidad y a precios accesibles, falta de conocimiento y conciencia de esta problemática, poca o nula legislación, y más importante la falta de protocolos para la sanitización e higiene para promover la prevención de enfermedades. Los nanomateriales han probado tener una actividad bactericida importante desde concentraciones muy pequeñas, lo que puede llegar a complementar las terapias actuales, sobre todo en la fase de contagio de la enfermedad. Su toxicidad está determinada por la morfología y el tamaño de partícula principalmente; características que dependen del método de síntesis utilizado. Debido a esto es que tanto las condiciones de síntesis, así como los precursores utilizados, son de suma importancia para la obtención de NPs con posible aplicación bactericida.

3. Justificación

A partir de la problemática presentada anteriormente, y a la falta de producción de nuevos antibióticos efectivos contra los microorganismos multirresistentes, hay una necesidad de encontrar alternativas para tratar y evitar estas infecciones. En los últimos tiempos, los nanomateriales han cobrado gran importancia debido a las aplicaciones que pueden tener en diversas áreas, y el área médica no se ha quedado atrás. Las nanoestructuras, debido a sus dimensiones de unos cuantos nanómetros y a su gran superficie específica, son una alternativa ideal como agentes antimicrobianos. Hay diversos sistemas nanoparticulados que tienen propiedades antimicrobianas en un rango amplio de concentraciones. Se busca que las nanopartículas sean selectivas hacia los patógenos, estables, robustas y económicas. NPs de Ag, TiO₂, ZnO y SiO₂, entre otros, han sido probados como agentes antimicrobianos en la industria textil, desinfección de agua y en la industria alimentaria en empaques. La eficacia de la actividad de los sistemas a tamaños nanométricos dependerá del tamaño de partícula y de los precursores utilizados en la síntesis. El método mecanoquímico es capaz de producir NPs que son estables y pueden tener actividad antimicrobiana, siendo una síntesis sencilla, que utiliza condiciones suaves de reacción y a un costo accesible. En este trabajo se utiliza este método de síntesis a partir de energía mecánica para obtener NPs de ZnO, CuO y de óxidos mixtos de estos metales, ZnFe₂O₄ y CuFe₂O₄; para posteriormente evaluar su actividad antimicrobiana contra dos bacterias modelo. También se evalúa la interacción de estas NPs con diferentes componentes de la pared celular para aportar en la investigación con relación a los posibles mecanismos de acción de estas NPs, centrándonos en la primera interacción que tienen los sistemas con la bacteria.

4. Hipótesis

- ❖ A partir de la mecanoquímica, una síntesis sencilla, económica, y de química verde, se obtendrán NPs de ZnO, CuO, ZnFe₂O₄ y CuFe₂O₄ con actividad antimicrobiana contra *S. epidermidis* y *P. aeruginosa*.
- ❖ Las NPs de ZnFe₂O₄ y CuFe₂O₄ tendrán una actividad antimicrobiana a menor concentración debido a la presencia de dos iones metálicos en la NPs.
- ❖ Se podrá determinar el tipo de interacción que tienen diferentes componentes de la pared bacteriana y las NPs sintetizadas utilizando la metodología mecanoquímica y la caracterización por espectroscopía Raman.

5. Objetivos

Objetivo General

- ❖ Sintetizar y evaluar las propiedades antimicrobianas de NPs de ZnO, CuO, ZnFe₂O₄ y CuFe₂O₄, obtenidas por un método mecanoquímico.

Objetivos Particulares

- ❖ Sintetizar nanoestructuras de ZnO, CuO, ZnFe₂O₄ y CuFe₂O₄ empleando un método mecanoquímico.
- ❖ Caracterizar dichas nanoestructuras por XRD de polvos, así como por diferentes técnicas espectroscópicas: UV-Visible, FT-IR, Raman, EPR y TEM.
- ❖ Evaluar la actividad antimicrobiana de las NPs obtenidas, frente a dos cepas de bacterias, una Gram-positiva (*Staphylococcus epidermidis*) y una Gram-negativa (*Pseudomonas aeruginosa*).
- ❖ Estudiar la interacción que se lleva a cabo entre dichas nanoestructuras y los aminoácidos (L-alanina, D-alanina, ácido D-glutámico y glicina) y polisacáridos (N-acetil-glucosamina y ácido N-acetil-murámico) constituyentes de la pared celular bacteriana.

6. Desarrollo Experimental

En esta sección se describe la metodología empleada para la obtención de las NPs de ZnO, CuO, ZnFe₂O₄ y CuFe₂O₄; así como las técnicas analíticas utilizadas para la caracterización de éstas. Posteriormente se presenta la metodología para evaluar la actividad antimicrobiana in vitro y las interacciones con los diferentes componentes de la pared bacteriana.

6.1 Reactivos empleados para la síntesis

Los reactivos empleados en las síntesis de las NPs objeto de estudio de este trabajo de tesis fueron los siguientes:

- Acetato de cobre monohidratado; Cu(CO₂CH₃)₂·H₂O (98%+ Sigma-Aldrich).
- Acetato de zinc dihidratado; Zn(CO₂CH₃)₂·2H₂O (99% Sigma-Aldrich).
- Acetilacetato de hierro Fe(C₅H₇O₂)₃ (99% Sigma-Aldrich).
- Hidróxido de sodio; NaOH (98% Sigma-Aldrich)
- Agua desionizada
- Acetona; CH₃(CO)CH₃ (≥99.5% Sigma-Aldrich)

6.2 Equipos empleados en la caracterización de las NPs

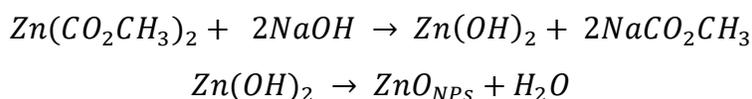
- Espectrofotómetro UV-Vis *Ocean Optics USB2000*, del laboratorio de Sistemas híbridos y nanoespectroscopía del Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología (ICAT), UNAM. Los espectros se obtuvieron a temperatura ambiente con un barrido de 180 nm a 800 nm empleando el método de reflectancia difusa.
- Espectrofotómetro de dispersión Raman *WITec* con láser Nd:YVO₄ de 532 nm con un aumento de 100x del Laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscópica (LUCE) del ICAT, UNAM. La potencia del láser se modificó de acuerdo con la muestra.
- Difractómetro de Rayos X *Siemens D5000*. Los difractogramas se obtuvieron con una radiación Cu K α ($\lambda=1.5406 \text{ \AA}$) en el laboratorio de Estado Sólido de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM
- Espectrómetro de Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR) *Elxsys E500 Bruker*, en banda X, de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAI) de la Facultad de Química de la UNAM. Los espectros de EPR se obtuvieron a temperatura ambiente.

- Espectrómetro de Absorción Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR por sus siglas en inglés) *Thermo Nexus* del LUCE del ICAT, UNAM.
- Microscopio Electrónico de Transmisión de Alta Resolución *FEI Tecnai F20*, emisión de campo 200 KV S/TEM con un lente *X-TWIN* y cañón de electrones de emisión de campo (FEG), del Instituto Mexicano de Petróleo. Las muestras se dispersaron en etanol y una gota de dicha dispersión se depositó en una rejilla de cobre cubierta con una capa de carbón.

6.3 Síntesis de las NPs

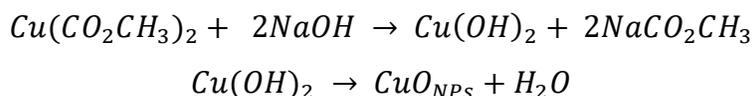
6.3.1 NPs de ZnO

Se pesaron 0.27 g (10^{-3} mol) de la sal de acetato de zinc (II) y 0.08 g (2×10^{-3} mol) de NaOH previamente molido. La molienda de ambos reactivos se llevó a cabo utilizando un mortero de ágata por aproximadamente 30 minutos, tiempo después del cual no se observó ningún cambio. El producto obtenido se lavó 4 veces con agua destilada y 2 veces con acetona, separando el precipitado por centrifugación a 3500 rpm por 10 minutos en cada caso. Finalmente, el producto obtenido se dejó secar al aire y se trató térmicamente en una mufla a 400°C por dos horas. La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



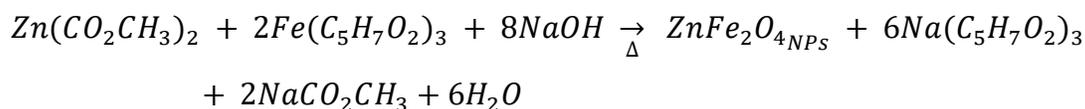
6.3.2 NPs de CuO

Se pesaron 0.18 g de acetato de cobre (10^{-3} mol) y se molieron con 0.08 g (2×10^{-3} mol) de NaOH previamente molido. La molienda se realizó por aproximadamente 20 minutos, tiempo después del cual no se observó ningún cambio. El producto obtenido se lavó 4 veces con agua destilada y 2 veces con acetona, separando el precipitado por centrifugación a 3500 rpm por 10 minutos en cada caso. Finalmente, el producto obtenido se dejó secar al aire y se trató térmicamente en una mufla a 400°C por dos horas. La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



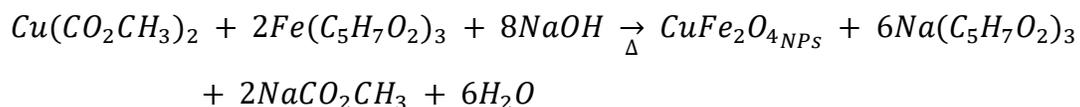
6.3.3 NPs de ZnFe₂O₄

La síntesis de las NPs de ZnFe₂O₄ se llevó a cabo de la siguiente manera. Se molieron 0.73 g de acetilacetonato de hierro (Fe(C₅H₇O₂)₃), equivalente a 2x10⁻³ mol, con 0.27 g de Zn(C₂H₃O₂)₂ durante 10 minutos. A la mezcla anterior se le añadieron 0.33g (8x10⁻³mol) de NaOH previamente molido, y se continuó la molienda hasta que no se observaron cambios en la consistencia y color del producto. El polvo obtenido se lavó 4 veces con agua destilada y 2 veces con acetona, separando el precipitado por centrifugación a 3500 rpm por 10 minutos en cada caso. Finalmente, el producto obtenido se dejó secar al aire y se trató térmicamente en una mufla a 400°C por dos horas. La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



6.3.4 NPs de CuFe₂O₄

Por otro lado, las NPs de CuFe₂O₄ se sintetizaron mediante el siguiente procedimiento. Se molieron 0.73g de Fe(C₅H₇O₂)₃ con 0.18g de Zn(C₂H₃O₂)₂ durante 10 minutos. Posteriormente se añadieron 0.33g de hidróxido de sodio previamente molido. La molienda se continuó hasta que no se observó ningún cambio. El producto obtenido se lavó 4 veces con agua destilada y 2 veces con acetona, separando el precipitado por centrifugación a 3500 rpm por 10 minutos en cada caso. Finalmente, el producto obtenido se dejó secar al aire y se trató térmicamente en una mufla a 400°C por dos horas. La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



El rendimiento de todas las reacciones fue de aproximadamente del 85% y se realizaron por triplicado, para garantizar la reproducibilidad del método de síntesis.

6.4 Pruebas antimicrobianas

Las pruebas antimicrobianas se realizaron en el Laboratorio de Biointerfases de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología.

6.4.1 Reactivos empleados para las pruebas antimicrobianas

- Cajas Petri
- Discos de papel filtro
- Asas de vidrio en L estériles
- Tubos de 1.5 y 2 mL
- Micropipetas y puntas estériles
- Placas de 96 pozos
- Agar Tripticasa-Soya (TSA) y Caldo Tripticasa-Soya (TSB)
- Las cepas bacterianas utilizadas para los ensayos antimicrobianos se obtuvieron de la *American Type Culture Collection* (ATCC®); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC®43636™) y *Staphylococcus epidermidis* (ATCC®14990™). Se cultivaron usando TSB y TSA) de *Becton-Dickinson, Microbiology Systems, BBL®*, adicionados con hemina y menadiona de Sigma-Aldrich.

6.4.2 Equipos empleados

- Incubadora Cleaver utilizada a 37°C por 24 horas en agitación a 100rpm para la incubación de placas de 96 pozos. Se operó a las mismas condiciones, sin agitación, para incubar las cajas Petri por 24 h.
- Esterilizador UV utilizado para esterilizar los tubos de 1.5 y 2mL, así como las NPs por 90 s.
- Estufa operada a 37°C por 24 h para la incubación de las cajas Petri.

Se realizaron 3 tipos de pruebas, las cuales se describen a continuación

6.4.3 Antibiogramas

Se realizaron antibiogramas como pruebas preliminares para evaluar la posible actividad antimicrobiana de las NPs obtenidas contra una cepa Gram (+) *Staphylococcus epidermidis* y una cepa Gram (-) *Pseudomonas aeruginosa*. Para lo cual se cortan círculos de papel filtro y se esterilizan. Posteriormente se pesan 50 mg/mL de las NPs y se dispersan en 1 mL de medio TSB. Los discos de papel filtro se sumergen en la dispersión de NPs aproximadamente 5 segundos, la cual se agita con un vórtex antes de sumergir el disco cada vez. Se colocan los discos sobre una placa de TSA previamente inoculada con la bacteria. Se incuban las placas por 24 h a 37°C y después se observa si hubo presencia de halos de inhibición. Se utiliza un disco sumergido en TSB como control negativo, para comprobar que el medio de cultivo no esté

contaminado. El control positivo utilizado es Clorhexidina (0.2%), con el cual se espera un efecto antimicrobiano. La Figura 10 muestra la disposición de los discos con los diferentes sistemas de NPs a probar, junto con los controles.

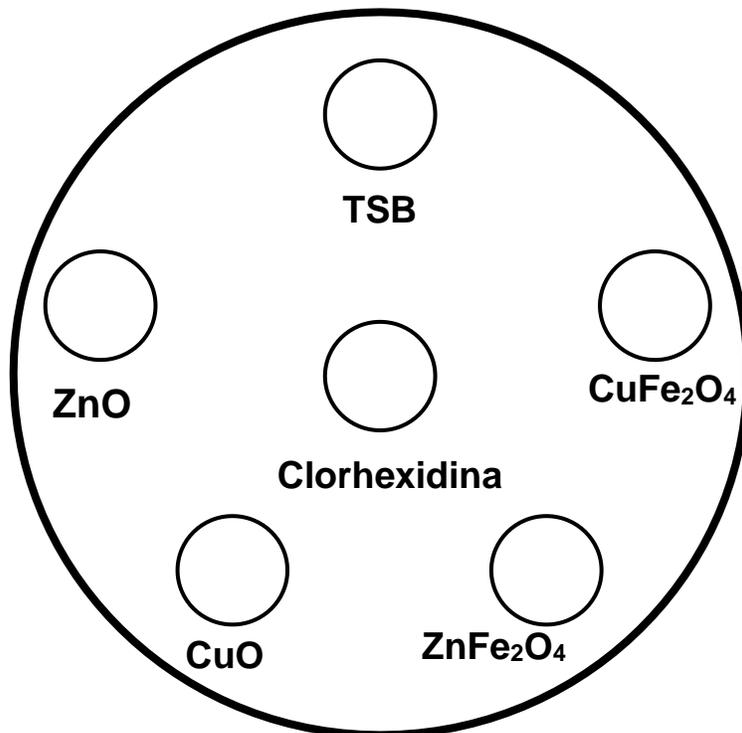


Figura 10. Posición de los discos en la placa de agar para la prueba de antibiogramas.

6.4.4 Concentración Mínima Bactericida (CMB)

La concentración mínima bactericida (CMB) se define como “la concentración más baja de un agente antimicrobiano necesaria para matar el 99.9% del inóculo final después de 24 h de incubación en un conjunto estandarizado de condiciones”. La CMB se puede determinar contando las unidades formadoras de colonias (UFC) que se pueden observar después de la microdilución, sub-cultivando una muestra. Lo que produce un crecimiento microbiano en la superficie de placas de agar no selectivo para determinar el número de células supervivientes. El experimento se llevó a cabo en placas de 96 pozos, por triplicado para cada bacteria y cada sistema sintetizado; ZnO, CuO, ZnFe₂O₄ y CuFe₂O₄. Se utilizaron 3 filas de 12 pozos cada una para cada cepa; de las cuales 3 pozos se utilizaron como controles. El pozo 10 fue el control negativo (-), que contiene medio de cultivo y bacterias, el pozo 11 fue el control positivo que

contiene clorhexidina (0.2%), medio de cultivo y bacterias, y finalmente el pozo 12 que fue el pozo doble negativo (=) que sólo contiene medio de cultivo TSB.

Se pesaron 150 mg de las NPs de ZnO, CuO, ZnFe₂O₄ o CuFe₂O₄ y se dispersaron en 1 mL de medio de cultivo TSB con ayuda de un vórtex. Se agregaron 200 µL de la dispersión de NPs al pozo 1, mientras que al resto de los pozos (1-9) se agregaron 100 µL de medio TSB. Posteriormente se tomaron 100 µL del pozo uno y se agregaron al pozo 2, se homogeniza y se vuelven a tomar 100 µL para agregarlos al pozo 3; el proceso se repite hasta el pozo 9 del cual se retiran 100 µL. Se agregaron 80 µL de medio de cultivo y 20 µL de suspensión de bacterias (10³ UFC¹) a todos los pozos. Las placas se introdujeron a la incubadora con agitación a 100 rpm a una temperatura de 37°C por 24 h. Finalmente se tomaron 10 µL de la suspensión de cada pozo y se sembraron en placas de agar TSA y se incubaron por 24 h a 37 °C. La Figura 11 muestra el diagrama de la placa con la concentración final de la dispersión de NPs en mg/mL.



Figura 11. Concentración aproximada de la dispersión de NPs para cada pozo.

¹ Unidad Formadora de Colonia se define como un propágulo único y viable que produce una sola colonia. La colonia es la población de células viables visibles al ojo humano en un medio de cultivo semisólido.

6.4.5 Dispersión en Agar

Se pesan 1.35 g de las NPs a estudiar y se dispersan en 50 mL de medio TSA, se agita y se vacía en cajas Petri. La concentración final en las cajas es aproximadamente de 27 mg/mL. Una vez gelificado el agar con las NPs, las cajas se inoculan con una dispersión de 10³ bacterias/mL de las especies a evaluar. Se lleva a cabo la inoculación de la bacteria en una caja Petri con TSA como control positivo. Las cajas se incuban a 37 °C por 24 h, después de este tiempo se hace el conteo de las UFC. El porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano se determinó a partir de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \left(\frac{UFC_{Control \text{ positivo}} - UFC_{NPs}}{UFC_{Control \text{ positivo}}} \right) * 100\%$$

6.5 Interacción de NPs con moléculas componentes de la pared celular

Los reactivos y equipo utilizado fueron los siguientes:

- Nanopartículas sintetizadas (ZnO, CuO, ZnFe₂O₄ y CuFe₂O₄)
- Moléculas componentes de la pared celular (L-alanina, D-alanina, ácido D-glutámico, glicina, N-acetil-glucosamina y ácido N-acetil-murámico, todas fueron adquiridas en *Sigma-Aldrich*)
- Mortero de ágata
- Tubos de 2 mL

El estudio de la interacción de las NPs sintetizadas con diferentes componentes de la pared celular, se llevó a cabo utilizando un método mecanoquímico. El procedimiento se describe a continuación. Cada uno de los sistemas de NPs obtenidos se hicieron reaccionar con un grupo de moléculas componentes de la pared celular; L-alanina, D-alanina, ácido D-glutámico, glicina, N-acetil-glucosamina ó ácido N-acetil-murámico, en relación 1:1. Se pesaron aproximadamente 0.015 g de las NPs y 0.015 g de las moléculas. Ambos sistemas se introdujeron en un mortero de ágata y se molieron por alrededor de 20 minutos. Posteriormente, el producto de la reacción se almacenó en un tubo para su posterior caracterización por espectroscopía de infrarrojo y Raman.

7. Resultados

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.

7.1 Óxido de Zinc

7.1.1 Caracterización por XRD de polvos

El producto obtenido de la síntesis descrita en la sección 6.3.1 se caracterizó por XRD. La Figura 12 muestra el difractograma obtenido para los cristalitas de ZnO; en éste se puede observar que todos los picos corresponden al ZnO en su fase hexagonal, wurtzita (tarjeta JCPDS* 89-7102). No se observan picos de difracción que puedan ser asignados a otras fases del ZnO.

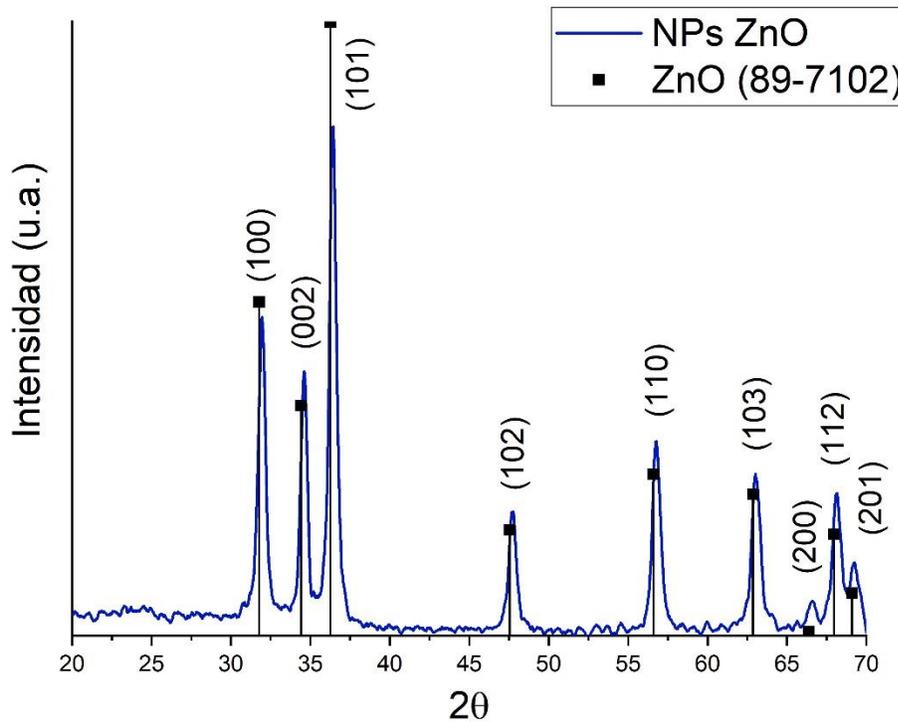


Figura 12. Difractograma de los cristalitas de ZnO.

A partir de la ecuación de Scherrer se calculó el diámetro promedio de cristalita para cada uno de los productos obtenidos:

$$D = \frac{k\lambda}{\beta_D \theta}$$

*Joint Committee on Powder Diffraction Standards

Donde D es la longitud del cristal, λ es la longitud de onda incidente ($\text{CuK}\alpha=1.54056 \text{ \AA}$), k es una constante con valor de 0.94, β_D es el ancho del pico a la mitad de la máxima intensidad y θ es la posición del pico. Se calculó el tamaño a partir de cada pico del difractograma, para posteriormente obtener el promedio y la desviación estándar. El resultado obtenido se presenta en la Tabla 2. Al estar presente el NaOH desde el inicio de la reacción, la fase de nucleación sucede rápido y así la fase de crecimiento se ve inhibida lo que resulta en un tamaño de cristalita pequeño.

Tabla 2. Tamaño promedio de cristalita del ZnO.

Óxido	Diámetro promedio de cristalita(nm)	Desviación estándar
ZnO	14.7	0.7

7.1.2 Caracterización por TEM

La Figura 13 (a) muestra una micrografía representativa obtenida por TEM de las NPs de ZnO. Se observan NPs poligonales ligeramente alargadas de tamaño entre 17 y 20 nm aproximadamente, como se muestra el histograma presentado en la Figura 13 (b). El tamaño de partícula obtenido por esta técnica es mayor al tamaño promedio de cristalita obtenido por XRD, esto debido a que una partícula puede estar formada por más de un cristal generando una medición mayor en el tamaño de partícula.

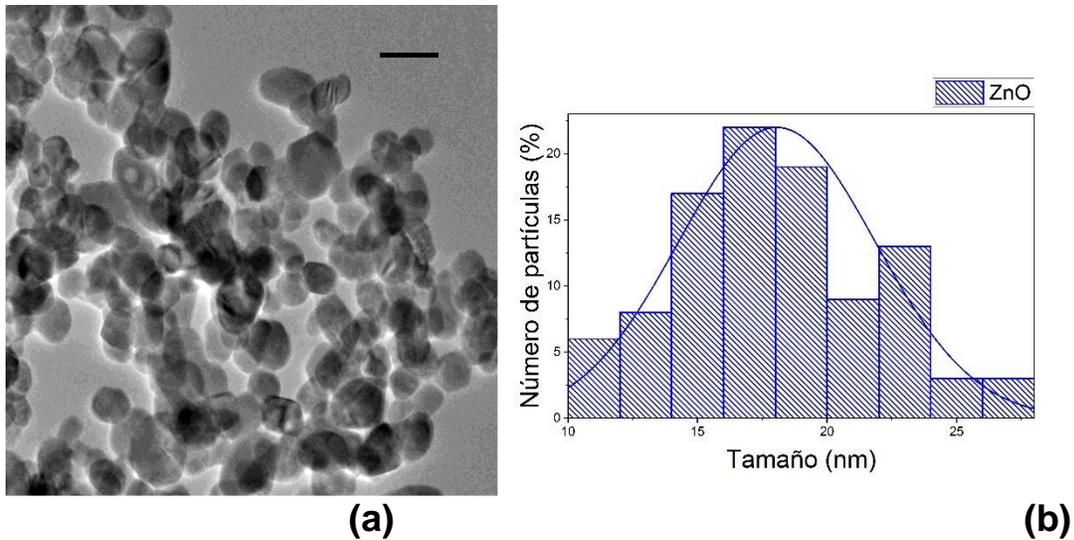


Figura 13. (a) Micrografía de TEM representativa de las NPs de ZnO y **(b)** histograma de distribución de tamaño de partícula.

7.1.3 Caracterización por Espectroscopía de Absorción UV-Vis

La Figura 14(a) muestra el espectro de absorción UV-Visible obtenido por la técnica de reflectancia difusa (RD) para las NPs de ZnO; en éste se observa una banda con un borde de absorción en 400 nm. A partir de este espectro se llevó a cabo el cálculo del valor de la brecha energética óptico utilizando el método de Tauc. La fórmula empleada es:

$$(\alpha h\nu)^2 = A(h\nu - E_g)$$

Donde E_g es el valor de brecha energética en eV, h es la constante de Planck equivalente a $4.14 \cdot 10^{-15}$ eV, α es el coeficiente de absorción y ν es la frecuencia del fotón. La gráfica resultante se muestra en la Figura 14(b) donde se obtiene el valor de brecha energética a partir de la extrapolación de la recta correspondiente al borde de absorción y determinando su intersección con el eje x. En este caso el valor de la brecha energética para las NPs de ZnO sintetizadas fue de 3.2 eV, el cual es el esperado para este sistema^[22].

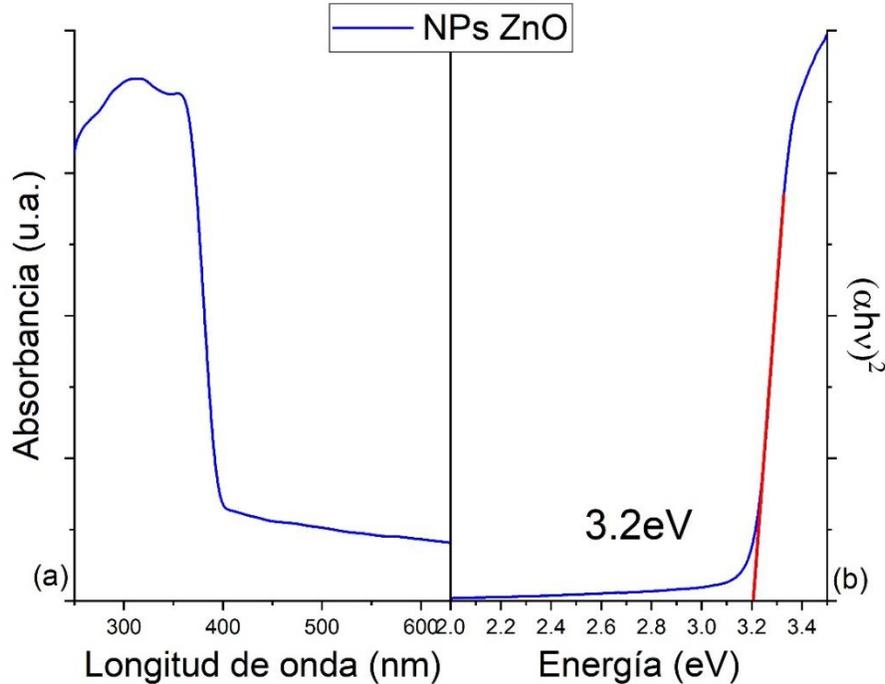


Figura 14. (a) Espectro UV-Visible y **(b)** gráfica de Tauc de las NPs de ZnO.

7.1.4 Caracterización por Espectroscopía Raman

Para un cristal perfecto de ZnO, sólo los fonones ópticos están involucrados en la dispersión Raman de primer orden. La teoría predice la existencia de los siguientes modos ópticos.

$$\Gamma_{opt} = A_1 + 2B_1 + E_1 + 2E_2$$

Donde tanto A_1 como E_1 son modos polares y se dividen en componentes ópticos transversos (TO) y ópticos longitudinales (LO). El modo E_2 consiste en dos fonones, uno a baja frecuencia (E_2 bajo) debido a la vibración de la sub-red de zinc y otro a alta frecuencia (E_2 alto), atribuido a la vibración de los átomos de oxígeno. Estos modos son activos en Raman, los cuales corresponden a una banda en el espectro Raman. El modo B_1 es no polar y también tiene dos frecuencias, baja y alta; sin embargo, este modo es silencioso en Raman.

La Figura 15 muestra el espectro Raman de las NPs de ZnO, donde se observan las bandas esperadas para este sistema en 198, 317, 424, 548 y 640 cm^{-1} . Todas las bandas se observan anchas y corridas hacia frecuencias menores respecto a las bandas para un sistema másico, lo que confirma la presencia de una fase única de unos cuantos nanómetros. La banda observada en 548 cm^{-1} correspondiente al modo A_1 se ha asociado a vacancias de oxígeno^[22].

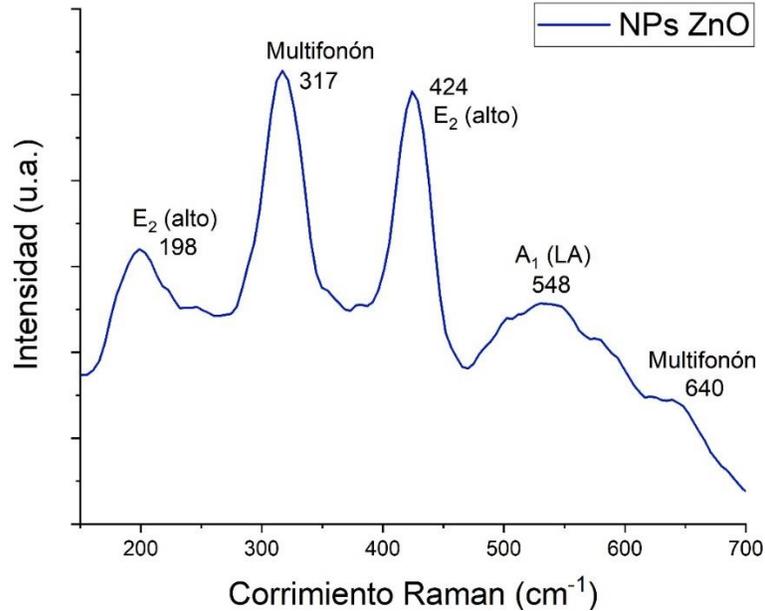


Figura 15. Espectro Raman de las NPs de ZnO.

7.1.5 Caracterización por Espectroscopía FT-IR

Las NPs de ZnO fueron caracterizadas por Espectroscopía FT-IR cuyo espectro se muestra en la Figura 16. Se puede observar la presencia de una banda intensa a 447 cm^{-1} debida a la vibración $\nu(\text{Zn-O})$. Además, se pueden observar otras bandas alrededor de 3450 cm^{-1} y a 1440 cm^{-1} las cuales se atribuyen a movimientos de estiramiento del grupo hidroxilo, lo que indica la presencia de una cantidad pequeña de agua en la superficie de la nanopartícula^[9]. La presencia de O-H es común en este tipo de NPs debido a la naturaleza higroscópica del ZnO, y puede ser de relevancia al momento de evaluar la actividad antimicrobiana.

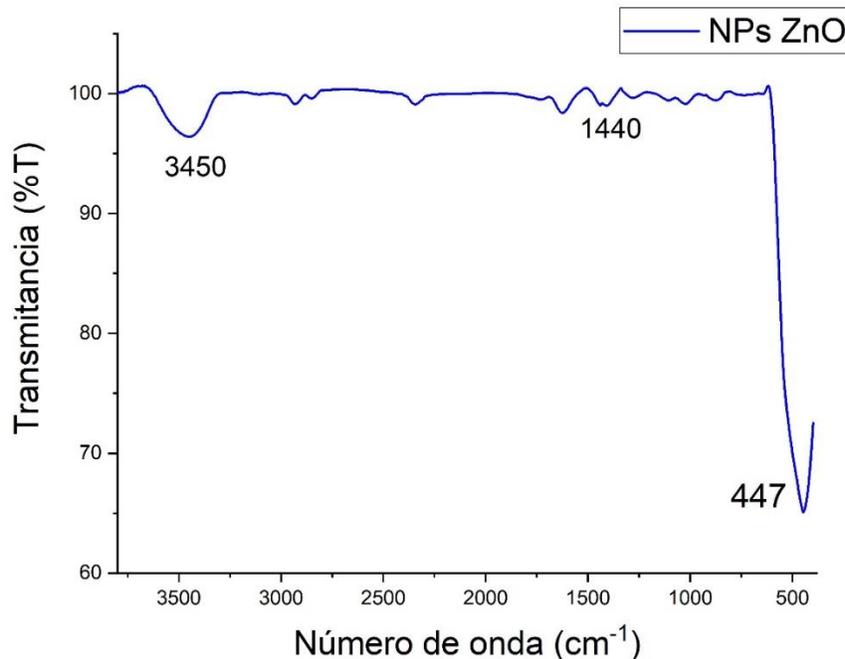


Figura 16. Espectro de Infrarrojo de las NPs de ZnO.

7.1.6 Caracterización por EPR

Las NPs obtenidas se caracterizaron por EPR en banda X, a temperatura ambiente. A partir de las señales observadas en el espectro (Figura 17) se calcularon los valores de la constante magnetogírica (g) a partir de la siguiente ecuación:

$$g = \frac{h\nu}{\beta H}$$

Donde h es la constante de Planck (6.6260×10^{-27} erg*seg), ν es la frecuencia de las microondas (9.859267×10^9 Hz), β es el magnetón nuclear de Bohr (9.2740×10^{-21} erg/Gauss) y H la intensidad del campo magnético (Gauss). En el espectro de EPR de las NPs de ZnO se observan tres señales: una señal ancha alrededor de 3400 G, una señal angosta cerca de 3500 G, y una banda más pequeña en 3600 G. Los valores de g obtenidos se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Valores de g.

Campo magnético (Gauss)	g
3377.75	2.085
3519.67	2.001
3573.32	1.970

Señales EPR con valores similares de g, han sido observadas por otros autores; la señal con valor de $g=1.97$ se ha atribuido a la presencia de vacancias de oxígeno ionizado (V^+_{O}), vacancias de zinc (V_{Zn}), así como zinc (Zn_i) y oxígeno (O_i) intersticiales. La señal ancha ($g= 2.085$) se ha atribuido a defectos producidos en la red debido a un exceso de vacancias de zinc, así como a un acoplamiento de defectos como vacancias negativas de zinc y vacancias de zinc intersticial $V^-_{Zn}:Zn_i$. La señal con un valor de g de 2.001 se ha atribuido a vacancias de zinc ionizado o incluso a electrones desapareados atrapados en vacancias de oxígeno los cuales generan centros paramagnéticos^[23]. Sin embargo, el origen de las diferentes señales sigue en debate, se ha aceptado la teoría de la formación de partículas tipo núcleo-coraza para el sistema de ZnO como se muestra en la Figura 17^[24]. La señal de 1.97 se ha asociado a defectos de la parte del centro (núcleo), y es una señal que aparece sin importar la morfología o el tamaño de la partícula; mientras que las señales de 2.001-2.005 se han asociado a los defectos de la parte superficial (coraza) y aparecen cuando las partículas tienen un diámetro menor a 50 nm. Debido al tipo de defectos presentes, la parte del centro en este modelo tiene carga negativa por las vacancias de zinc, y la capa externa tiene una carga positiva. El que ambas señales se observen en las NPs obtenidas, confirma que el tamaño de las partículas es pequeño, así como la presencia de diferentes defectos paramagnéticos en la estructura del ZnO. Cabe mencionar que el ZnO másico no presenta espectro de EPR ya que es un sistema típicamente diamagnético.

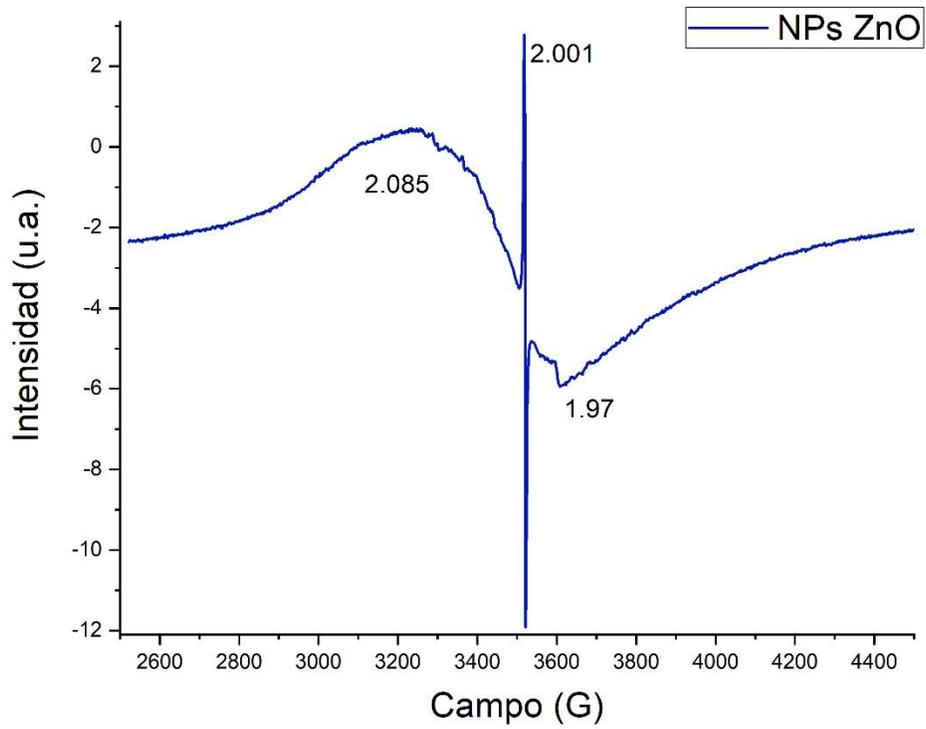


Figura 17. Espectro de EPR de las NPs de ZnO.

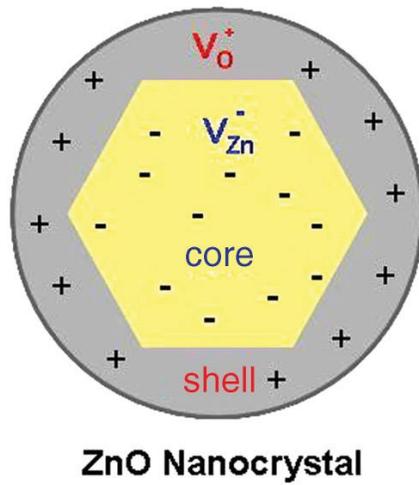


Figura 18. Propuesta de la distribución de los defectos paramagnéticos en las NPs de ZnO. Diagrama tomado de [24]

7.2 Óxido de Cobre

7.2.1 Caracterización por XRD de polvos

A continuación, se discuten los resultados relacionados con las NPs de CuO. En la Figura 19 se muestra el difractograma de los cristalitas de CuO, obtenidos siguiendo el procedimiento presentado en la Sección 6.3.2. Se pueden observar todas las reflexiones correspondientes al CuO en su fase monoclinica (tarjeta JCPDS 85-2529).

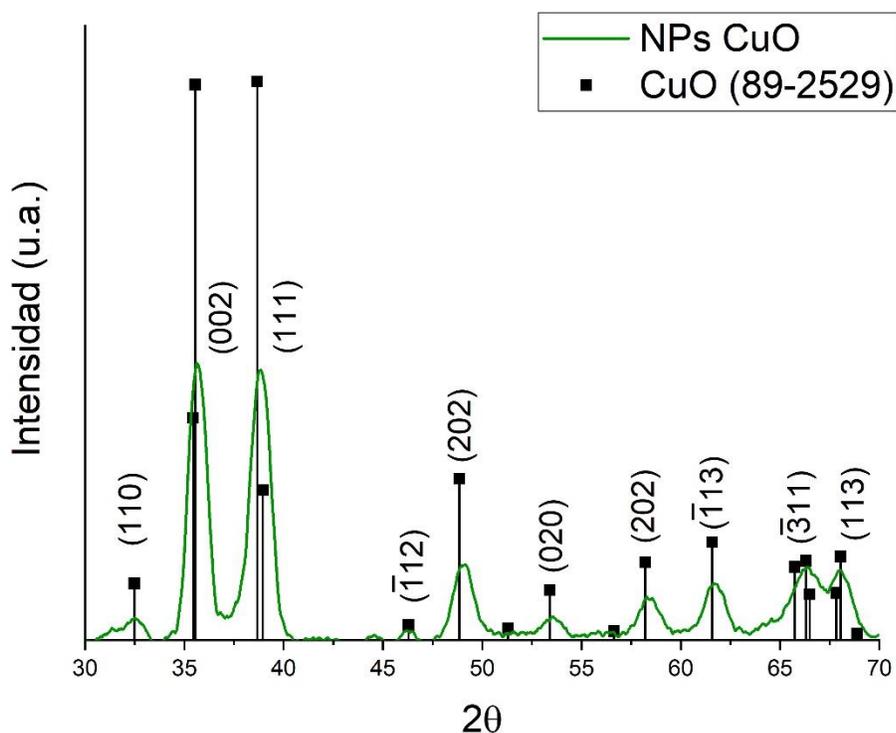


Figura 19. Difractograma de los cristalitas de CuO.

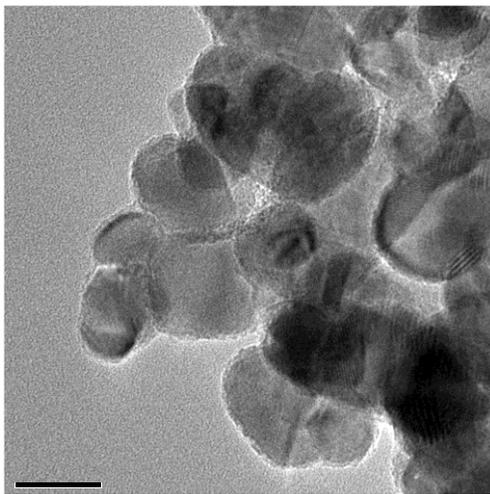
Se empleó la ecuación de Scherrer para calcular el diámetro promedio de cristalita, los resultados se muestran en la Tabla 4. Se observa que los tamaños de cristalita son cercanos a 10 nm. Este resultado es consistente con lo observado para las partículas de ZnO, lo que fue explicado por la velocidad de nucleación, mediada por el medio básico.

Tabla 4. Tamaño promedio de cristalita del CuO.

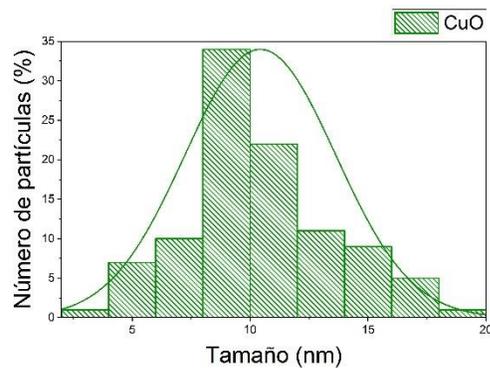
Óxido	Diámetro promedio de cristalita(nm)	Desviación estándar
CuO	8.7	1.0

7.2.2 Caracterización por TEM

Se obtuvieron las micrografías por TEM de las NPs sintetizadas en la Sección 6.3.2. Una micrografía representativa se muestra en la Figura 20 (a) donde se observa que las NPs tienen una morfología poligonal. La Figura 20 (b) muestra el histograma donde se observa que el tamaño promedio de partícula entre 10 y 15 nm, el cual es mayor al tamaño promedio de cristalita obtenido por la técnica de XRD; esto debido a que varios cristales pueden conformar una partícula.



(a)



(b)

Figura 20. (a) Micrografía de TEM representativa de las NPs de CuO y (b) histograma de distribución de tamaño de partícula.

7.2.3 Caracterización por Espectroscopía de Absorción UV-Vis

El espectro de absorción UV-Visible de las NPs de CuO se obtuvo empleando la técnica de RD. A partir de éste se estimó el valor de la brecha energética óptica, utilizando la ecuación de Tauc. El espectro de absorción, Figura 21 (a), muestra una banda centrada alrededor de 500 nm. Esta banda es ancha ya que las NPs de CuO son de color café oscuro y absorben en toda la región del visible. Por otro lado, en la Figura 21 (b) se observa la gráfica de Tauc, en donde se observa

un valor de brecha energética estimado en 2.5 eV. El valor de brecha energética para este sistema es de 1.7 a 2.2eV^[12], así que observamos un corrimiento en el valor obtenido experimentalmente de estas NPs confirmando que son de tamaño nanométrico.

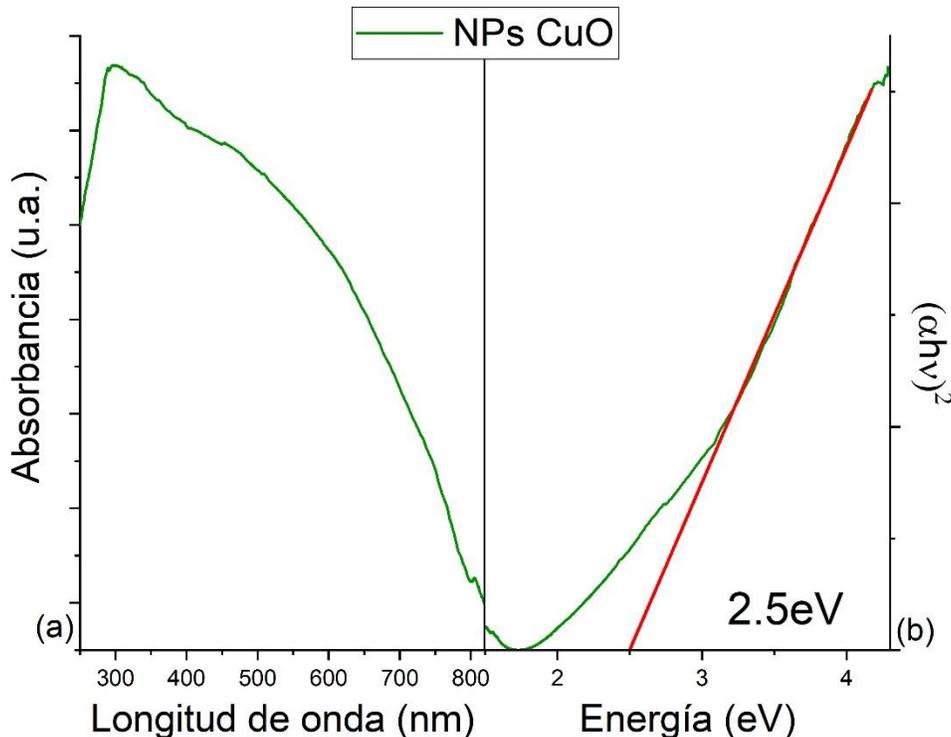


Figura 21. (a) Espectro UV-Visible y **(b)** gráfica de Tauc de las NPs de CuO.

7.2.4 Caracterización por Espectroscopía Raman

Por otro lado, el óxido de cobre presenta los siguientes modos vibracionales:

$$\Gamma_{opt} = A_g + 2B_g + 4A_u + 5B_u$$

El CuO presenta 9 modos ópticos, de los cuales 3 son activos en Raman, con simetrías A_g y B_g , mientras que 6 son activos en el Infrarrojo ($3A_u + 3B_u$). Los modos Raman A_g y B_g sólo involucran el movimiento de los átomos de oxígeno, mientras que los modos activos en Infrarrojo involucran el movimiento de ambos átomos. En la Figura 22 se observan 3 bandas anchas correspondientes a los 3 modos característicos de este sistema en 270 (A_g), 319 y 597($2B_g$) cm^{-1} ^[25], lo que confirma la composición de las NPs de CuO obtenidas. La posición de las señales observadas se ven

desplazadas a la izquierda respecto al material másico, lo que indica un efecto importante de confinamiento, debido al tamaño reducido de las NPs.

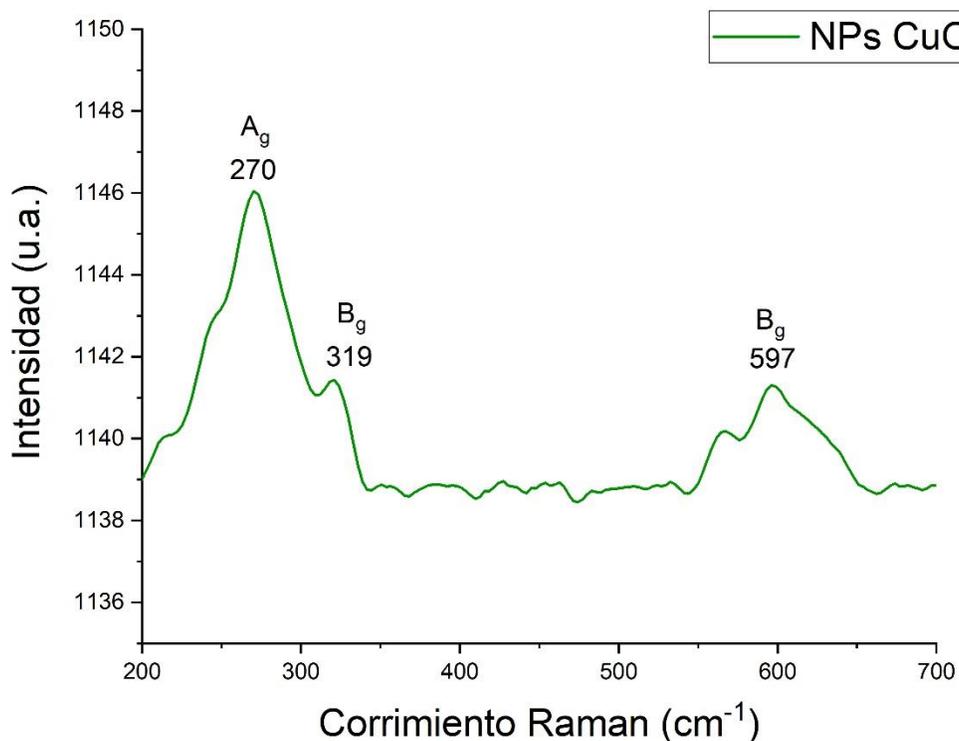


Figura 22. Espectro Raman de las NPs de CuO.

7.2.5 Caracterización por Espectroscopía FT-IR

La Figura 23 muestra el espectro FT-IR de las NPs de CuO obtenidas en este trabajo. Se pueden observar dos bandas características de este sistema en 525 y 586 cm⁻¹ las cuales se asignan al estiramiento del enlace n(Cu-O); la banda en 525 cm⁻¹ corresponde al modo vibracional B_u, mientras que la otra señal observada en 586 cm⁻¹ se debe al modo óptico vibracional longitudinal (LO). Debido a que las NPs tienen una alta relación área-volumen son capaces de absorber humedad del ambiente, lo que resulta en agua adsorbida en su superficie y esto explica la presencia de una banda alrededor de 3450 cm⁻¹[17].

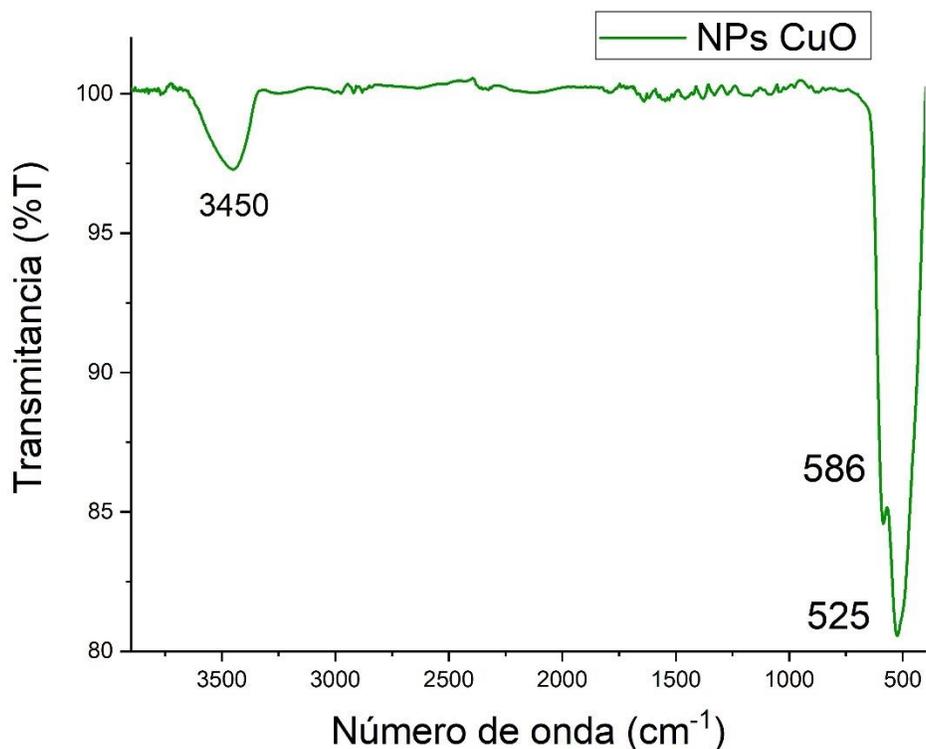


Figura 23. Espectro de Infrarrojo de las NPs de CuO.

7.2.6 Caracterización por EPR

Se obtuvo el espectro de EPR del polvo de las NPs de CuO el cual se muestra en la Figura 24. En éste se observa una señal ancha alrededor de 3150 G, cuyo valor de g es 2.22. Esta señal se ha asociado al acoplamiento de dos Cu^{2+} , o incluso a monómeros de Cu^{2+} presentes de manera aislada en las NPs de CuO ^[26]. Es importante mencionar que el CuO másico presenta una señal EPR muy ancha e intensa, siendo muy diferente al espectro obtenido cuando el sistema tiene dimensiones de unos cuantos nanómetros.

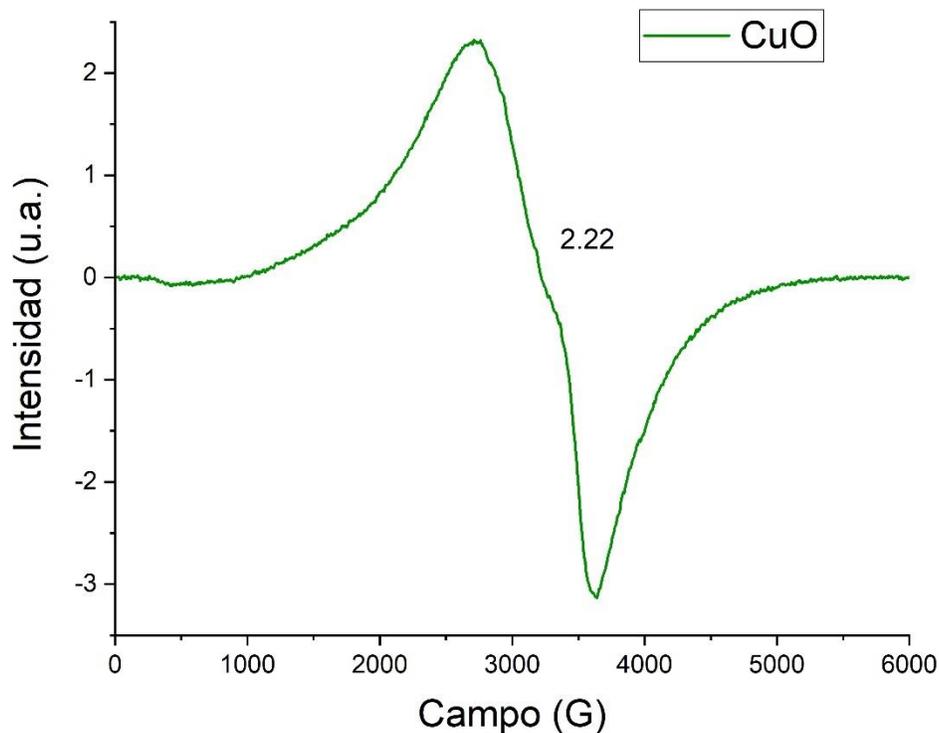


Figura 24. Espectro de EPR de las NPs de CuO.

7.3 Ferrita de Zinc (ZnFe_2O_4)

7.3.1 Caracterización por XRD de polvos

La Figura 25 muestra el difractograma de las NPs de ZnFe_2O_4 obtenidas en este trabajo. En su difractograma se observan todos los picos de la espinela de zinc en fase cúbica (tarjeta JCPDS 89-7412), que es la fase esperada para este sistema. No se observan reflexiones debido a impurezas de ZnO o de Fe_2O_3 , por lo que la ferrita aparece como fase única.

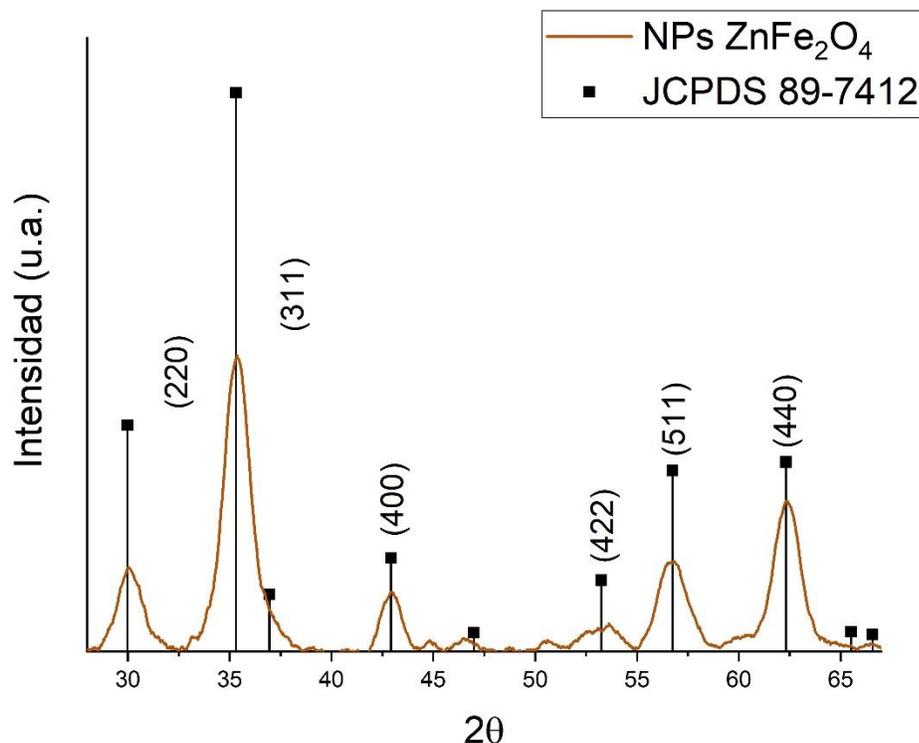


Figura 25. Difractograma de los cristalitas de ZnFe_2O_4 .

Se calculó el tamaño de promedio de cristalita de ZnFe_2O_4 a partir de la ecuación Scherrer. El resultado se muestra en la Tabla 5 donde se observa que el tamaño promedio es de aproximadamente 7nm.

Tabla 5. Tamaño promedio de cristalita para la ferrita de ZnFe_2O_4 .

Ferrita	Diámetro promedio de cristalita (nm)	Desviación estándar
ZnFe_2O_4	6.4	0.6

7.3.2 Caracterización por TEM

Por otro lado, en la Figura 26 (a) se muestra una micrografía representativa, obtenida por TEM. En ésta se logra observar que la morfología de las NPs de ZnFe_2O_4 es cúbica. Adicionalmente se realizó el histograma presentado en el inserto de la Figura 26 (b), observándose una distribución de tamaño entre los 5 y 10 nm. El tamaño promedio de partícula observado por esta técnica es mayor al tamaño promedio de cristalita obtenido por XRD, esto debido a que varios cristales forman una partícula.

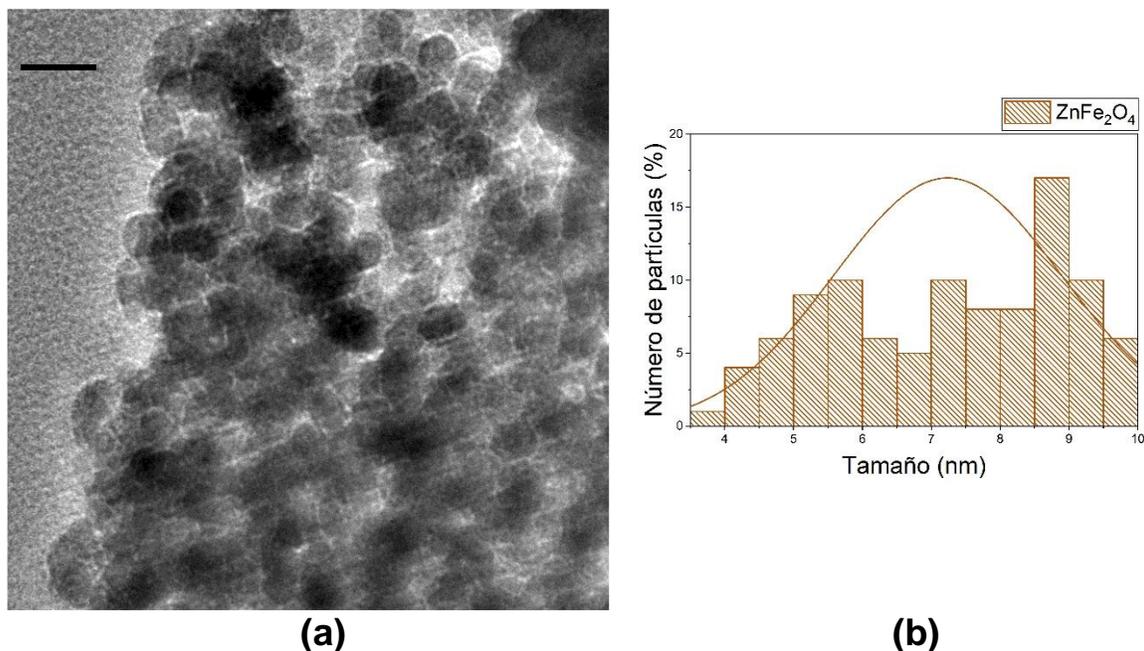


Figura 26. (a) Micrografía de TEM representativa de las NPs de ZnFe₂O₄ y **(b)** histograma de distribución de tamaño de partícula.

7.3.3 Caracterización por Espectroscopía de Absorción UV-Vis

A partir de la caracterización por espectroscopía de absorción UV-Visible usando la técnica de reflectancia difusa, se calculó el valor de la brecha energética utilizando la ecuación de Tauc. En el espectro de absorción en la Figura 27 (a) se observa una banda de absorción ancha, con un máximo aproximadamente a 308 nm y un borde de absorción en 480 nm. Por otro lado, en la Figura 27 (b) se presenta la gráfica de Tauc, en ésta se observa que la brecha energética óptica para este sistema es de 2.6 eV. Dicho valor coincide con lo informado en la literatura para NPs de ZnFe₂O₄.

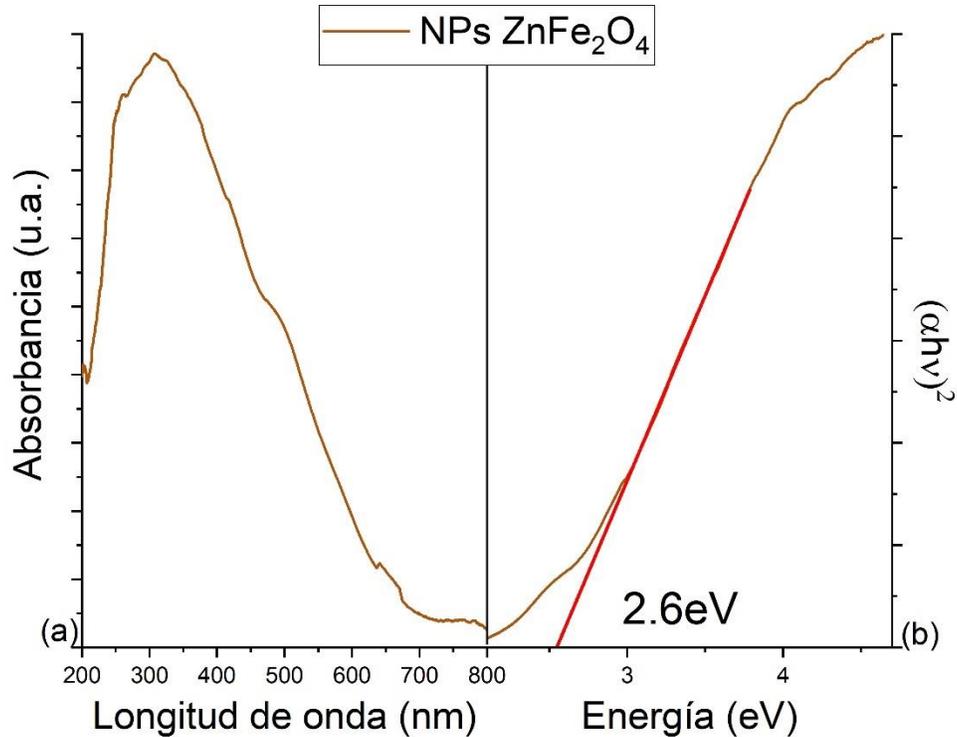


Figura 27. (a) Espectro UV-Visible y **(b)** gráfica de Tauc de las NPs de ZnFe_2O_4 .

7.3.4 Caracterización por Espectroscopía Raman

La espinela de ZnFe_2O_4 es un sistema que cristaliza en forma cúbica y pertenece al grupo espacial $Fd3m$, teniendo 56 átomos en cada celda unitaria. La teoría de grupos predice los siguientes modos vibracionales para esta espinela:

$$\Gamma_{opt} = A_{1g} + E_g + F_{1g} + 3F_{2g} + 2A_{2u} + 2E_u + 4F_{1u} + 2F_{2u}$$

Siendo 4 modos activos en infrarrojo ($4F_{1u}$), 5 modos activos en Raman ($A_{1g} + E_g + 3F_{2g}$), y el resto de los modos son inactivos. En la Figura 28 se presenta el espectro Raman de las NPs de ZnFe_2O_4 ; en éste se observan 4 modos vibracionales en 332 , 656 , 238 y 475 cm^{-1} , con simetrías E_g , A_{1g} y $2F_{2g}$ respectivamente. El modo A_{1g} por arriba de 600 cm^{-1} se ha relacionado con el movimiento del oxígeno en los grupos tetraédricos AO_4 . Las otras señales observadas se han relacionado al movimiento de los átomos en los grupos octaédricos BO_6 . El modo E_g se debe al doblamiento simétrico de los enlaces Fe-O. Los modos F_{1g} se han relacionado al estiramiento asimétrico de dichos enlaces^[27, 28]. Esta técnica permite confirmar la pureza y composición de la

fase. Nuevamente, la posición de las señales observadas se ven desplazadas a la izquierda respecto al material másico, lo que indica un efecto importante de confinamiento, debido al tamaño reducido de las NPs.

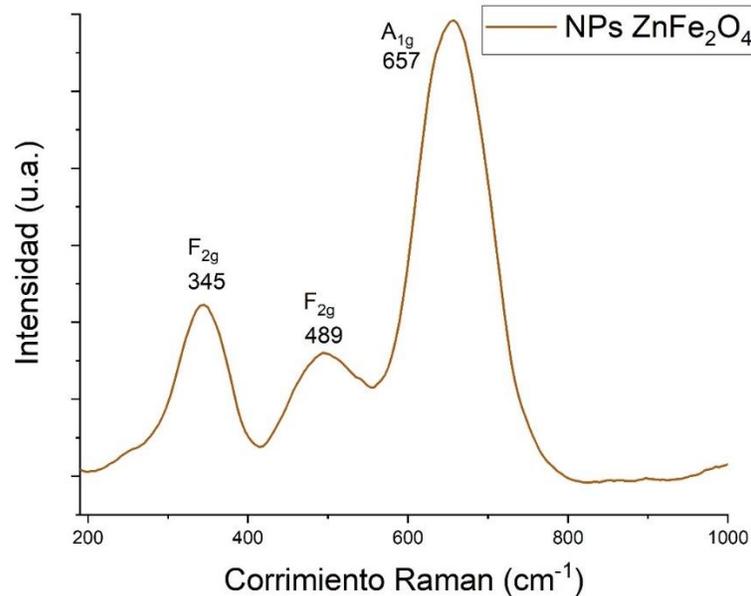


Figura 28. Espectro Raman de las NPs de ZnFe₂O₄.

7.3.5 Caracterización por Espectroscopía FT-IR

Se llevó a cabo la caracterización de la ferrita de zinc, ZnFe₂O₄, por espectroscopía infrarroja (FT-IR) obteniéndose el espectro mostrado en la Figura 29. En éste se observan tres bandas intensas correspondientes a la vibración metal oxígeno en la estructura cristalina. La banda en 461 cm⁻¹ (ν_2) se ha asignado a la vibración del enlace Zn-O en los sitios octaédricos, mientras que la banda de 588 cm⁻¹ (ν_1) al estiramiento del enlace Fe-O en los sitios tetraédricos. Adicionalmente se puede observar una pequeña banda junto a la señal ν_1 denominada ν_1' en 765 cm⁻¹, la cual se ha relacionado con una migración parcial del catión zinc hacia sitios octaédricos. Si bien este sistema es una espinela normal, cuando el tamaño de partícula se reduce a tamaños nanométricos hay una inversión parcial debido al intercambio de cationes entre sitios tetraédricos y octaédricos. En el espectro también se observa una banda en 1093 cm⁻¹ correspondiente a la vibración del enlace Zn-Fe^[29]. La posición e intensidad de las bandas dependerá de la longitud de los enlaces presentes, los cuales se ven afectados por la posición de los cationes en los diferentes sitios de la estructura cristalina que a su vez dependen del método de síntesis utilizado.

Adicionalmente se observan bandas en 3500 cm^{-1} y 1500 cm^{-1} debido al enlace O-H de moléculas de agua adsorbidas en la superficie de las partículas^[30].

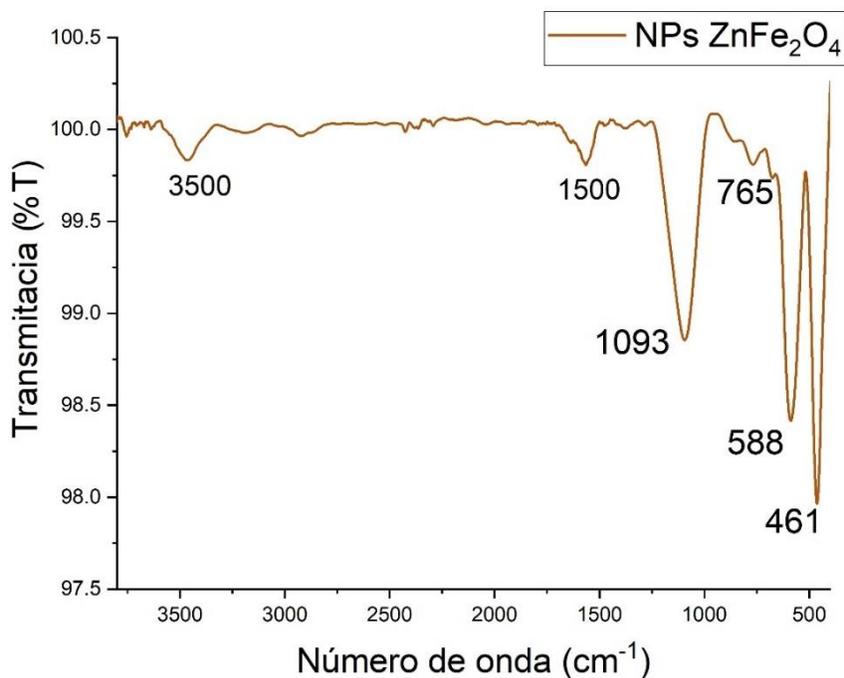


Figura 29. Espectro de Infrarrojo de las NPs de ZnFe₂O₄.

7.3.6 Caracterización por EPR

Se realizó la caracterización de las NPs de ZnFe₂O₄ por EPR. La Figura 30 muestra el espectro correspondiente. En éste se observa una banda ancha característica de las ferritas nanoestructuradas con un comportamiento superparamagnético. Generalmente la señal se debe a diferentes factores como la interacción dipolo-dipolo, interacciones spin-red cristalina, interacciones del spin con el campo de radiación y el movimiento los spines desapareados. El valor de g en 1.97 se ha relacionado con la presencia del radical superóxido O₂⁻ con un electrón desapareado, en la superficie de las NPs. Se ha propuesto que una señal con valor de g cercana a 2 se debe a vacancias de oxígeno V_o y a electrones desapareados en dichas vacancias, dichos electrones confinados pueden ser transferidos al oxígeno adsorbido a la molécula lo que resulta en la generación del radical O₂⁻.^[31]

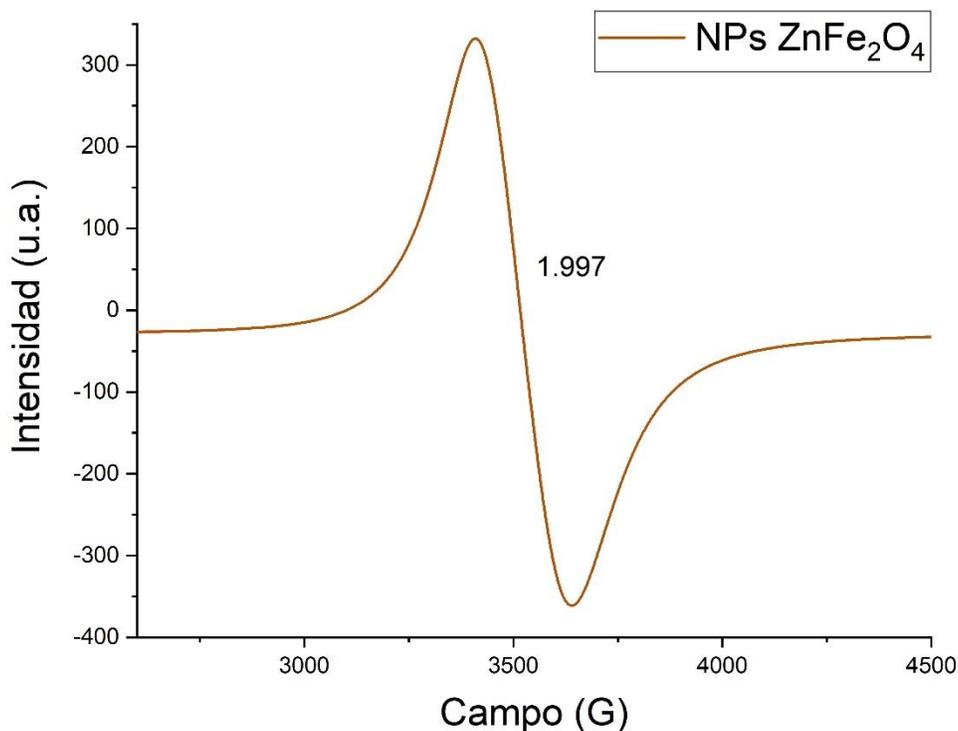


Figura 30. Espectro de EPR de las NPs de ZnFe₂O₄.

7.4 Ferrita de Cobre (CuFe₂O₄).

7.4.1 Caracterización por XRD de polvos

La ferrita de cobre, CuFe₂O₄, obtenida a partir de la reacción de la Sección 6.3.4, presenta el difractograma mostrado en la Figura 31. Esta ferrita cristaliza de forma mayoritaria en forma cúbica, de acuerdo con la tarjeta JCPDS 25-0283. Sin embargo, en este caso también se observa la presencia de otras reflexiones que pertenecen a la fase tetragonal del sistema (JCPDS 34-0425). La temperatura de transición (T_t) de la fase cúbica a la tetragonal es principalmente dependiente del método de síntesis; además, las distorsiones de tipo *Jahn Teller* debido a la presencia de cobre favorecerán el predominio de una u otra fase. Se ha informado que la T_t puede ser de 400°C si el enfriamiento de la muestra, posterior al tratamiento térmico, se hace de manera lenta. El método de síntesis llevado a cabo en este trabajo, así como el hecho de que las muestras fueron enfriadas lentamente a temperatura ambiente, pudo favorecer la coexistencia de las dos fases.

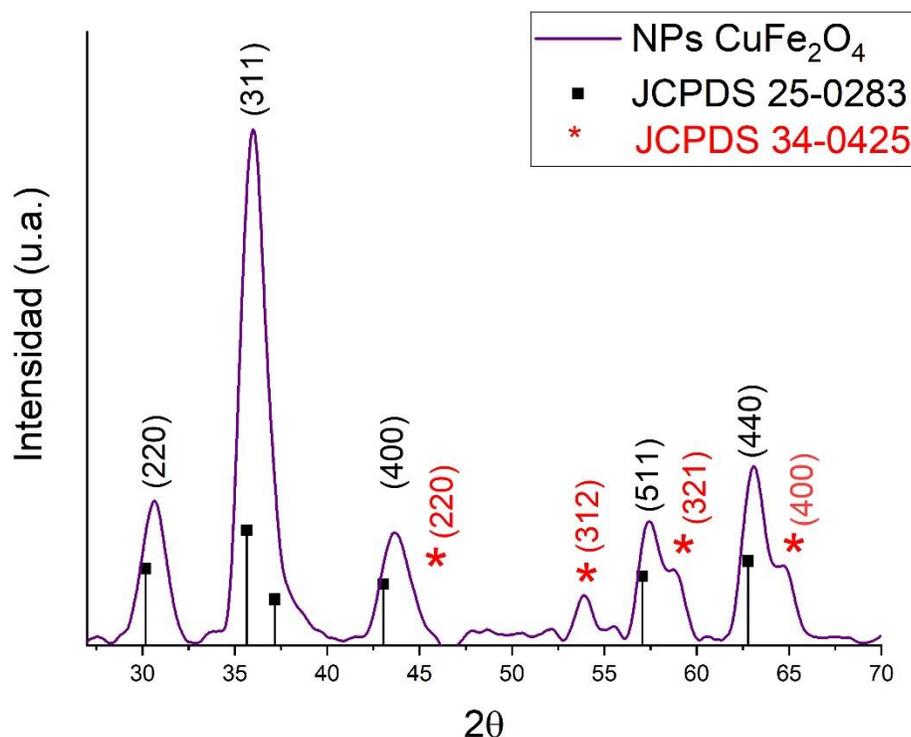


Figura 31. Difractograma de los cristalitas de CuFe_2O_4 .

En la Tabla 6 se muestra el resultado obtenido para el cálculo promedio de cristalita para la ferrita de CuFe_2O_4 ; la cual se obtuvo utilizando la ecuación Scherrer.

Tabla 6. Tamaño promedio de cristalita de la ferrita de CuFe_2O_4 .

Ferrita	Diámetro promedio de cristalita (nm)	Desviación estándar
CuFe_2O_4	7.5	0.6

7.4.2 Caracterización por TEM

Se realizó la caracterización por TEM de las NPs sintetizadas de acuerdo con el procedimiento de la Sección 6.3.4. La Figura 32 (a) y (b) muestran dos micrografías representativas de las NPs de donde se observa que su morfología es cuboide. A partir del histograma de la Figura 32 (c) se observa que el tamaño de partícula es entre 6 y 15 nm aproximadamente. Este tamaño es similar al diámetro promedio de cristalita estimado para este sistema. Sin embargo, se observa la presencia de partículas más grandes debido a que varios cristales conforman una partícula.

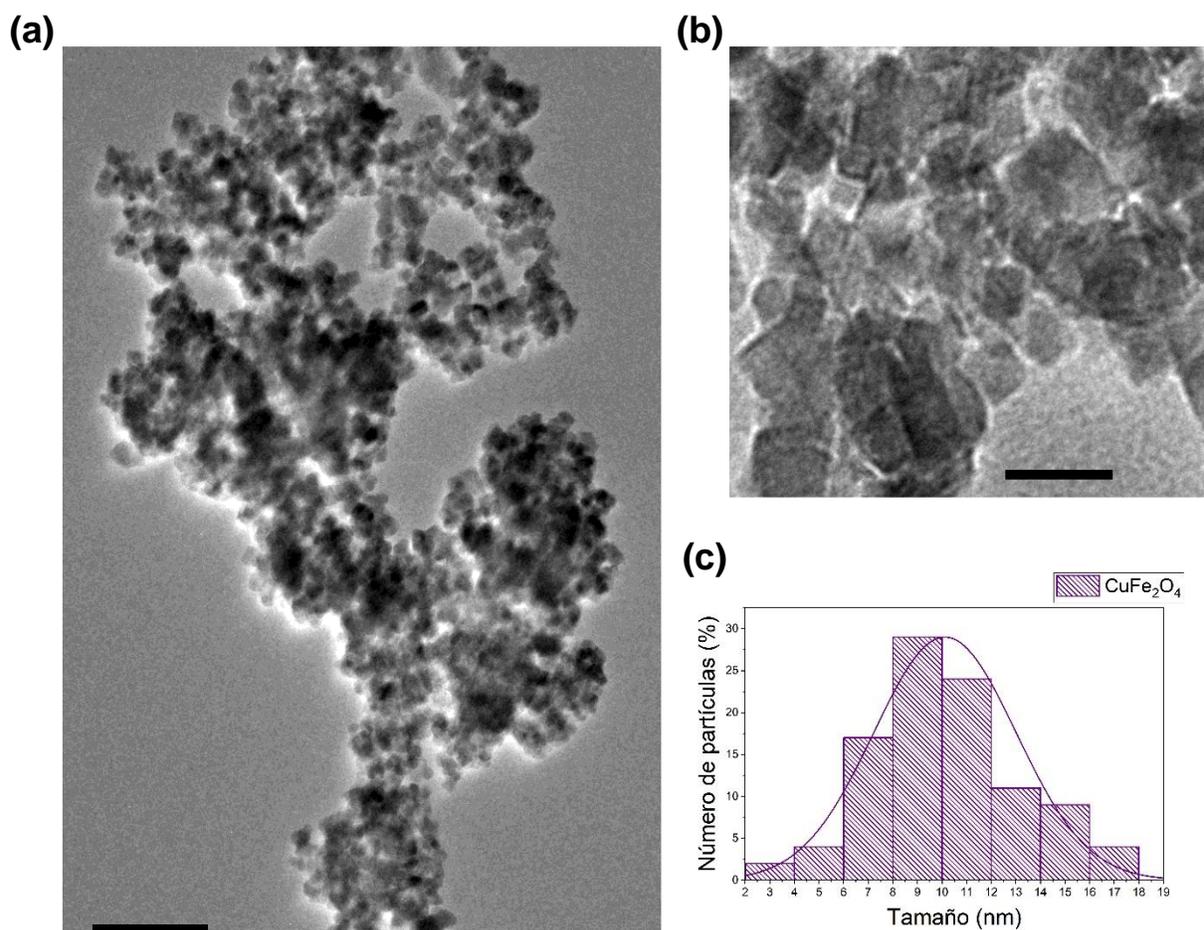


Figura 32. (a) y (b) Micrografías de TEM representativas de las NPs de CuFe₂O₄ y (c) histograma de distribución de tamaño de partícula.

7.4.3 Caracterización por Espectroscopía de Absorción UV-Vis

El espectro de absorción de las NPs de CuFe₂O₄, Figura 33 (a), obtenido por la técnica de RD, presenta una banda ancha centrada alrededor de 500 nm. La brecha energética óptica de 3.4 eV para este sistema, fue estimado a partir del método de Tauc, Figura 33 (b). En este caso se observa un corrimiento con respecto al valor que han informado otros autores, de 2.1 eV, para NPs de CuFe₂O₄, lo que sugiere un confinamiento intenso para este sistema.

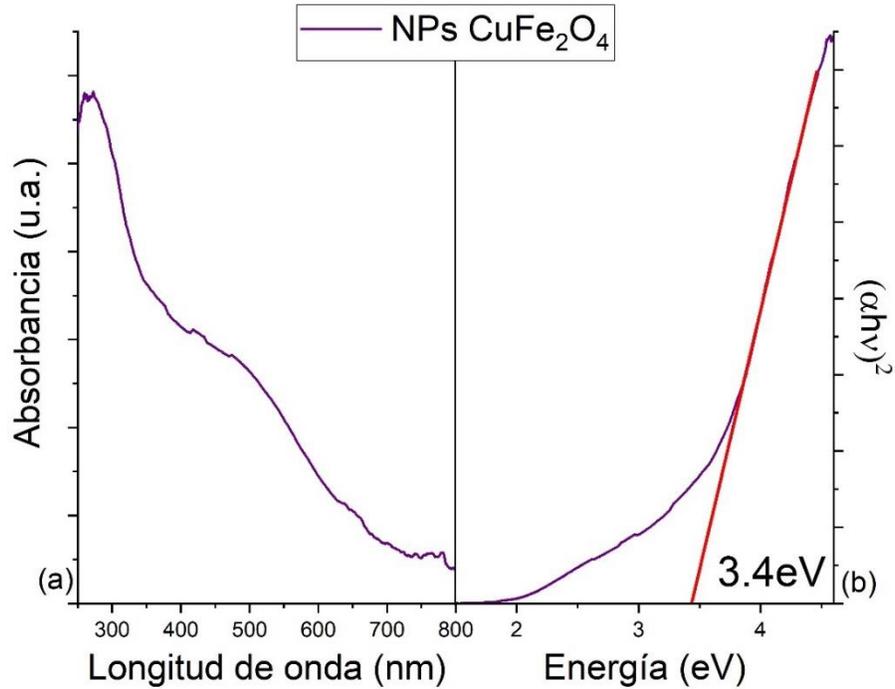


Figura 33. (a) Espectro UV-Visible y **(b)** gráfica de Tauc de las NPs de CuFe₂O₄.

7.4.4 Caracterización por Espectroscopía Raman

La teoría de grupos predice 5 modos activos en Raman para la fase cúbica de la ferrita de cobre: $A_{1g} + E_g + 3F_{2g}$. Mientras que para la fase tetragonal se esperan 10 modos activos: $2A_{1g} + 3B_{1g} + B_{2g} + 4E_g$. En la Figura 34 se presenta el espectro Raman de las NPs de CuFe₂O₄ obtenidas en este trabajo; en dicho espectro se pueden observar cuatro modos de los cinco esperados para la fase cúbica en 214 y 490 cm⁻¹ (F_{2g}), 284 cm⁻¹ (B_{1g}) y 490 cm⁻¹ (A_{1g}), confirmando la presencia de dicha estructura en las NPs obtenidas. Adicionalmente se observa una banda en 400 cm⁻¹, la cual corresponde a un modo vibracional de la fase tetragonal. Los modos vibracionales a altas frecuencias se deben a las vibraciones metal-oxígeno en los sitios tetraédricos (A_{1g}), el resto de los modos en baja frecuencia se deben a las vibraciones en sitios octaédricos^[32, 33]. La intensidad de las bandas, así como el ancho, se asocian con el tamaño de las NPs y la distribución de los cationes en los diferentes sitios de la estructura cristalina.

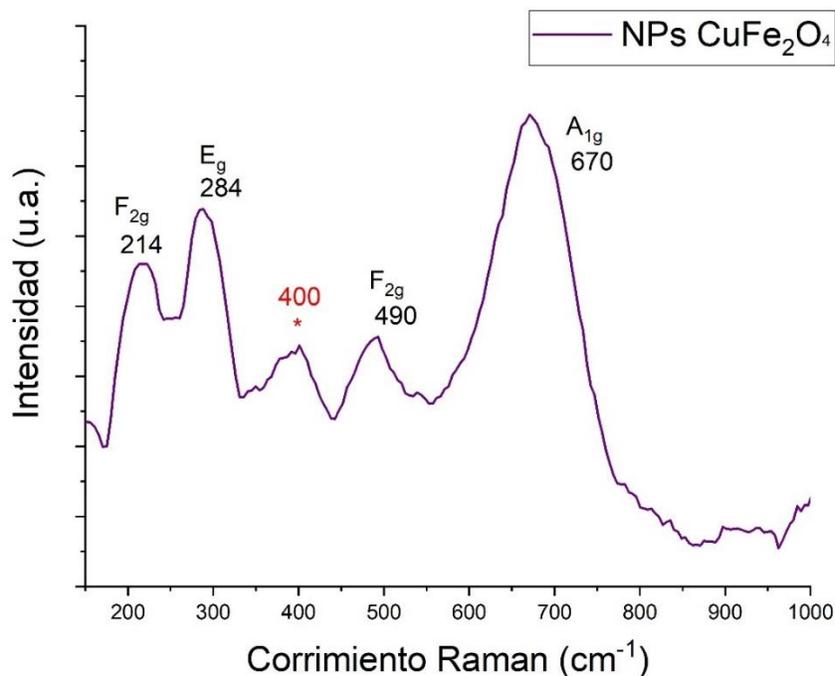


Figura 34. Espectro Raman de las NPs de CuFe₂O₄.

7.4.5 Caracterización por Espectroscopía FT-IR

Por otro lado, en la Figura 35 se presenta el espectro de FT-IR característico de las NPs de la ferrita de cobre. Se observan bandas en 424 cm⁻¹ debida a la vibración del enlace n(Cu-O) en los sitios octaédrico y una señal más intensa en 588 cm⁻¹ que se ha asignado a la vibración del enlace n(Fe-O) en los sitios tetraédricos^[32]. También se observan señales alrededor de 1500 y 3500 cm⁻¹ debidas a las vibraciones de grupos O-H^[34], de agua adsorbida en la superficie de las NPs.

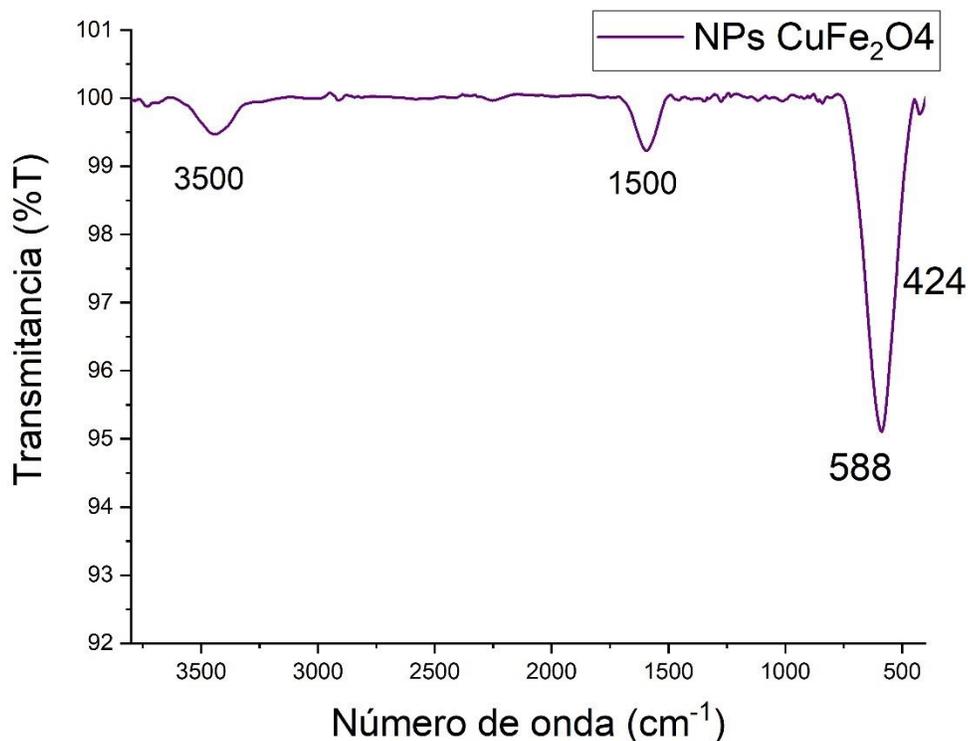


Figura 35. Espectro de Infrarrojo de las NPs de CuFe₂O₄.

7.4.6 Caracterización por EPR

En la Figura 36 se muestra el espectro EPR obtenido de las NPs de CuFe₂O₄, en éste se observa una banda de absorción la cual se ha asociado a vacancias de Cu²⁺ y O²⁻, así como la presencia de cationes Fe³⁺. La presencia de vacancias se favorece debido a la coexistencia de las fases tetragonal y cúbica. En el proceso de la formación de las NPs, durante la transición de fases, se crean zonas deficientes de oxígeno, y durante el tratamiento térmico se favorece la transición de Cu²⁺ de los sitios octaédricos a los sitios tetraédricos; esto a su vez genera regiones ricas o pobres de oxígeno. La no homogeneidad en la estructura de la ferrita en el proceso de síntesis explicaría las diferentes vacancias presentes en la estructura.

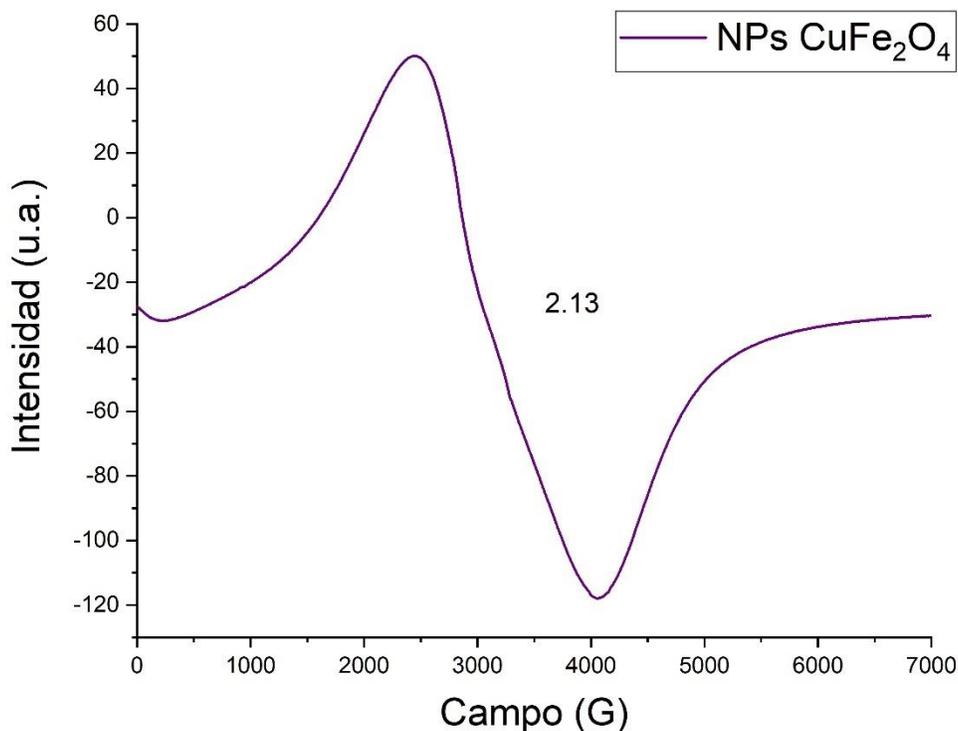


Figura 36. Espectro de EPR de las NPs de CuFe₂O₄.

Los resultados obtenidos muestran que una metodología sencilla, permite obtener NPs de ZnO, CuO, ZnFe₂O₄ y CuFe₂O₄ con diámetros promedio entre 7 y 15 nm. Por lo tanto, como alternativa para desinfectar y prevenir la propagación bacteriana, estas NPs fueron evaluadas contra dos patógenos oportunistas, *S. epidermidis* y *P. aeruginosa*. Los resultados de las pruebas antimicrobianas se presentan a continuación.

7.5 Pruebas antimicrobianas

7.5.1 Antibiogramas

Los resultados de la prueba de antibiogramas se muestran en la Figura 37 para la bacteria *S. epidermidis*, donde se puede observar que la prueba es válida debido a que el disco del control negativo (TSB) se muestra sin halo de inhibición mientras que la Clorhexidina si muestra un halo que nos indica que el compuesto es capaz de inhibir el crecimiento bacteriano. Sin embargo, para los sistemas de NPs sintetizados en este trabajo no observamos la presencia de halos de inhibición, lo que indicaría que no se tiene actividad antimicrobiana contra esta bacteria Gram positiva.

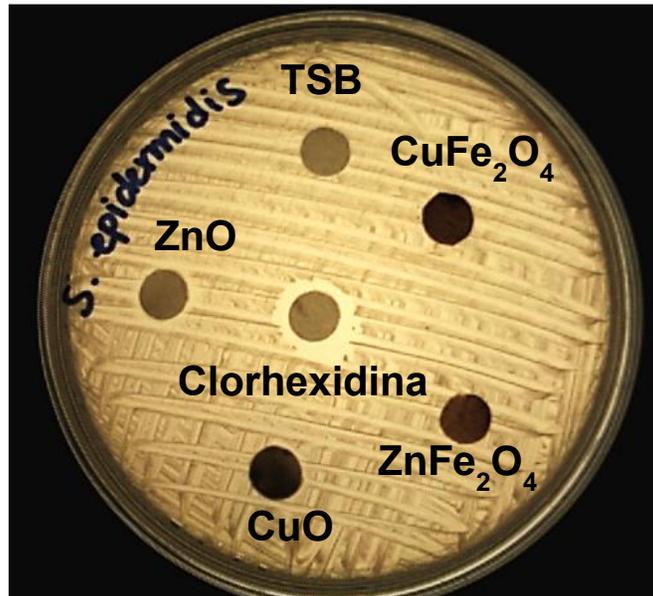


Figura 37. Antibiograma de *S. epidermidis*.

Por otro lado, los resultados presentados en la Figura 38 se refieren a la bacteria *P. aeruginosa* en donde de nuevo la prueba se valida a partir de los resultados observados en los controles. Se pueden observar unos halos de inhibición muy tenues para los discos con NPs de ZnO, CuO y CuFe₂O₄. En la Figura 38 (b) estos halos son más evidentes; aunque no se observan tan claros como el caso de la clorhexidina que si logra inhibir por completo el crecimiento de la bacteria. A partir de estos resultados se propone que los sistemas presentan un efecto bacteriostático, lo que significa que las NPs logran disminuir la velocidad del crecimiento bacteriano ocasionando la diferencia de tonalidad sobre el agar; es decir, el crecimiento bacteriano no es tan denso como en el resto de la placa.



Figura 38. Antibiograma de *P. aeruginosa*.

Esta prueba se considera una metodología tradicional y fue diseñada para antibióticos en disolución, por lo que depende de la difusión de dicha disolución sobre el agar. Cuando el principio activo se difunde, entra en contacto con las bacterias y así se puede observar si se inhibe su crecimiento a partir de la presencia de halos.

Sin embargo, las NPs no se encuentran en disolución si no en dispersión y por lo tanto no se comportan de la misma manera a la esperada para esta prueba. Las NPs no logran difundirse de manera tan eficiente sobre el agar, impidiendo así el contacto del sistema con las bacterias de tal manera que el efecto observado no es representativo de la actividad potencial antimicrobiana. Por dichas razones, se decidió llevar a cabo otras pruebas en donde el contacto de las NPs con las bacterias se favoreciera, y así poder evaluar si las NPs presentan un efecto antimicrobiano.

7.5.2 Concentración Mínima Bactericida

La Concentración Mínima Bactericida o CMB, se refiere la concentración a la cual se observa una inhibición del crecimiento del 99 % de las bacterias presentes en el medio. En este caso se prueban diferentes concentraciones aproximadas de las NPs para encontrar dicha concentración a la cual el efecto antimicrobiano sea el máximo. Se debe considerar que al tratarse de una dispersión, la concentración reportada es aproximada. Las gráficas resultantes de esta prueba se encuentran en el Apéndice B. A continuación, en la Tabla 7, se muestra la CMB encontrada para cada sistema sintetizado.

Tabla 7. CMB para las NPs sintetizadas contra *S. epidermidis* y *P. aeruginosa*.

Nanopartículas	CMB (mg/mL)	
	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
ZnO	2.3	75
CuO	2.3	75
ZnFe ₂ O ₄	4.7	75
CuFe ₂ O ₄	9.4	18.8

A partir de los resultados obtenidos, se puede observar que la bacteria Gram positiva (*S. epidermidis*) es más sensible a la acción antimicrobiana de las NPs, ya que el 99% de las bacterias en el medio mueren a concentraciones más pequeñas. Este resultado era de esperarse ya que en la estructura de la pared celular de las bacterias Gram positivas sólo se tiene la membrana plasmática y el peptidoglicano. Al no tener la membrana externa, estas bacterias no tienen una barrera física tan compleja para impedir el paso o la interacción con las NPs.

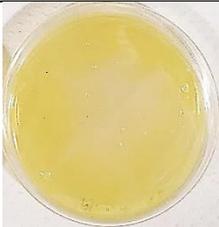
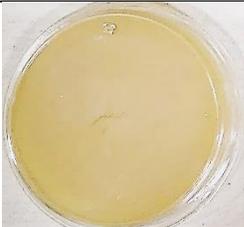
Por otro lado, en el caso de la bacteria Gram negativa, observamos que la población muere a la concentración más alta que se probó (75 mg/mL) a excepción de las NPs de CuFe₂O₄. En el caso de *S. epidermidis*, los óxidos, ZnO y CuO, resultaron ser los más eficientes a 2.3 mg/mL. Por lo tanto, la hipótesis de que las ferritas presentarían un efecto sinérgico debido a la presencia de dos cationes metálicos no resultó cierta. Al comparar las ferritas, observamos que la ferrita de zinc parece ser más eficiente al matar las bacterias a una concentración más pequeña. Si bien parece que las concentraciones reportadas para *P. aeruginosa* son más altas, se debe considerar que es una bacteria muy resistente a los efectos de diferentes antimicrobianos. El hecho de observar un resultado positivo, es decir, que las NPs logran matar al 99% de las bacterias es un excelente resultado y presenta una nueva alternativa para controlar la reproducción y transmisión de este microorganismo. En este caso, contrario a lo observado para la bacteria *S. epidermidis*, se observa que la ferrita de cobre presenta mejor actividad antimicrobiana.

A pesar de obtener buenos resultados en esta prueba, ya que confirmamos que los sistemas de NPs si tienen actividad antimicrobiana y que esta prueba presenta una mejora contra la prueba de antibiograma aún se tiene limitantes. Las placas de 96 pozos, si bien se encuentran en agitación durante la incubación, las NPs tienden a sedimentarse parcialmente lo que limita el contacto de éstas con las bacterias suspendidas en el medio. Debido a esta razón es que se propuso llevar a cabo la prueba de dispersión en agar, cuyos resultados se muestran en la siguiente sección.

7.5.3 Dispersión en Agar

Debido a las diferentes desventajas que se mencionan en las pruebas anteriores, se llevó a cabo la prueba de dispersión en agar; donde se espera que las NPs tengan un mejor contacto con las bacterias al estar homogéneamente dispersas en la superficie del agar. En la Tabla 8 se presentan un concentrado de fotografías representativas de las placas con las NPs dispersas. En la primera columna se presentan las placas después de gelificar, antes de la inoculación. En este caso las placas presentan el color de las NPs, lo que indica que las NPs no se descomponen y sólo se dispersan. La única excepción a esto son las NPs de CuO, las cuales tienen un color café oscuro; sin embargo, al dispersarse en el medio de cultivo éste se torna de un color verde-azul lo que podría indicar una liberación parcial de iones de cobre al medio. En la siguiente columna se observan las placas una vez que fueron inoculadas con la bacteria *S. epidermidis* e incubadas por 24 h. Las placas no presentan UFC lo que indica que todas las NPs tienen actividad antimicrobiana al matar al 100% de la población bacteriana presente cuando están a una concentración aproximada de 27 mg/mL. Por otro lado, en la tercera columna observamos las placas una vez que fueron inoculadas e incubadas con la bacteria *P. aeruginosa*; donde si hay presencia de UFC.

Tabla 8. Imágenes de las placas de agar con las NPs dispersas antes y después de ser inoculadas con ambas cepas.

Nanopartículas	Antes de la inoculación	24 h después de incubación con <i>S. epidermidis</i>	24 h después de incubación con <i>P. aeruginosa</i>
ZnO			
CuO			
ZnFe ₂ O ₄			
CuFe ₂ O ₄			

Si bien en el caso de la bacteria Gram negativa las NPs no fueron capaces de inhibir el 100% de la población bacteriana, al comparar estas placas con la placa control si se observa una inhibición parcial del crecimiento. Las colonias observadas fueron contabilizadas, al igual que las de la placa control, y se hizo el cálculo del porcentaje de inhibición. Los resultados obtenidos se presentan en las gráficas de las Figuras 39 para los diferentes sistemas contra *S. epidermidis* y en la Figura 40 contra la bacteria *P. aeruginosa*.

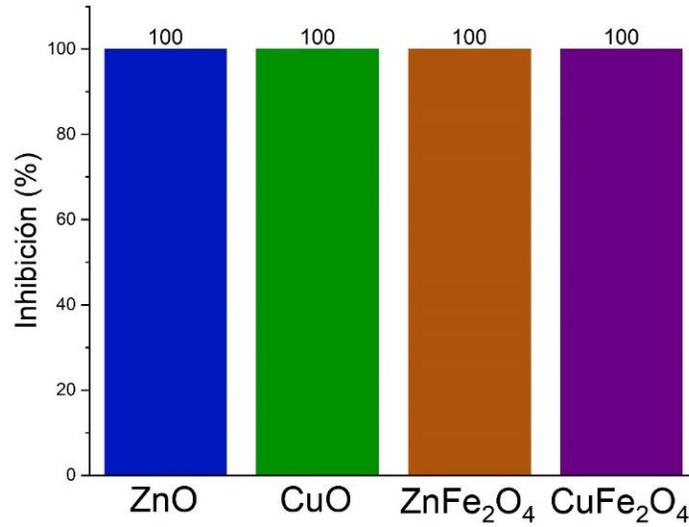


Figura 39. Gráfica del porcentaje de inhibición de crecimiento contra la bacteria *S. epidermidis* de las NPs a una concentración de 27mg/mL.

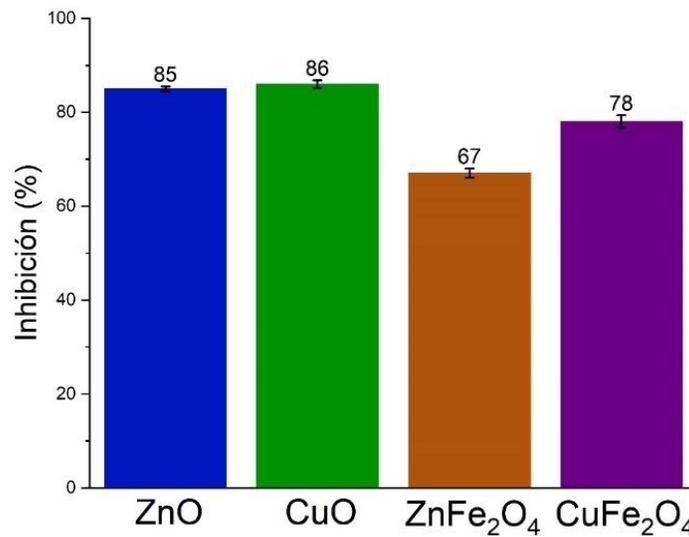


Figura 40. Gráfica del porcentaje de inhibición de crecimiento contra la bacteria *P. aeruginosa* de las NPs a una concentración de 27mg/mL.

Se debe considerar que los experimentos se realizaron por triplicado y lo que se presenta es el porcentaje promedio para cada sistema de NPs. En la Figura 39 se puede observar que la inhibición del crecimiento para todas las NPs es del 100 % y no se presentan barras de error, esto se debe a que las 3 placas para cada sistema no presentaron ninguna UFC. A partir de los

resultados presentados en la prueba de CMB; la concentración a la cual los sistemas lograban matar al 99 % de la población bacteriana, no se esperaba que la bacteria *S. epidermidis* lograra crecer en esta prueba de dispersión. Esto se debe a que la CMB para todos los sistemas resultó ser menor a 27 mg/mL, que fue la concentración utilizada en esta prueba. En la Figura 40 se compara la actividad antimicrobiana de cada sistema de NPs a la misma concentración para la bacteria *P. aeruginosa*. En este caso se sabe que la CMB es de 75 mg/mL para todas las NPs, excepto para la ferrita de cobre, CuFe_2O_4 , que es 18 mg/mL. La prueba de CMB indicaba que después de dicha concentración las bacterias crecían hasta un punto incontable, pareciendo que no habría ningún tipo de actividad antimicrobiana a concentraciones menores. Sin embargo, esta prueba de dispersión permite probar que incluso a menores concentraciones se puede observar un porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano del 85 %, 86 % y 67 % por parte de las NPs de ZnO, CuO y ZnFe_2O_4 respectivamente. Si bien al comparar estos resultados con los de CMB parecen no concordar debido a que en la prueba de dispersión los óxidos tienen una mayor actividad antimicrobiana que las ferritas, mientras que en la CMB el sistema con la mejor actividad antimicrobiana es CuFe_2O_4 ; esto se puede explicar a partir de la manera en la que están presentes las NPs. Se había explicado que en la prueba de CMB las NPs se sedimentaban lo que impedía que tuvieran contacto con las bacterias y así poder observar una actividad antimicrobiana significativa; al estar las NPs dispersas y fijas en la superficie del agar tienen un mejor contacto con las bacterias y es por eso por lo que el efecto antimicrobiano observado es mayor. Al comparar las ferritas entre sí, los resultados son consistentes ya que la ferrita de cobre tiene mejor actividad antimicrobiana que la de zinc, aunque por las razones antes mencionadas, la ferrita de zinc si tiene una actividad antimicrobiana significativa que antes no había podido verse.

Los resultados de la actividad antimicrobiana obtenidos a partir de esta última prueba son favorables ya que todas las NPs sintetizadas en este trabajo presentan actividad antimicrobiana contra ambas bacterias. Las concentraciones a las cuales se observa esta actividad pueden parecer altas; sin embargo, no se está buscando una aplicación como medicamento y por lo tanto no es nuestro objetivo tener una concentración muy pequeña para evitar efectos secundarios adversos. Lo que nos interesa es la posible aplicación de este tipo de NPs para la desinfección de superficies, y por esto la prueba de dispersión en agar es la que simula de mejor forma las condiciones en las que se presentarán las NPs en la superficie. Mientras se tenga la concentración a la cual las NPs puedan matar a las bacterias, serán útiles en la superficie para ayudar a evitar la adherencia y el crecimiento de colonias bacterianas.

Tabla 9. Resumen de resultados de caracterización y pruebas antimicrobianas de las NPs sintetizadas.

	Nanopartículas			
	ZnO	CuO	ZnFe ₂ O ₄	CuFe ₂ O ₄
Tamaño promedio de cristalita (nm)	14.7 ± 0.7	8.7 ± 1.0	6.4 ± 0.6	7.5 ± 0.6
Fase cristalina	Hexagonal (tipo wurtzita)	Cúbica	Cúbica	Cúbica/ Tetragonal
Morfología	Poligonal	Poligonal	Cuboide	Cuboide
Tamaño promedio de partícula (nm)	17	10	7	9
Brecha energética óptica (eV)	3.2	2.5	2.6	3.4
Raman (cm ⁻¹)	198, 317, 424. 548 y 640 Vacancias oxígeno	270 (A _g) 319 y 597 (2B _g)	332, 656, 238 y 475 656	214 y 490 (F _{2g}) 284 (B _{1g}) 490 (A _{1g}) 400
FT-IR (cm ⁻¹)	447 cm ⁻¹ Zn-O Presencia -OH	525, 586 Cu-O Presencia -OH	461 Zn-O 588 Fe-O 765 Zn (Oh) Presencia -OH	424 Cu-O (Oh) 588 Fe-O (Th) Presencia -OH
EPR	2.085 V _{Zn} , V _{Zn} ⁻ :Zn _i	2.22 Monómeros, dímero de Cu ²⁺	1.997 O ₂ ⁻ , V _O , e ⁻ desapareados	V ⁺ _{Cu} , V ⁻ _O , Fe ³⁺
	2.001 V ⁺ _{Zn} , e ⁻ desapareados en V _O			
	1.97 V ⁺ _O , V _{Zn} , Zn _i , O _i			
<i>CMB (mg/mL)</i>				
<i>S. epidermidis</i>	2.3	2.3	4.7	9.4
<i>P. aeruginosa</i>	75	75	75	18.8

La Tabla 9 presenta un resumen de los resultados de caracterización de las NPs sintetizadas utilizando un método mecanoquímico; así como su actividad antimicrobiana frente a las dos cepas evaluadas, *S. epidermidis* y *P. aeruginosa*.

Se puede observar que las NPs de ZnO son las más grandes con un tamaño promedio de cristalita de 14 nm, mientras que el resto de las NPs tienen un tamaño promedio menor a 10 nm. A partir de las técnicas de XRD, espectroscopía Raman y de FT-IR se comprueba en todos los casos la obtención de la fase pura para cada sistema excepto para las NPs de ferrita de cobre; donde observamos una mezcla de la fase cúbica y la tetragonal debido a que a la temperatura del tratamiento térmico es la temperatura de transición entre estas fases. La espectroscopía de FT-IR nos indica que hay presencia de moléculas de agua adsorbidas en las superficies de las NPs en todos los sistemas sintetizados. La técnica de EPR nos permitió conocer que las NPs sintetizadas presentan diferentes defectos paramagnéticos en la estructura cristalina, como los son vacancias, defectos intersticiales y electrones desapareados, lo que influye de gran manera en la actividad antimicrobiana de cada sistema debido a la producción de EROs.

La actividad antimicrobiana es más eficiente contra la bacteria Gram positiva debido a la estructura de su pared bacteriana haciéndola más susceptible a agentes antimicrobianos. En este caso los óxidos parecen ser más eficientes que las ferritas, y la ferrita de zinc a su vez más eficiente que la de cobre al matar bacterias a una menor concentración. Por otro lado, las NPs de ZnO, CuO y ZnFe₂O₄ logran matar al 99 % de las bacterias *P. aeruginosa*, la bacteria Gram negativa, a la misma concentración de 75 mg/mL. Mientras que la ferrita de cobre es más eficiente al matar a esta bacteria a menor concentración. Si bien se piensa que las NPs mientras más pequeñas logran interactuar de mejor manera con las bacterias, en el caso de las NPs sintetizadas en este trabajo podemos observar que no siempre a menor tamaño mejor actividad antimicrobiana^[35]. Se podría decir la composición química de las NPs influye más que su tamaño, en su actividad contra las bacterias. También hay que tener en cuenta el tipo de bacteria que se quiere eliminar y el tipo y composición de la pared externa.

7.6 Interacción de las NPs con moléculas componentes de la pared celular

7.6.1 Caracterización por Espectroscopía Raman

Una de las principales técnicas empleadas para investigar las propiedades vibracionales de los materiales, es la espectroscopía Raman. En términos generales, esta técnica consiste en la interacción de la luz de una fuente láser con el material de estudio. La luz dispersada proporciona

información sobre los estados rotacionales, vibracionales, y eventualmente electrónicos del material. A partir de un espectro Raman podemos obtener una huella digital vibracional de la muestra, la cual dependerá de los constituyentes, la simetría y el entorno; por lo que la espectroscopía Raman es utilizada para determinar componentes químicos, estructuras moleculares y la conformación e interacción entre moléculas. La técnica puede utilizar luz desde el rango ultravioleta y hasta el infrarrojo cercano como fuente de excitación, lo que ofrece una alta resolución espacial. Todas estas características hacen a la espectroscopía Raman una técnica ideal para estudiar complejos formados por NPs y biomoléculas, además la señal Raman del agua es débil, por lo que no se presenta como una interferencia en el espectro al momento de hacer el análisis.

Los aminoácidos son moléculas constituidas por un carbono, un grupo NH_3^+ , un grupo CO_2^- y un grupo radical. El grupo radical es lo que caracteriza a los diferentes aminoácidos, y es justamente esta cadena que influirá en la posición e intensidad de las bandas observadas en el espectro Raman. Por otro lado, el peptidoglicano es un copolímero formado por ácido N-Acilmurámico (NAM) y N-Acetilglucosamina (NAG) unidos por un enlace β 1-4. El peptidoglicano es el encargado de formar una barrera para proteger a las bacterias contra las amenazas del ambiente y funciona como un filtro para dejar pasar nutrientes, y sacar los desechos. Esta barrera tiene unidos algunas proteínas y cadenas de aminoácidos; de tal manera que cuando las NPs entran en contacto con las bacterias lo primero que ven son estos aminoácidos y al peptidoglicano. Por esta razón es importante estudiar la interacción de las NPs con estas biomoléculas para poder comprender el mecanismo de acción de éstas como agentes antimicrobianos.

Para estudiar la interacción de las NPs con las biomoléculas propuestas, se llevaron a cabo las reacciones entre diferentes aminoácidos de acuerdo con el procedimiento de la Sección 6.5. Los productos obtenidos se caracterizaron por espectroscopía Raman. La Figura 41 muestra el espectro Raman del aminoácido glicina, el cual es el aminoácido más simple; junto con las vibraciones características de esta molécula.

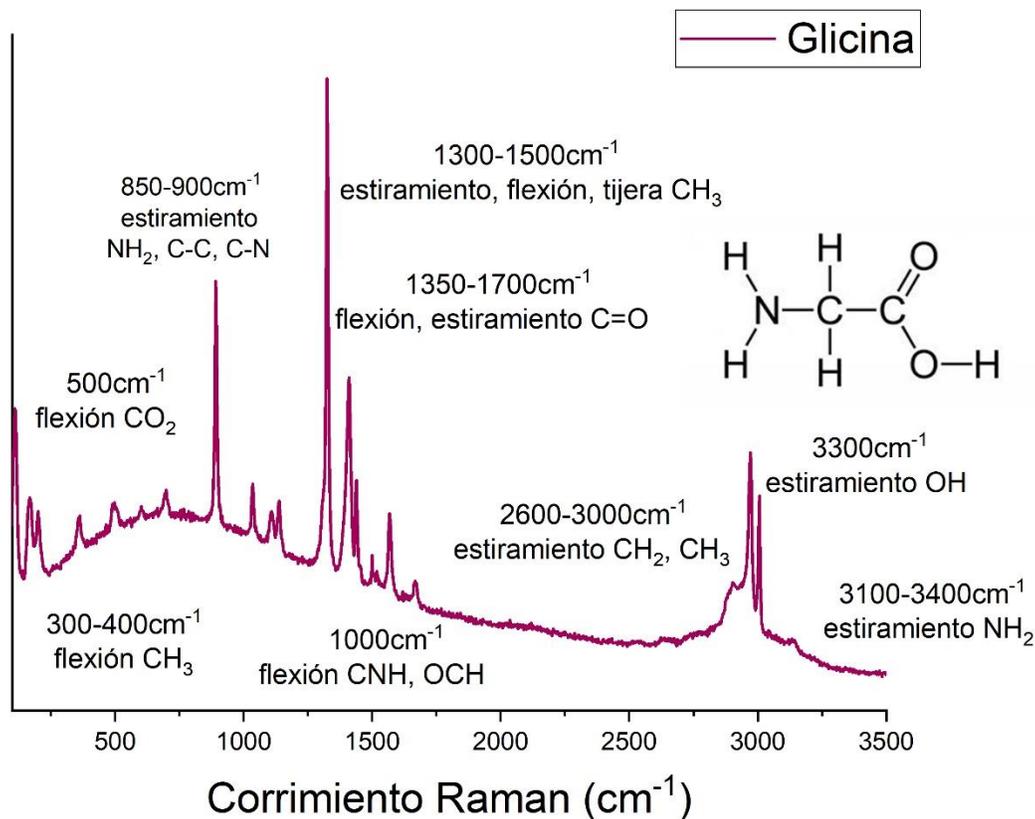


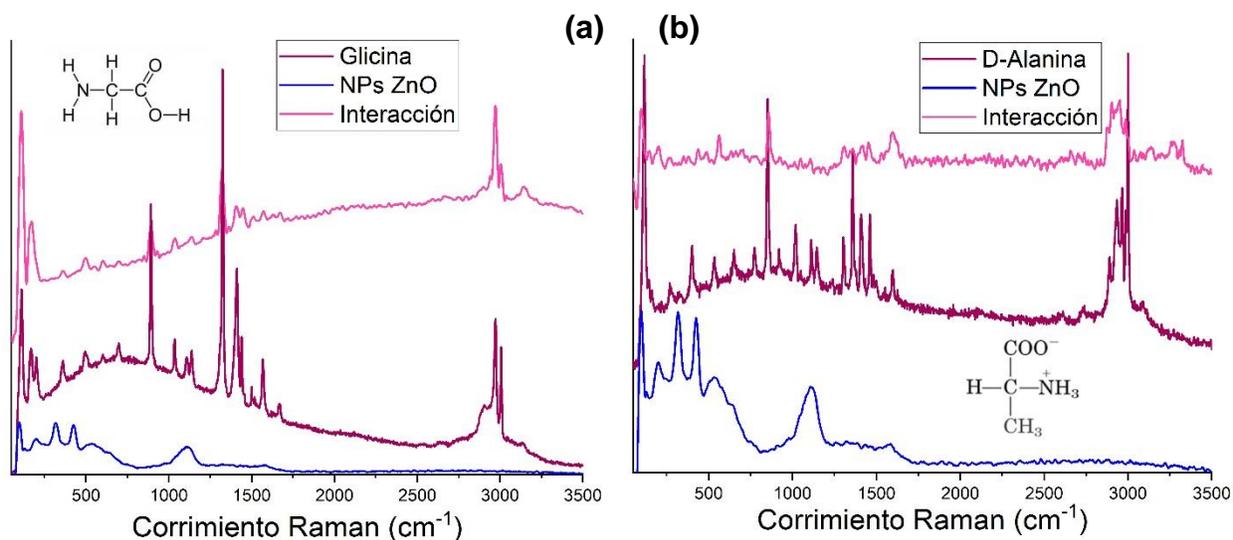
Figura 41. Espectro Raman del aminoácido Glicina con la asignación de sus señales características.

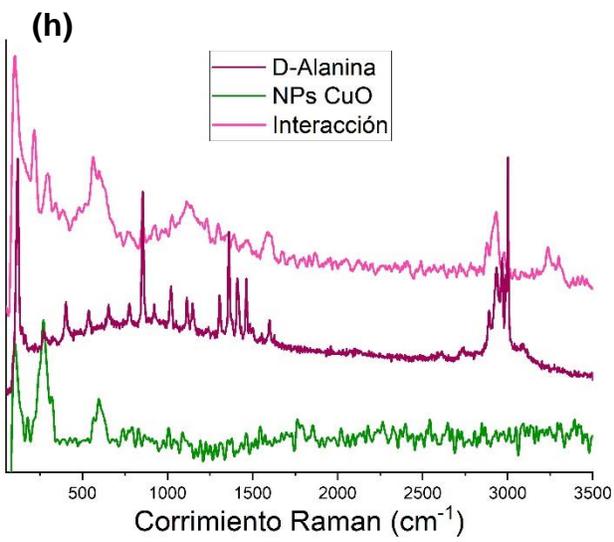
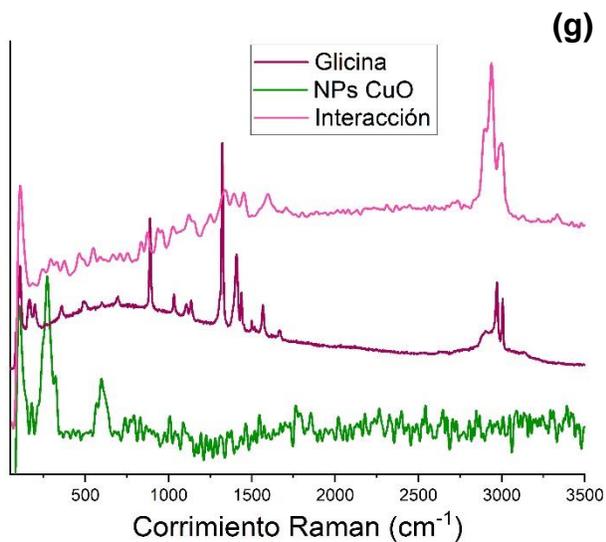
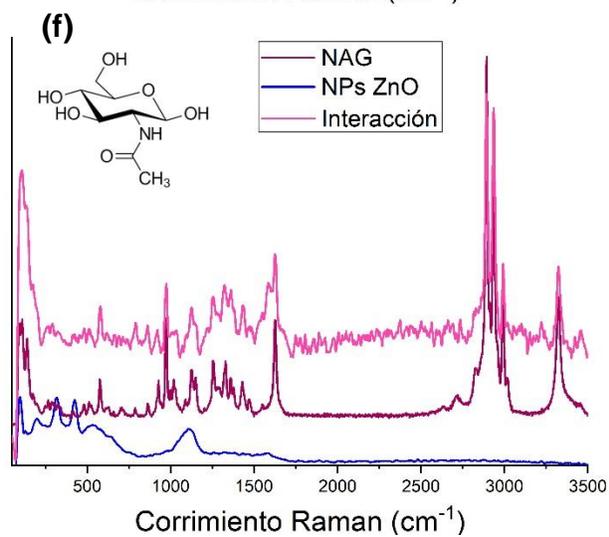
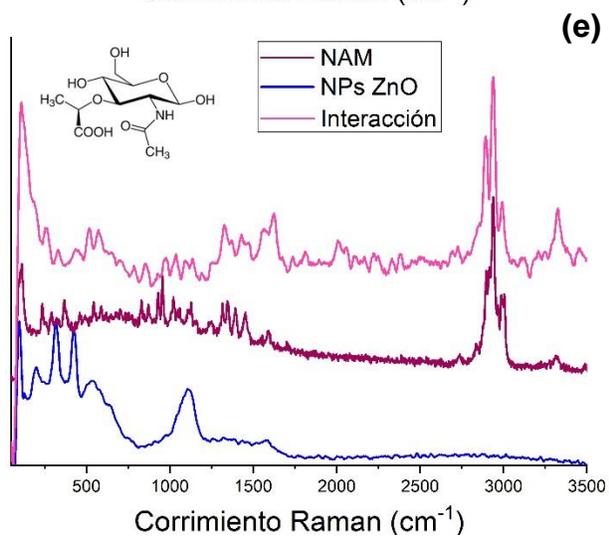
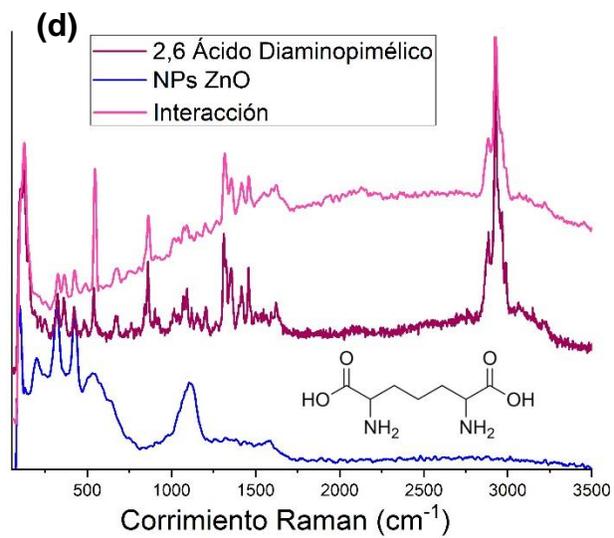
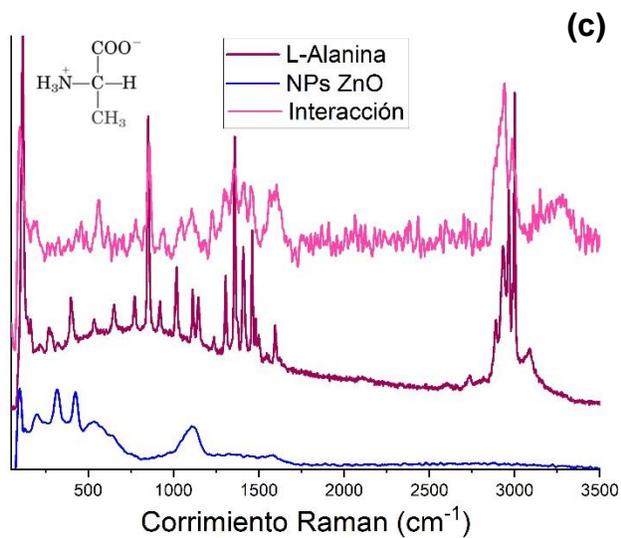
A continuación, se presentan los espectros obtenidos de los productos obtenidos de la interacción de cada nanopartícula con los diferentes aminoácidos y los componentes del peptidoglicano. Los espectros se comparan con los espectros de las biomoléculas y las NPs, para poder observar los cambios generados en el espectro del producto obtenido de la interacción.

7.6.1.1 Interacción con ZnO y CuO.

Se puede observar que los espectros de las interacciones (Figura 42 (a-l)) entre las NPs y las biomoléculas no corresponden a la suma de los espectros individuales de cada participante en la reacción, lo que indica una interacción entre ellos. Los espectros de manera general presentan bandas más anchas y con menor intensidad que los espectros de las biomoléculas individuales en todos los casos. Se pueden observar cambios similares en algunas bandas cuando interactúan las NPs de CuO y ZnO con glicina, D-alanina y L-alanina. Los cambios se observan

en las bandas entre 300 y 600 cm^{-1} , las cuales corresponden al movimiento de flexión del grupo $-\text{CO}_2$, así como el movimiento de flexión del grupo metilo. En el caso de las interacciones antes mencionadas, e incluyendo la interacción con el 2,6 ácido diaminopimérico, se observan cambios en las bandas entre 1100 y 1500 cm^{-1} , correspondientes a los enlaces al grupo amino, al grupo carboxilo y al estiramiento del grupo carboxilo; dichas bandas se observan anchas y con menor intensidad. El resultado de este cambio es que las diversas bandas individuales en esta zona se unan y se vea sólo un par de bandas muy anchas. El mismo fenómeno se observa en la zona alrededor de 3000 cm^{-1} , donde las diferentes bandas cambian su intensidad relativa y se ensanchan. Analizando la interacción con los componentes del peptidoglicano; en el caso de la interacción de los óxidos con el NAG se observa el ensanchamiento de las bandas únicamente en la zona entre 1000 y 1600 cm^{-1} , adicionalmente el CuO ocasiona un cambio en las bandas alrededor de 3000 cm^{-1} , donde en la interacción sólo se observa una banda muy ancha. La interacción de CuO y NAM genera un espectro completamente diferente, observándose únicamente dos bandas muy anchas alrededor de 1500 y 2900 cm^{-1} . Este cambio en el espectro sería indicación de una interacción muy fuerte entre los dos componentes de la reacción. La banda observada aproximadamente a 3300 cm^{-1} se ha asignado al grupo NH_3^+ ; dicha banda en la interacción con las NPs de ZnO se sigue observando de manera definida. Cuando la interacción es con las NPs de CuO, se observa que la banda no está presente mientras que cuando es con el NAG la banda se observa con menor intensidad.





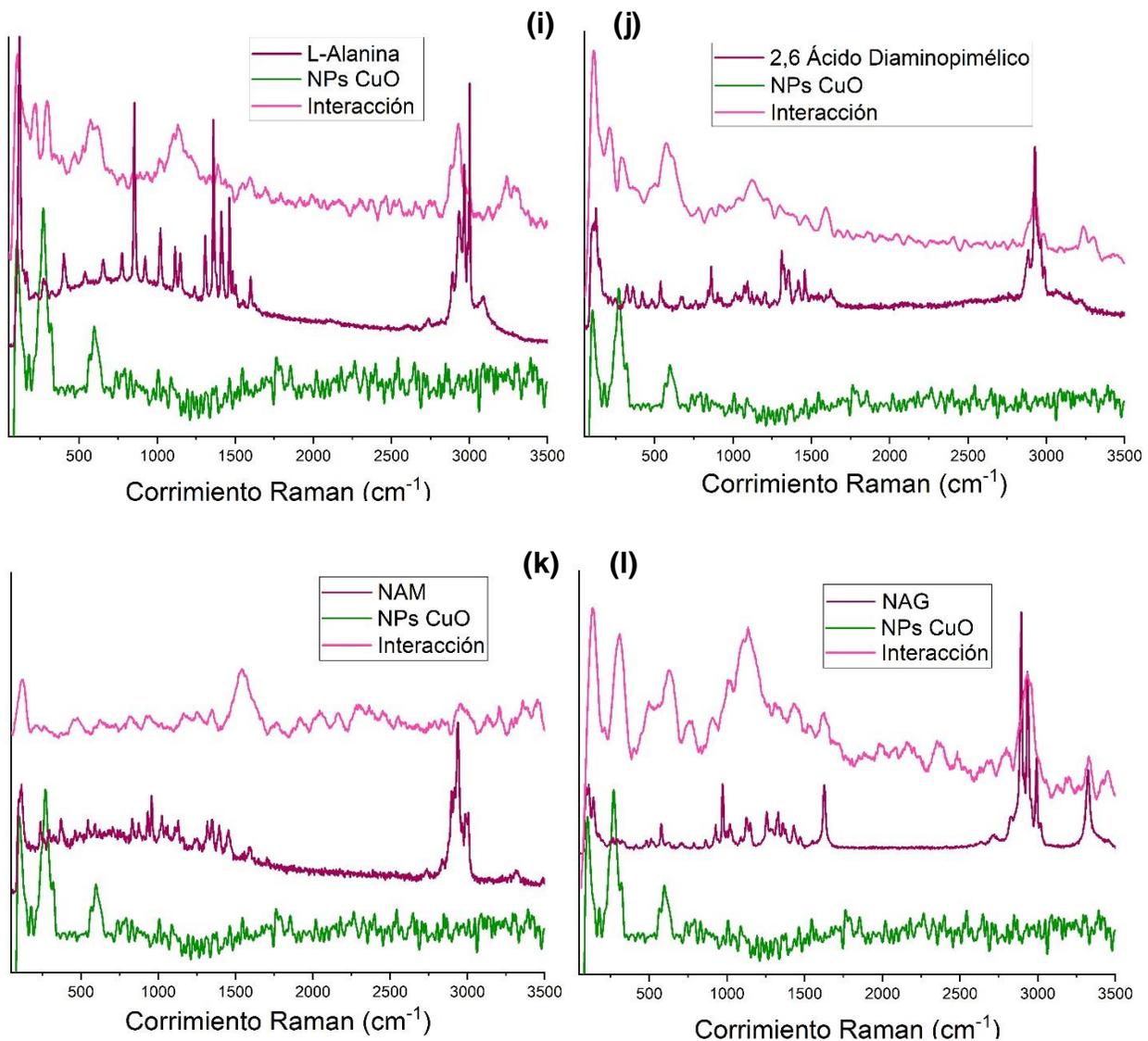
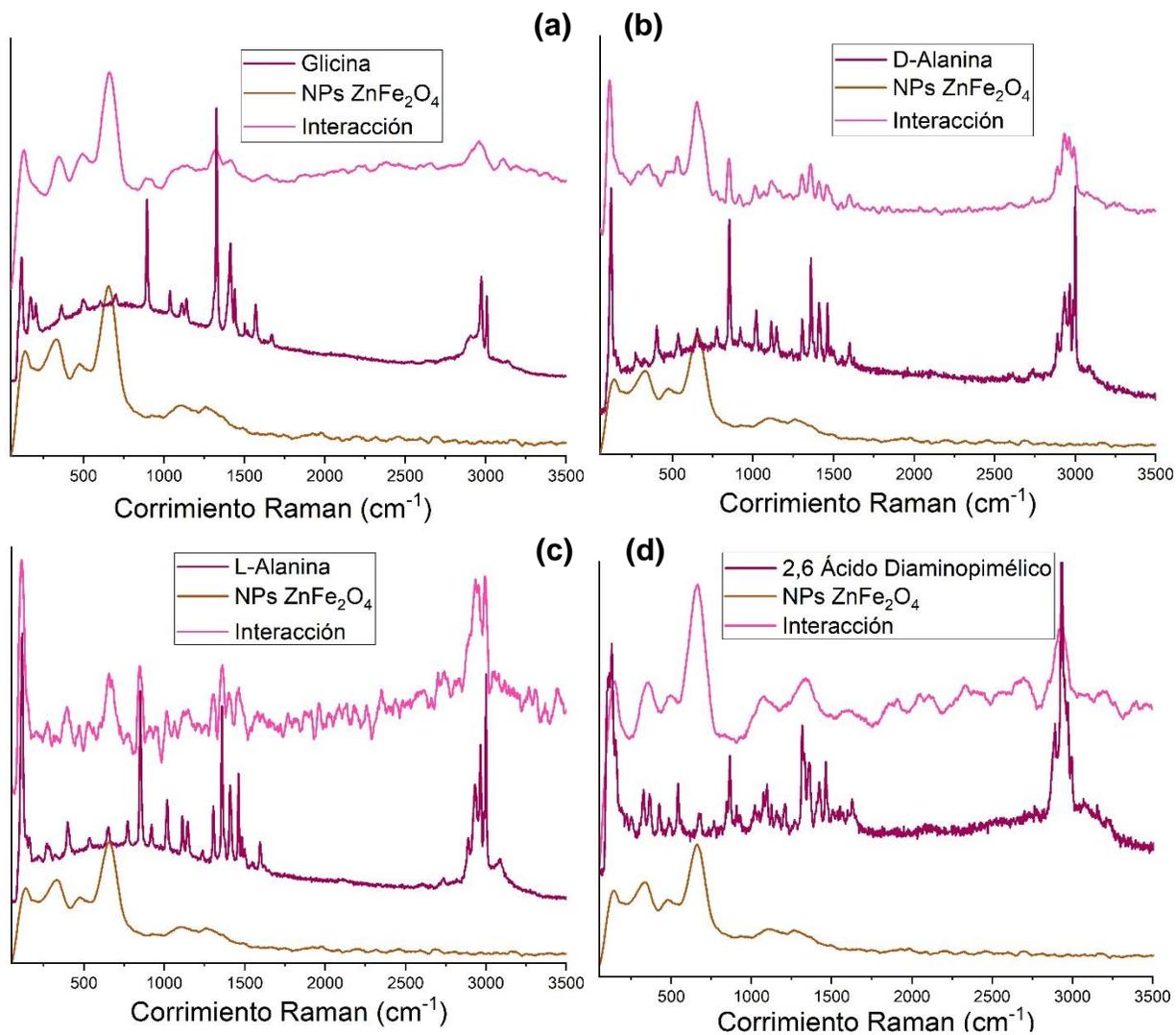


Figura 42. Espectros Raman de la interacción de NPs de ZnO y CuO con los diferentes componentes de la pared celular.

7.6.1.2 Interacción con ZnFe₂O₄

En el caso de la interacción de las NPs de ZnFe₂O₄ con los aminoácidos, podemos observar las bandas características de las NPs en todos los casos, entre 200 y 700 cm⁻¹(Figura 43 (a-f)). En esta zona no es posible distinguir las bandas características de los aminoácidos. Lo que si se logra distinguir en la zona entre 1000 y 1500 cm⁻¹, donde sucede algo similar que con la interacción de los óxidos metálicos. Las bandas en esta zona se observan poco definidas, muy anchas y con menor intensidad. Las bandas presentes en la zona de 3000 cm⁻¹, se observan con poca definición en la interacción con D- y L-alanina. La interacción con 2,6 ácido diaminopimélico

y glicina sólo muestra una banda ancha en esta zona, indicando una mayor afinidad de las NPs con estos aminoácidos que con las alaninas. La interacción con NAM y NAG es muy similar a la interacción con alanina, donde se observan las bandas características de las NPs mientras que las bandas características de las biomoléculas entre 1000 y 1600 cm^{-1} , así como la zona alrededor de 3000 cm^{-1} , se observan con menos definición y más anchas. En ambos casos se presenta una banda aproximadamente en 3300 cm^{-1} para ambas biomoléculas debido al grupo NH_3^+ , la cual no se observa en el espectro de las interacciones con las NPs.



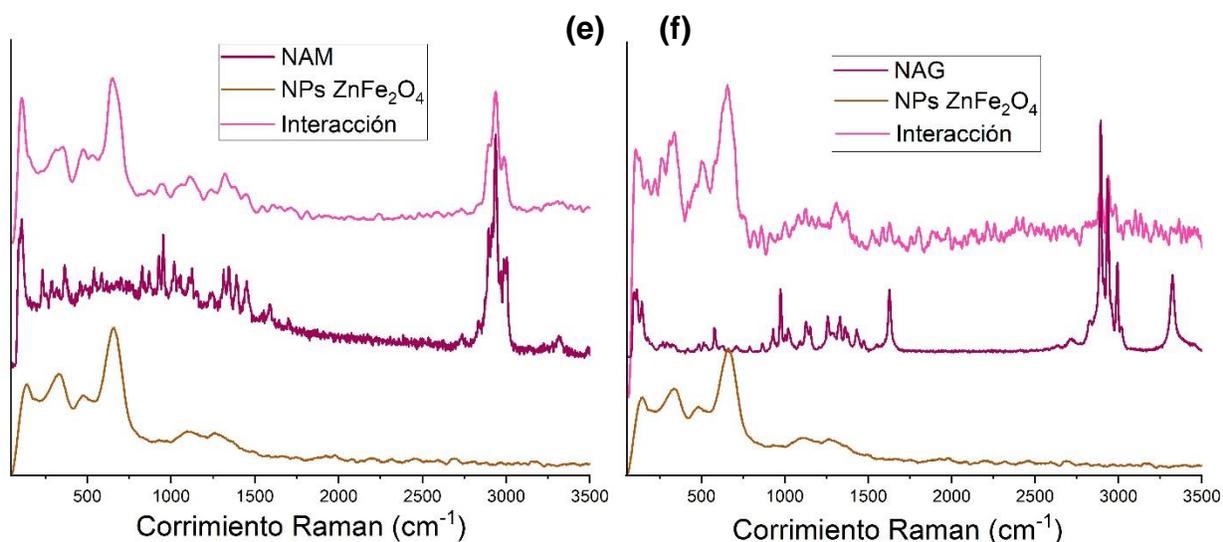


Figura 43. Espectros Raman de la interacción de las NPs de ZnFe_2O_4 con algunas moléculas componentes de la pared celular.

7.6.1.3 Interacción con CuFe_2O_4 .

En el caso de las interacciones de las NPs de CuFe_2O_4 , con los aminoácidos, de manera general se observan dos bandas anchas, aproximadamente en 1350 y 1580 cm^{-1} (Figura 44 (a-f)). Las bandas que se encuentran entre 1300 y 1500 cm^{-1} se deben al grupo carboxilo, y estas bandas pueden verse afectadas a partir de las cadenas laterales del aminoácido. Las NPs, al estar interactuando con el aminoácido, podrían estar modificando la posición espacial de las cadenas laterales del aminoácido lo que podría afectar a las bandas del grupo CO_2^- . Otros cambios notables se observan alrededor de 3000 cm^{-1} , asignadas al movimiento de diferentes grupos, no se observan en la interacción con glicina y D-alanina; mientras que para L-alanina y el 2,6 ácido diaminopimérico se observan con una menor intensidad y se distingue una banda ancha. Cuando las NPs interactúan con el NAM, en el espectro se observan las bandas correspondientes a las NPs aproximadamente a 250 cm^{-1} , y las bandas características de la biomolécula, aproximadamente a 1500 y 3000 cm^{-1} , aunque estas bandas se observan más anchas y con menor intensidad. Al igual que para los aminoácidos, se observa la presencia de dos bandas, una a 1350 cm^{-1} de mayor intensidad y otra a 1580 cm^{-1} . El espectro de la interacción de las NPs con NAG no se observa significativamente diferente al de la biomolécula sola, sólo se observan bandas más anchas; pudiendo indicar una menor interacción de las NPs a esta biomolécula en comparación con las otras biomoléculas analizadas.

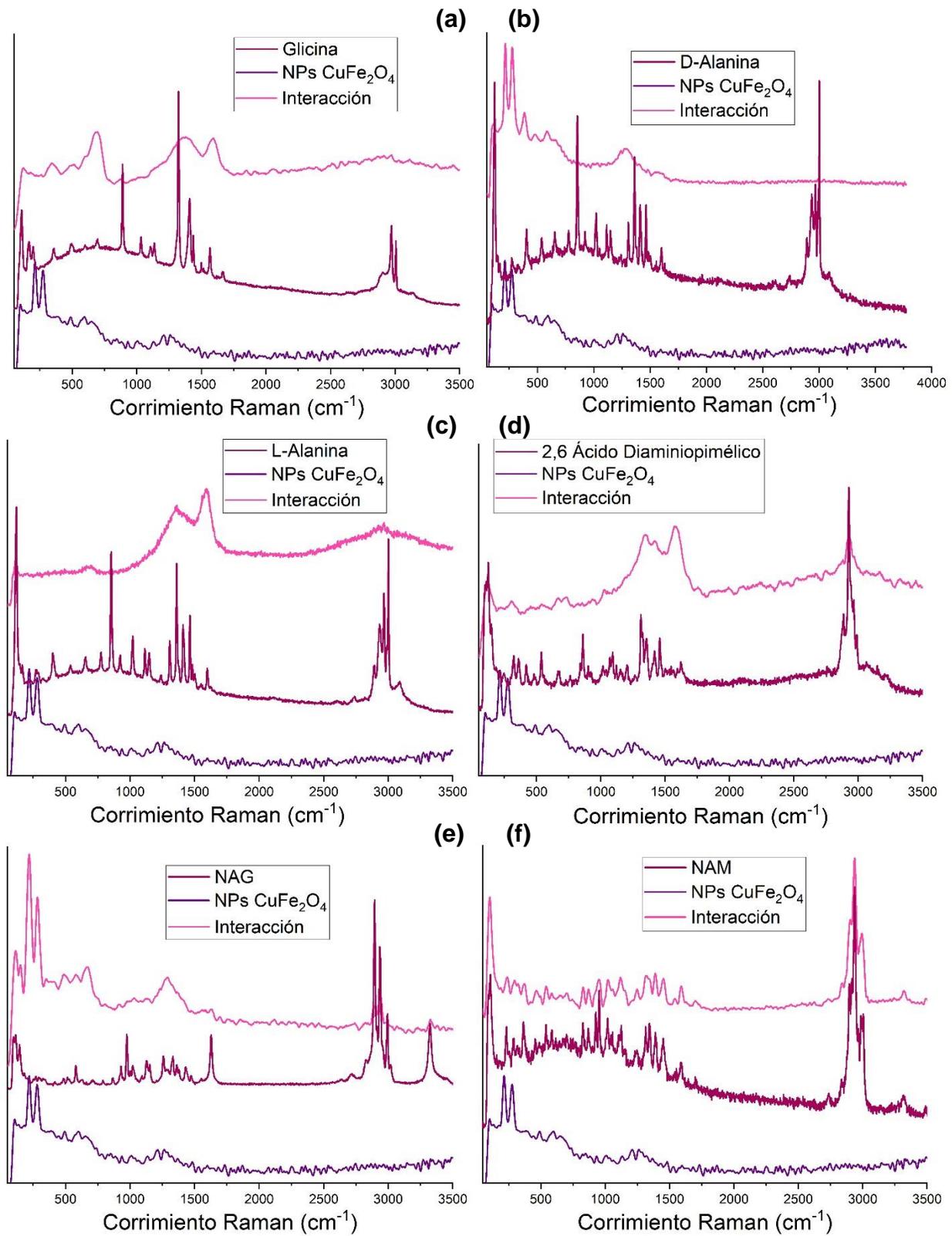


Figura 44. Espectros Raman de la interacción de NPs de CuFe_2O_4 con los diferentes componentes de la pared celular.

Los mecanismos por los que se puede llevar a cabo una interacción entre las bacterias y las NPs pueden ser de dos tipos. El primer mecanismo es por receptores y ligantes, pero para que esta interacción se lleve a cabo generalmente se requiere de la funcionalización de la superficie de las NPs. El otro mecanismo es la conjugación química, a partir del acoplamiento de grupos funcionales a la superficie de la nanopartícula, y aquí es donde los aminoácidos y los componentes del peptidoglicano tienen importancia ya que serán los que logren interactuar de esta manera con las NPs cuando se encuentran en el medio de cultivo con las bacterias. Entender cómo se da la interacción de biomoléculas simples con NPs inorgánicas es vital para la investigación de la interfase bio-nano y tiene aplicaciones en biotecnología, medicina y catálisis; el estudio de esta interacción nos permite determinar la aplicación segura y eficiente de los nanomateriales. Para este tipo de interacción hay que considerar principalmente la interacción iónica debido a que las biomoléculas presentan un grupo carboxilo cargado negativamente y un grupo amino cargado positivamente. A pesar de ser el principal tipo de interacción, también podemos observar interacciones de tipo hidrofóbicas e interacciones químicas específicas.

Una variable importante que considerar es la concentración, tanto de las NPs como de las biomoléculas. Cuando las NPs se encuentran en un sistema biológico, interactuarán con las biomoléculas que estén en mayor concentración al inicio y con el tiempo, las interacciones se darán con las biomoléculas con las que tengan mayor afinidad; así que es de suma importancia estudiar el ambiente y la duración de la interacción, para poder entender los diferentes mecanismos que ocurren cuando las NPs interactúan con las bacterias. Por otra parte, debemos considerar la aglomeración de NPs, la internalización celular, el tiempo de circulación, la señalización que desencadenan, la cinética de su transporte, la acumulación y eventualmente la toxicidad.

Al observar los espectros de las interacciones entre las biomoléculas y las diferentes NPs, podemos decir que los cambios que presentan en la posición y forma de las bandas son indicativos de que hay una interacción entre los diferentes componentes. A partir de los resultados de caracterización, en especial de los resultados de EPR, podríamos decir que la interacción es de tipo electrostática ya que las bandas modificadas están relacionadas a los grupos amino y/o carboxílico. Además, hay que considerar que las NPs tienen defectos como vacancias y en algunos casos electrones desapareados.

Es necesario seguir haciendo este tipo de investigación para poder entender la manera en la que las NPs interactúan con las bacterias, y en general con sistemas biológicos, ya que eventualmente nosotros estaremos en contacto con estos nanomateriales. De esta manera se

lograrán diseñar nanomateriales más específicos para actuar como antimicrobianos, de una manera eficiente y específica, reduciendo la toxicidad hacia los seres humanos. Así poder llegar a la aplicación de estas NPs para luchar contra los microorganismos, específicamente en la etapa de transmisión por superficies y prevenir infecciones.

8. Conclusiones

- ❖ El método mecanoquímico, el cual es uno sencillo, reproducible y amigable con el medio ambiente, permite obtener nanoestructuras de ZnO, CuO, ZnFe₂O₄ y CuFe₂O₄, con un diámetro promedio de cristalita de 14.7, 8.7, 6.4 y 7.5 nm, respectivamente.
- ❖ Las NPs de CuFe₂O₄ presentan una mezcla de fases cristalinas; cúbica y tetragonal lo que determina sus potenciales aplicaciones, así como los defectos cristalinos observados.
- ❖ No se observa una relación entre el tamaño de la NP y el efecto antimicrobiano observado, el cual probablemente se vea determinado más por la composición de la NP y los defectos de la estructura cristalina.
- ❖ Las NPs tienen un efecto antimicrobiano a menores concentraciones contra la bacteria Gram positiva que contra la bacteria Gram negativa; esto debido a la diferencia en la composición de su pared celular, lo que hace las bacterias Gram positivas más susceptibles.
- ❖ Las NPs de óxido de cobre y de zinc son más efectivas al eliminar la bacteria *S. epidermidis* a una concentración menor, de 2.3 mg/mL que las correspondientes ferritas. Mientras que las NPs de ferrita de zinc son más efectivas al tener una CMB de 4.7mg/mL que la ferrita de cobre, con una CMB de 9.4 mg/mL. Esto se puede explicar a partir de los diferentes defectos en la red cristalina que presentan los óxidos, como vacancias, defectos intersticiales y electrones desapareados los que probablemente promueven la generación de EROs, lo que eventualmente resultan en la muerte celular.
- ❖ Las NPs de CuFe₂O₄ tienen una mayor actividad antimicrobiana contra *P. aeruginosa*, en comparación con los otros sistemas, siendo su CMB de 18.8 mg/mL. Esto se puede deber a la fuerte interacción que ocurre entre estas NPs y los diferentes aminoácidos y el peptidoglicano; esto a partir del cambio que se observa en los espectros Raman de las interacciones entre estos componentes.
- ❖ A partir de los cambios observados en las diferentes bandas correspondientes al grupo CO₂⁻ y NH₃⁺ en los espectros Raman de las interacciones, se determina que hay una afinidad de las NPs de ZnO, CuO, ZnFe₂O₄ y CuFe₂O₄ por los diferentes componentes de la pared celular.

9. Bibliografía

- [1]. Agency, E. C. (2011). *Definition of a nanomaterial*. European Commission. https://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/faq/definition_en.htm
- [2]. Wang, L., Hu, C., & Shao, L. (2017). The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *Int J Nanomedicine*, 12, 1227-1249. <https://doi.org/10.2147/IJN.S121956>
- [3]. Vázquez-Olmos, A., Vega-Jiménez, A., Paz-Díaz, B. (2018). Mecanosíntesis y efecto antimicrobiano de óxidos metálicos nanoestructurados. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología*, 11(21), 29-44. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2018.21.62545>
- [4]. Organization, W. H. (2017). *Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis*
- [5]. James, S. L., Adaamas, C. J., Bolm, C., Braga, D., Collier, P., Friscic, T., Grepioni, F., Harris, K. D. M., Hyett, G., Jones, W., Krebs, A., Mack, J., Maini, L., Orpen, A. G., Parkin, I. P., Shearouse, W. C., Steed, J. W., Waddell, D. C. (2012). Mechanochemistry: opportunities for new and cleaner synthesis. *Chem. Soc. Rev.*, 41, 413-447. <https://doi.org/10.1039/c1cs15171a>
- [6]. Anastas, P., & Eghbali, N. (2010). Green chemistry: principles and practice. *Chem Soc Rev*, 39(1), 301-312. <https://doi.org/10.1039/b918763b>
- [7]. Morkoc, H., Ozgur, U. (2009). *Zinc Oxide: Fundamentals, Materials and Devie Technology*. Wiley VCH.
- [8]. Gharpure, S., & Ankamwar, B. (2020). Synthesis and Antimicrobial Properties of Zinc Oxide Nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol*, 20 (10), 5977-5996. <https://doi.org/10.1166/jnn.2020.18707>
- [9]. Stan, M., Popa, A., Toloman, Dehelean, A., Lung, I., Katona, G. (2015). Enhanced photocatalytic degradation properties of zinc oxide nanoparticles synthesized by using plant extracts. *Materials Science in Semiconductor Processing*, 39, 23-29. <https://doi.org/10.1016/j.mssp.2015.04.038>
- [10]. Devine, B., Shan, T., Cheng, Y., McGaughey, A. J. H., Lee, M., Phillpot, S. R., Sinnott, S. B. (2011). Atomistic simulations of copper oxidation and Cu/Cu₂O interfaces using charge-optimized many-body potentials. *Physical Review B*, 84, 125308. <https://doi.org/10.1103/PHYSREVB.84.125308>
- [11]. Laha, D., Pramanik, A., Laskar, A., Jana, N., Pramanik, P., Karmakar, P. (2014). Shape-dependent bactericidal activity of copper oxide nanoparticle mediated by DNA and membrane

- damage. *Materials Research Bulletin*, 59, 185-191. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2014.06.024>
- [12]. Sreeju, N., Rufus, A., Philip. D. (2017). Studies on catalytic degradation of organic pollutants and anti-bacterial property using biosynthesized CuO nanostructures. *Journal of Molecular Liquids*, 242, 690-700. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.07.077>
- [13]. Kefeni, K. K., Msagati, T. A. M., Nkambule, T. T., & Mamba, B. B. (2020). Spinel ferrite nanoparticles and nanocomposites for biomedical applications and their toxicity. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 107, 110314. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110314>
- [14]. Kefeni, K. K., Mamba, B. B., Msagati, A. M. T. (2017). Application of spinel ferrite nanoparticles in water and wastewater treatment: A review. *Separation and Purification Technology*, 188, 399-422.
- [15]. Masunga, N., Mmesesi, O. K., Kefeni, K. K., Mamba, B. B. (2019). Recent advances in copper ferrite nanoparticles and nanocomposites synthesis, magnetic properties and application in water treatment: Review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7, 103179. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103179>
- [16]. Mund, H. S., Tiwari, S., Sahariya, J., et al. (2011). Investigation of orbital magnetization in inverse spinel cobalt ferrite using magnetic Compton scattering. *J Appl. Phys.* , 110(7). <https://doi.org/10.1063/1.3650251>
- [17]. Kayani, Z. N., Umer, M., Riaz, S., Naseem, S. (2015). Characterization of Copper Oxide Nanoparticles Fabricated by the Sol–Gel Method. *Journal of Electronic Materials*, 44(10). <https://doi.org/10.1007/s11664-015-3867-5>
- [18]. Muthukumar, K., Lakshmi, D. S., Acharya, S. D., Nataraja, S., Mukherjee, A., Bajaj, H. C. (2018). Solvothermal synthesis of magnetic copper ferrite nano sheet and its antimicrobial studies. *Materials Chemistry and Physics*, 209, 172-179. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2018.02.004>
- [19]. Ansari, M. A., Baykal, A., Asiri, S., Rehman, S. (2018). Synthesis and Characterization of Antibacterial Activity of Spinel Chromium-Substituted Copper Ferrite Nanoparticles for Biomedical Application. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 28, 2316-2327. <https://doi.org/10.1007/s10904-018-0889-5>
- [20]. Centers for Disease Control and Prevention, Public Health Image Library (PHIL), <https://phil.cdc.gov/default.aspx>
- [21]. BBC news, mundo. (2022). "Pandemia silenciosa": las infecciones por bacterias resistentes a antibióticos matan más personas que la malaria y el sida. BBC news mundo. <https://www.bbc.com/mundo/noticias-60073805>

- [22]. Bhunia, A. K., Jha, P. K., Rout, D., Saha, S. (2016). Morphological Properties and Raman Spectroscopy of ZnO Nanorods. *Journal of Physical Sciences*, 21, 111-118.
- [23]. Jagannatha Reddy, A., Kokila, M. K., Nagabhushana, H., Rao, J. L., Shivakumara, C., Nagabhushana, B. M., & Chakradhar, R. P. (2011). EPR, thermo and photoluminescence properties of ZnO nanopowders. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 81(1), 59-63. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2011.06.048>
- [24]. Kaftelen, H., Ocakoglu, K., Thomann, R., Tu, S., Weber, S., Erdem, E. (2012). EPR and photoluminescence spectroscopy studies on the defect structure of ZnO nanocrystals. *Physical Review B*, 86. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.86.014113>
- [25]. Debbichi, L., Marco de Lucas, M. C., Pierson, J. F., Kruger, P. (2012). Vibrational Properties of CuO and Cu₄O₃ from First-Principles Calculations, and Raman and Infrared Spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry C*, 116(18), 10232-10237. <https://doi.org/10.1021/jp303096m>
- [26]. Punnose, A., Mathew, J., Maurya, B. P., Umar, M., Singh, R. J. (1992). ESR study of CuO bulk powder and thin films. *Modern Physics Letters B*, 6(16 & 17), 1043-1047.
- [27]. Granone, L. I., Ulpe, A. C., Robben, L., Klimke, S., Jahns, M., Renz, F., Gesing, T. M., Bredow, T., Dillert, R., & Bahnemann, D. W. (2018). Effect of the degree of inversion on optical properties of spinel ZnFe₂O₄. *Phys Chem Phys*, 20(44), 28267-28278. <https://doi.org/10.1039/c8cp05061a>
- [28]. Singh, J. P., Srivastava, R. C., Agrawal, H.M., Kumar, R. (2010). Micro-Raman investigation of nanosized zinc ferrite: effect of crystallite size and fluence of irradiation. *Journal of Raman Spectroscopy*, 42(7), 1510-1517. <https://doi.org/10.1002/jrs.2902>
- [29]. Samoila, P., Cojocaru, C., Cretescu, I., Sta, C. D., Nica, V., Sacarecu, L., Harabagiu, V. (2015). Nanosized Spinel Ferrites Synthesized by Sol-Gel Autocombustion for Optimized Removal of Azo Dye from Aqueous Solution. *Journal of Nanomaterials*, 2015, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2015/713802>
- [30]. Slatineanu, T., Diana, E., Nica, v., Oancea, V., Caltun, O. F., Iordan, A. R., Palamaru, M. N. (2012). The influence of the chelating/combustion agents on the structure and magnetic properties of zinc ferrite. *Central European Journal of Chemistry*, 10(6), 1799-1807. <https://doi.org/10.2478/s11532-012-0098-y>
- [31]. Singh, J. P., Srivastava, R. C., Agrawal, H.M., Kushwaha, R. P. S. (2008). EPR study of nanostructured zinc ferrites. *International Journal of Nanoscience*, 7(1), 21-27.
- [32]. Subha, A., Shalini, M. G., Sahu, B., Sahoo, s. C. (2018). Structural transformation and magnetic properties of copper ferrite nanoparticles prepared by sol-gel method. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 29, 20790-20799.

<https://doi.org/10.1007/s10854-018-0221-8>

- [33]. Fomenko, A. N., Kondranova, A. M., Kazantsev, S. O., Lozkomoev, A. S., Pervikov, A. V. (2019). Antimicrobial activity of CuFe₂O₄ nanoparticles obtained by electric explosion of Fe and Cu wires. *AIP Conference Proceedings*,
- [34]. Dhiwahaar, A. T., Sundararajan, M., Sakthiverl, P., Dash, C. S., Yuvaraj, S. (2020). Microwave-assisted combustion synthesis of pure and zinc-doped copper ferrite nanoparticles: Structural, morphological, optical, vibrational, and magnetic behavior. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 138. <https://doi.org/10.1016/j.jpics.2019.109257>
- [35]. Paz-Díaz, B. (2016). *Nanoestructuras de CuO, ZnO Y CuZnO obtenidas por mecanosíntesis en presencia de disolventes*. Tesis maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.
- [36]. Ansari, M. A., Khan, H. M., Khan, A. A., Sultan, A., & Azam, A. (2012). Synthesis and characterization of the antibacterial potential of ZnO nanoparticles against extended-spectrum beta-lactamases-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from a tertiary care hospital of North India. *Appl Microbiol Biotechnol*, 94(2), 467-477. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3733-1>
- [37]. Baraki, R., Zierp, P., Erdem, E., Weber, S., & Granzow, T. (2014). Electron paramagnetic resonance study of ZnO varistor material. *J Phys Condens Matter*, 26(11), 115801. <https://doi.org/10.1088/0953-8984/26/11/115801>
- [38]. Buarod, E., Pithakratanayothin, S., Naknaka, S., Chaiyasith, P., Yotkaew, T., Tosangthum, N., Tongsri, R. (2015). Facile synthesis and characterization of tenorite nanoparticles from gas-atomized Cu powder. *Powder Technology*, 269, 118-126. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2014.08.052>
- [39]. Das, D., Nath, B. C., Phukon, P., & Dolui, S. K. (2013). Synthesis and evaluation of antioxidant and antibacterial behavior of CuO nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 101, 430-433. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.07.002>
- [40]. Eagling, R., & Royal Society of Chemistry (Great Britain). (2014). *Mechanochemistry : from functional solids to single molecules, Montreal, Canada, 21-24 May 2014*. Royal Society of Chemistry.
- [41]. Kalpana, V. N., Alarjani, K. M., & Rajeswari, V. D. (2020). Enhancing malaria control using *Lagenaria siceraria* and its mediated zinc oxide nanoparticles against the vector *Anopheles stephensi* and its parasite *Plasmodium falciparum*. *Sci Rep*, 10(1), 21568. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77854-w>
- [42]. Kalyani, R. L., Venkatraju, J., Kollu, P., Rao, N. H., Pammi, S. V. N. (2015). Low temperature synthesis of various transition metal oxides and their antibacterial activity against

- multidrug resistance bacterial pathogens. *Korean journal of Chemical Engineering*, 32, 911-916. <https://doi.org/10.1007/s11814-014-0262-5>
- [43]. Kannaujia, R., Prasad, V., Sapna, Rawat, P., Rawat, V., Thakur, A., Majumdar, S., Verma, M., Rao, G. K., Gupta, A. P., Kumar, H., Srivastava, C. M. (2019). Facile synthesis of CuFe₂O₄ doped polyacrylic acid hydrogel nanocomposite and its application in dye degradation. *Materials Letters*, 252, 198-201. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2019.05.094>
- [44]. Lungu, I. I., Holban, A. M., Ficai, A., Grumezescu, A. M. (2017). Zinc Oxide Nanostructures: New Trends in Antimicrobial Therapy. In Elsevier (Ed.), *Nanostructures for Antimicrobial Therapy*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46152-8.00022-6>
- [45]. Mahmoodi, N. M. (2011). Photocatalytic ozonation of dyes using copper ferrite nanoparticle prepared by co-precipitation method. *Desalination*, 279, 332-337. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2011.06.027>
- [46]. Mandal, S., Natarajan, S., Tamilselvi, A., Mayadevi, S. (2016). Photocatalytic and antimicrobial activities of zinc ferrite nanoparticles synthesized through soft chemical route: A magnetically recyclable catalyst for water/wastewater treatment. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 4(3), 2706-2712. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2016.05.020>
- [47]. Motaung, D. E., Mhlongo, G. H., Nkosi, S. S., Malgas, G. F., Mwakikunga, B. W., Coetsee, E., Swart, H. C., Abdallah, H. M., Moyo, T., & Ray, S. S. (2014). Shape-selective dependence of room temperature ferromagnetism induced by hierarchical ZnO nanostructures. *ACS Appl Mater Interfaces*, 6(12), 8981-8995. <https://doi.org/10.1021/am501911y>
- [48]. Naseri, M. G., Saion, E. B., Ahangar, H. A., Shaari, A. H. (2013). Fabrication, characterization, and magnetic properties of copper ferrite nanoparticles prepared by a simple, thermal-treatment method. *Materials Research Bulletin*, 48, 1439-1446. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2012.12.039>
- [49]. Nikolic, V. N., Vasic, M., Milic, M. M. (2018). Observation of low- and high-temperature CuFe₂O₄ phase at 1100°C: the influence of Fe³⁺ ions on CuFe₂O₄ structural transformation. *Ceramics International*, 44(17). <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2018.08.157>
- [50]. Nikolic, V. N., Vasic, M., Kistic, D. (2019). Observation of c-CuFe₂O₄ nanoparticles of the same crystallite size in different nanocomposite materials: The influence of Fe³⁺ cations. *Journal of Solid State Chemistry*, 275, 187-196. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2019.04.007>
- [51]. Rachna, S., N. B., Agarwal, A. (2018). Preparation, Characterization, Properties and Applications of nano Zinc Ferrite. National Conference of Nanomaterials and Nanotechnology,
- [52]. Savoyant, A., Rollo, M., Texier, M., Adam, R. E., Bernardini, S., Pilone, O., Margeat, O., Nur, O., Willander, M., & Bertaina, S. (2020). Light-induced high-spin state in ZnO

- nanoparticles. *Nanotechnology*, 31(9), 095707. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/ab57f1>
- [53]. Sharma, R. P., Raut, S. D., Jadhav, V. V., Kadam, A. S., Mane, R. S. (2019). Anti-candida and anti-adhesion efficiencies of zinc ferrite nanoparticles. *Materials Letters*, 237(15), 165-167. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2018.11.073>
- [54]. Singh, J. P., Dixit, G., Srivastava, R. C., Kumar, H., Agrawal, H.M., Chand, P. (2013). Magnetic resonance in superparamagnetic zinc ferrite. *Bull. Mater. Sci.*, 36(4), 751-754.
- [55]. Singh, T. A., Das, J., & Sil, P. C. (2020). Zinc oxide nanoparticles: A comprehensive review on its synthesis, anticancer and drug delivery applications as well as health risks. *Adv Colloid Interface Sci*, 286, 102317. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102317>
- [56]. Sirelkhatim, A., Mahmud, S., Seeni, A., Kaus, N. H. M., Ann, L. C., Bakhori, S. K. M., Hasan, H., & Mohamad, D. (2015). Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. *Nanomicro Lett*, 7(3), 219-242. <https://doi.org/10.1007/s40820-015-0040-x>
- [57]. Stan, M., Popa, A., Toloman, D., Silipas, T-D., Vodnar, D. C., Katona, G. (2015). Enhanced antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles synthesized using *Petroselinum crispum* extracts. International Conference Processes in Isotopes and Molecules,
- [58]. Yadav, R. S., Havlica, J., Masilko, J., Kalina, L., Wasserbauer, J., Hajduchova, M., Enev, V., Kuritka, I., Kozakova, Z. (2016). Cation Migration-Induced Crystal Phase Transformation in Copper Ferrite Nanoparticles and Their Magnetic Property. *J Supercond Nov Magn*, 29, 759-769. <https://doi.org/10.1007/s10948-015-3339-4>
- [59]. Zhang, F., Wei, C., Wu, K., Zhou, H., Hu, Y., Preis, S. (2017). Mechanistic evaluation of ferrite AFe_2O_4 (A =Co, Ni, Cu, and Zn) catalytic performance in oxalic acid ozonation. *Applied Catalysis A, General*, 547, 60-68. <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2017.08.025>
- [60]. Wang, L., Hu, C., & Shao, L. (2017). The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *Int J Nanomedicine*, 12, 1227-1249. <https://doi.org/10.2147/IJN.S121956>

APÉNDICE A

EPR de Productos Másicos

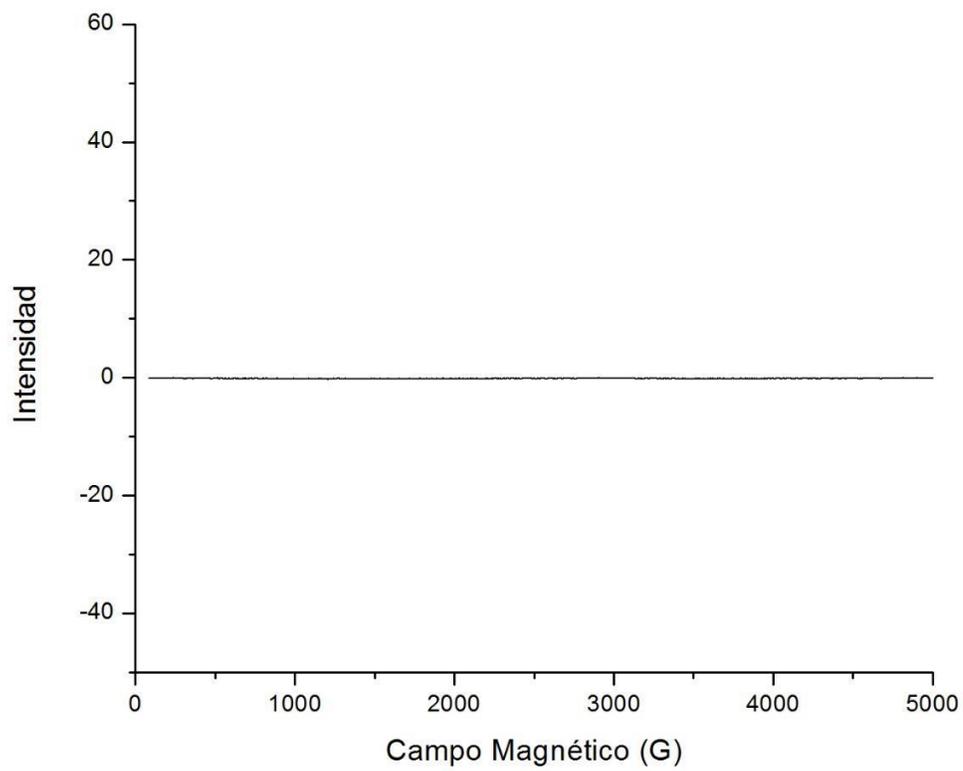


Figura 45. Espectro de EPR de ZnO comercial

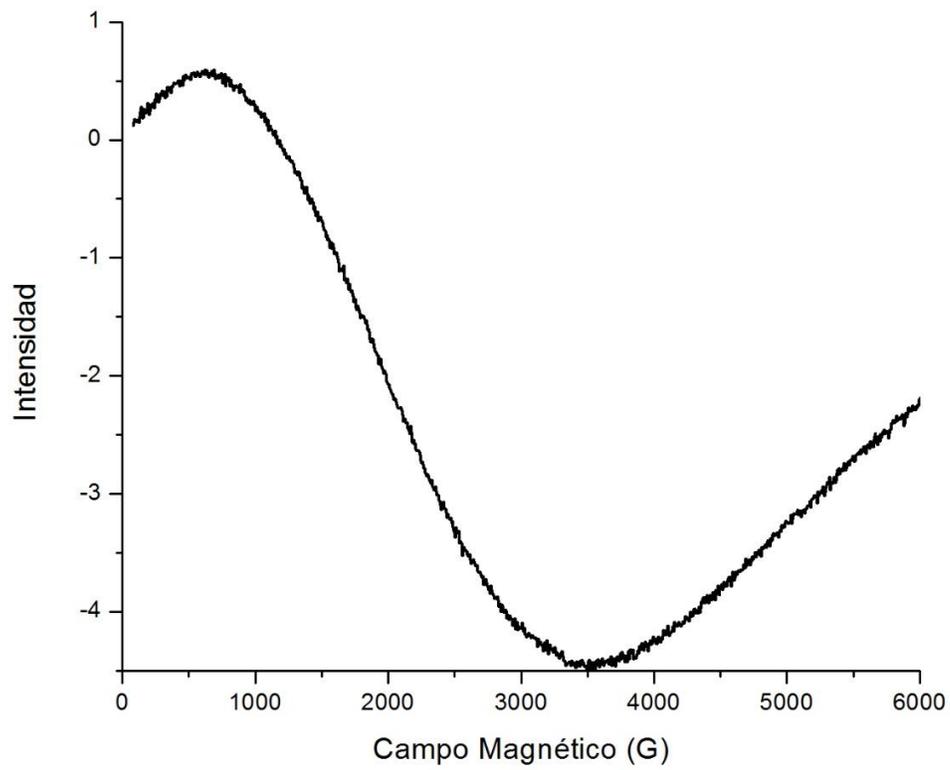


Figura 46. Espectro de EPR de CuO comercial

APÉNDICE B

Gráficas para la determinación de la Concentración Mínima Bactericida.

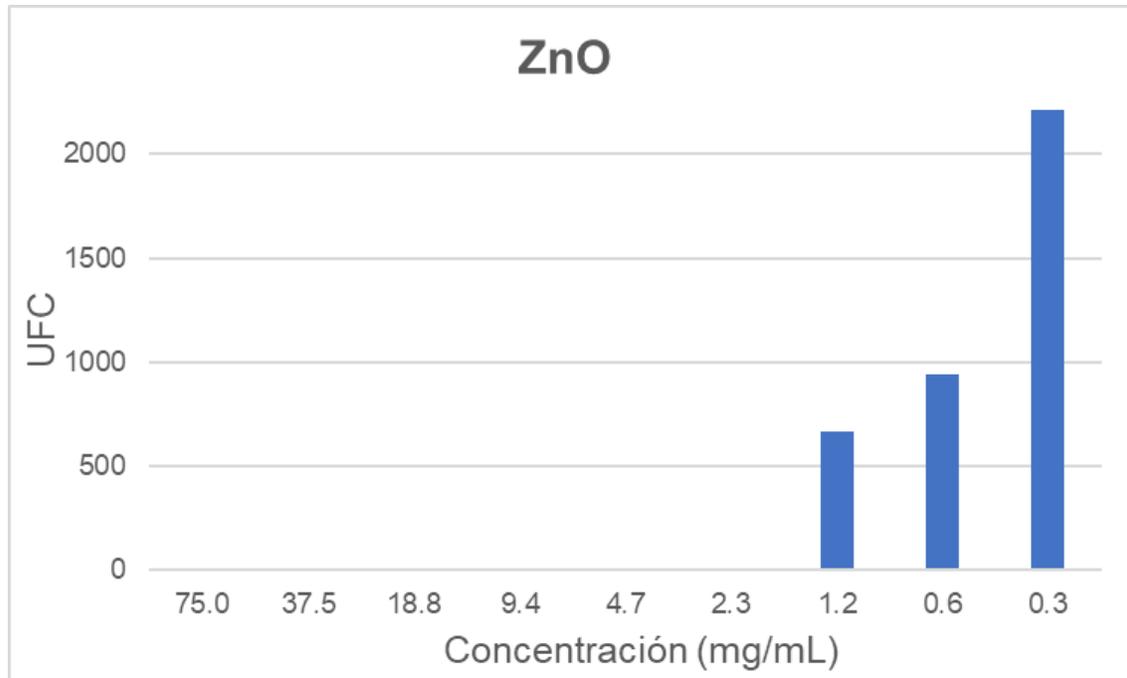


Figura 47. Determinación de CMB de las NPs de ZnO contra *S. epidermidis*.

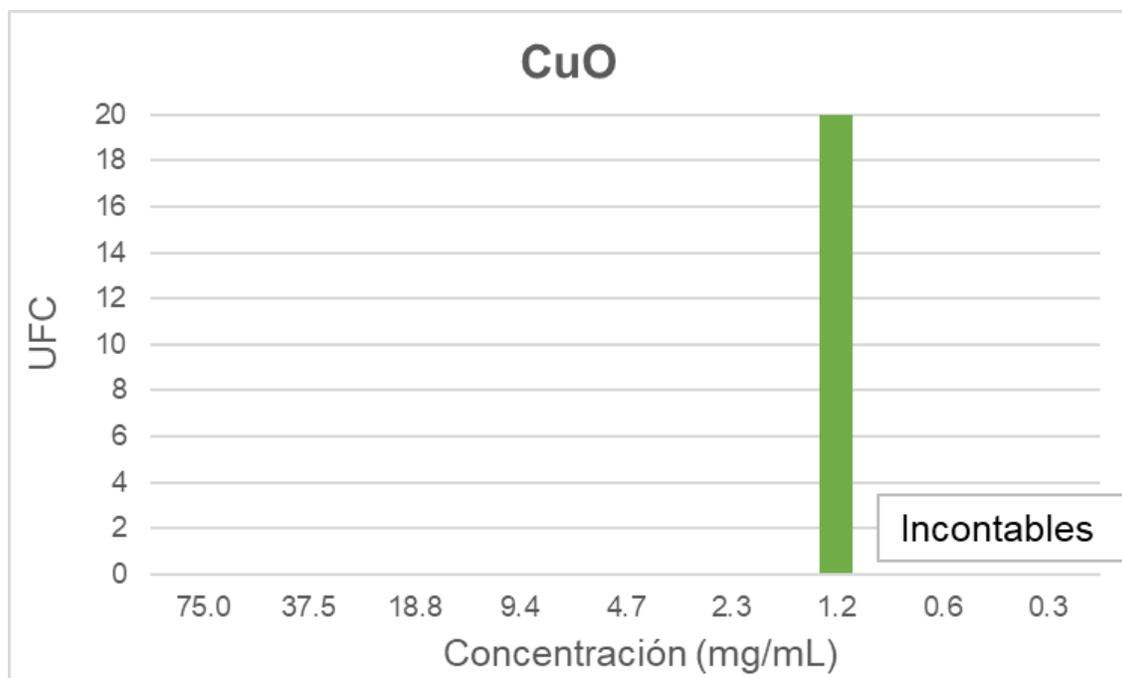


Figura 48. Determinación de CMB de las NPs de CuO contra *S. epidermidis*.

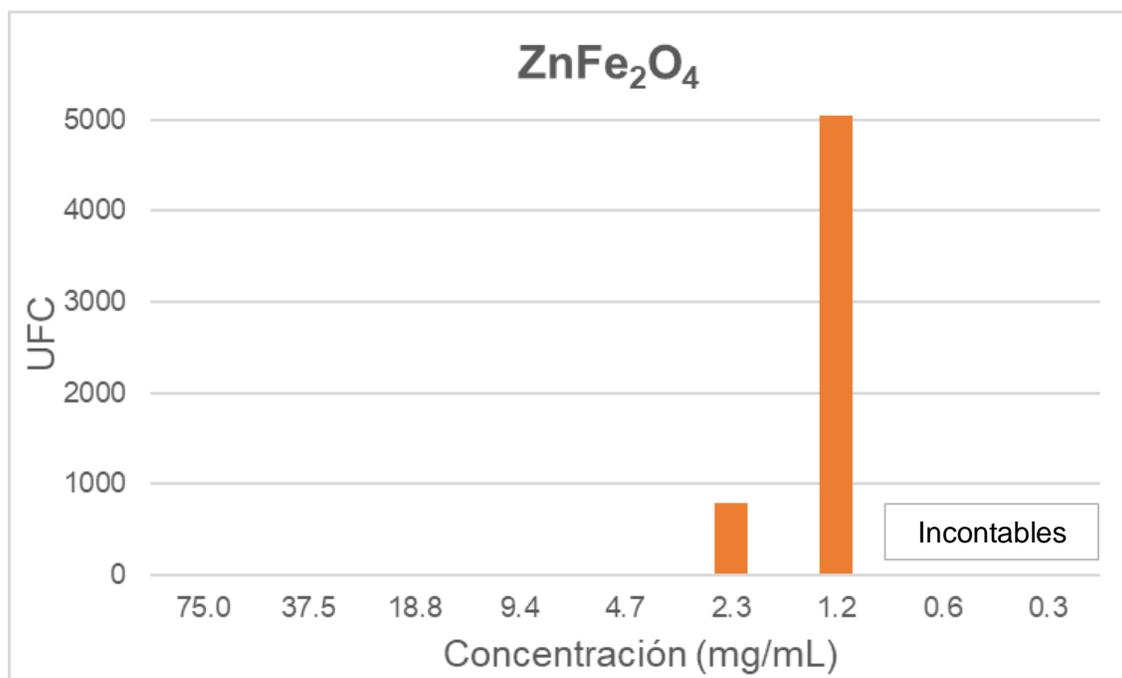


Figura 49. Determinación de CMB de las NPs de ZnFe₂O₄ contra *S. epidermidis*.

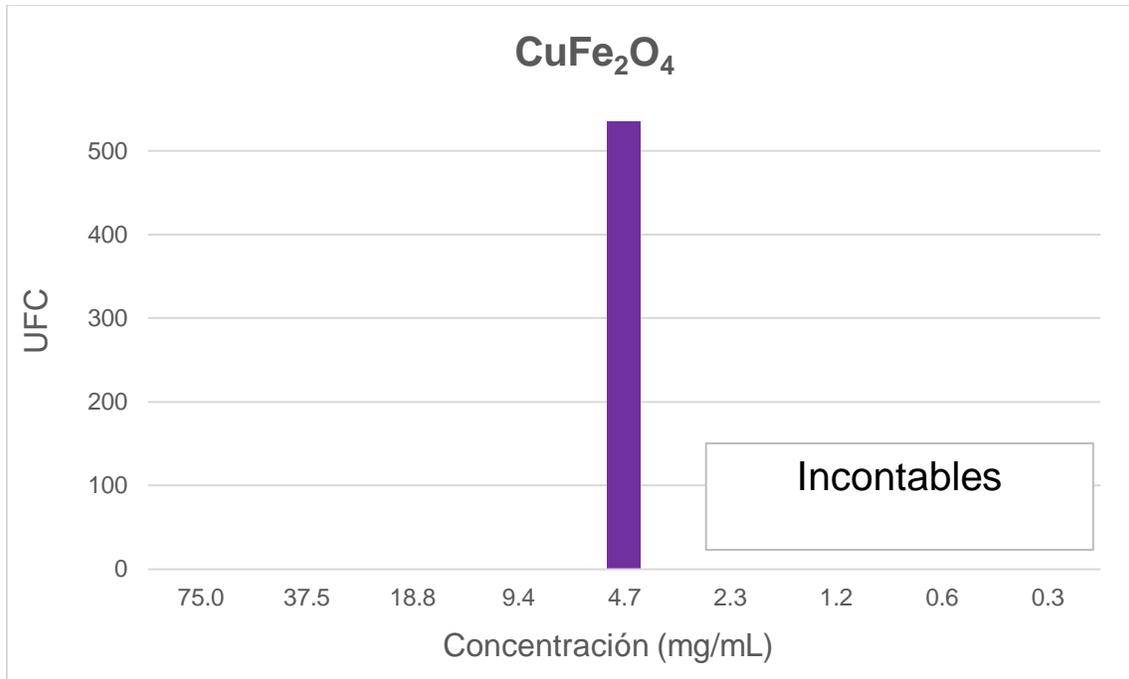


Figura 50. Determinación de CMB de las NPs de CuFe₂O₄ contra *S. epidermidis*.

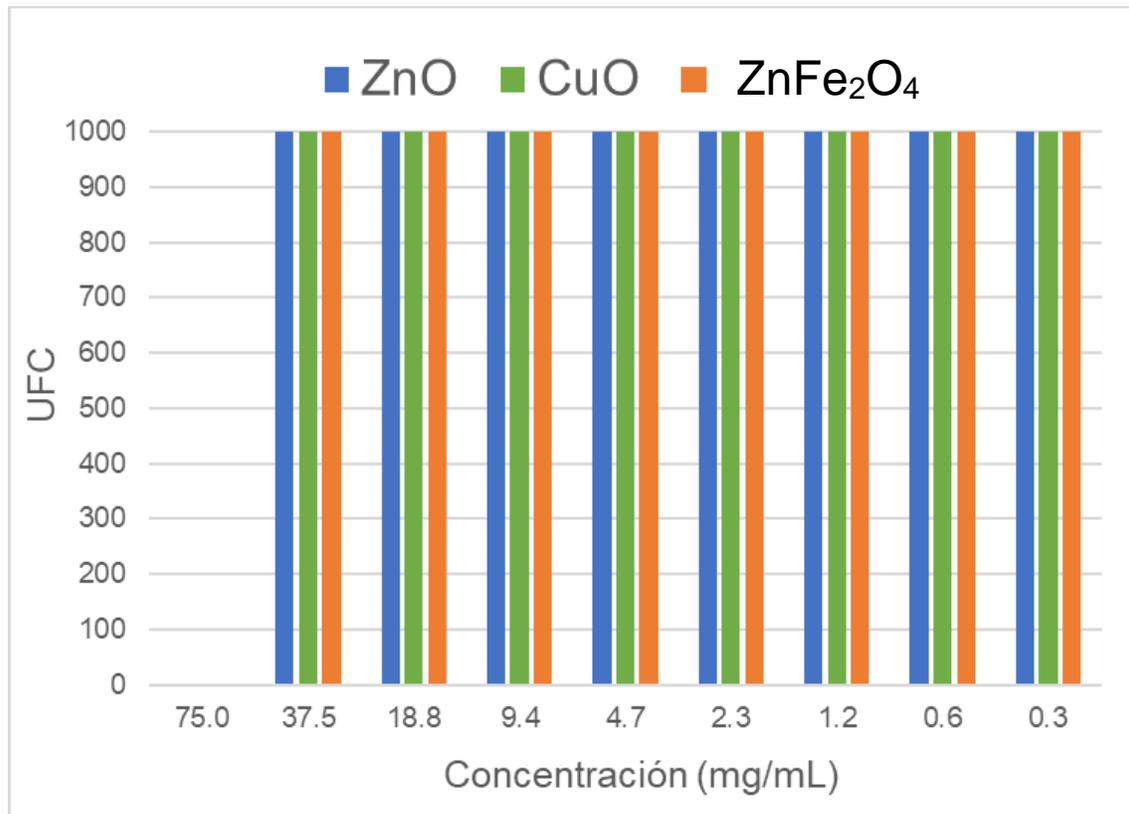


Figura 50. Determinación de CMI de las NPs de ZnO, CuO y ZnFe₂O₄ contra *P. aeruginosa*.

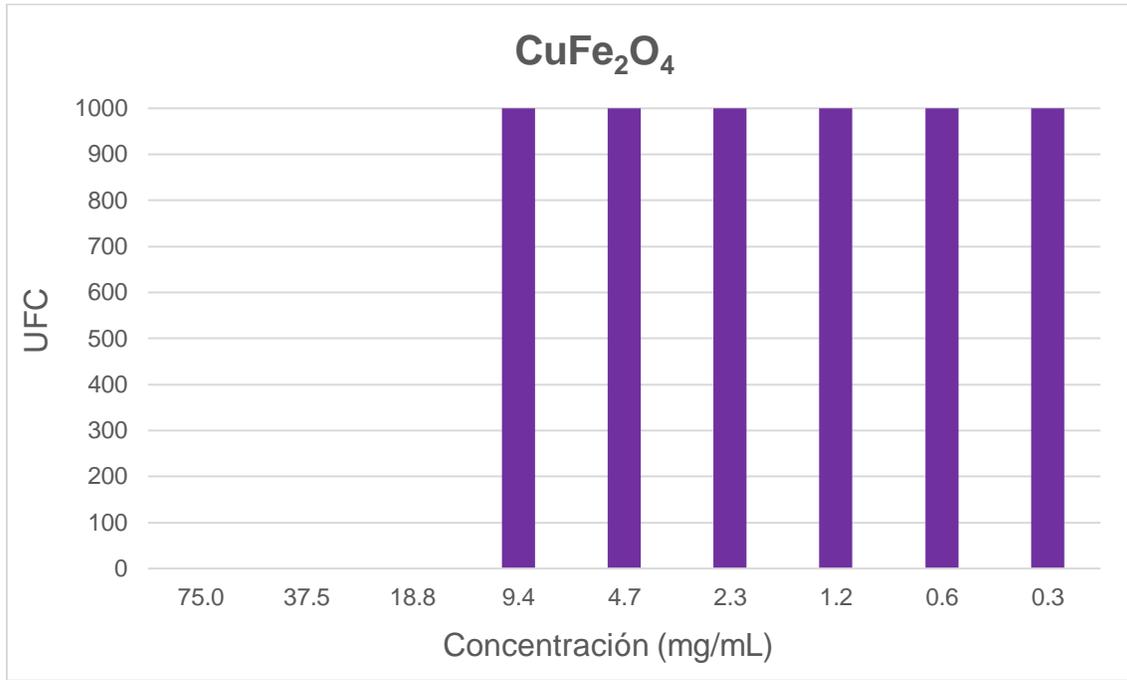


Figura 51. Determinación de CMI de las NPs de CuFe₂O₄ contra *P. aeruginosa*.

Trabajos presentados en congresos

1) América R. Vázquez-Olmos, Blanca Paz-Díaz, Roberto Y. Sato-Berrú, Esther Mata-Zamora, Yara C. Almanza-Arjona, Argelia Almaguer Flores

"Obtención y estudio de la actividad bactericida de ferritas nanoestructuradas (CuFe_2O_4 y ZnFe_2O_4) obtenidas por un método mecanoquímico".

SOMI XXXV Congreso de Instrumentación

CDMX, México

27-29 de octubre del 2021

2) Paz Díaz Blanca, Vázquez Olmos América, Almaguer Flores Argelia, Sato Berrú Roberto, Fernández Osorio Ana Leticia

"Síntesis, caracterización y evaluación de las propiedades microbidas de nanopartículas de ZnO y ZnFe_2O_4 "

9° Encuentro de Química Inorgánica

Ixtaczoquitlán, Veracruz, México

25 al 28 de junio del 2019.

3) Paz-Díaz, Blanca; Vázquez-Olmos, América; Almaguer-Flores, Argelia; Sato-Berrú, Roberto; Fernández-Osorio, Ana Leticia.

"Antimicrobial activity of ZnO and ZnFe_2O_4 nanoparticles obtained by a solvent-free method"

19 TechConnect World Innovation Conference and Expo co-located with the Nanotech 2019, AI TechConnect and SBIR/STTR Spring Innovation Conference

Boston, Massachusetts, EUA.

17 al 19 de junio del 2019

Artículo publicado

Paz-Díaz, B., Vázquez-Olmos, A. R., Almaguer-Flores, A., García-Pérez, V. I., Sato-Berrú, R. Y., Almanza-Arjona, Y. C., & Garibay-Febles, V. (20 de noviembre de 2021). ZnFe_2O_4 and CuFe_2O_4 Nanocrystals: Synthesis, Characterization, and Bactericidal Application. *J Clust Sci* doi:10.1007/s10876-021-02203-4



ZnFe₂O₄ and CuFe₂O₄ Nanocrystals: Synthesis, Characterization, and Bactericidal Application

Blanca Paz-Díaz¹ · América R. Vázquez-Olmos¹ · Argelia Almaguer-Flores² · Víctor I. García-Pérez² · Roberto Y. Sato-Berrú¹ · Yara C. Almanza-Arjona³ · Vicente Garibay-Feblés³

Received: 17 September 2021 / Accepted: 9 November 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2021

Abstract

An easy mechanochemical and eco-friendly method was employed to obtain nanocrystals with an average size of about 9 nm of zinc ferrite (ZnFe₂O₄) and copper ferrite (CuFe₂O₄). Their corresponding X-ray diffraction (XRD) patterns reveal a cubic crystal structure for ZnFe₂O₄, whereas in CuFe₂O₄ the tetragonal and cubic crystal phases coexist, the latter being the majority phase. The transmission electron microscopy (TEM) images of these nano ferrites corroborate the formation of nanocrystals with dimensions consistent with those obtained from the XRD patterns. Furthermore, their corresponding Raman spectra confirm the structure and composition of nano ferrites. In addition, both nano ferrites show an electron paramagnetic resonance (EPR) spectrum with a wide band with $g \sim 2.0$, characteristic of ferromagnetic oxides. Besides, the antibacterial effect of ZnFe₂O₄ and CuFe₂O₄ nanocrystals against two opportunistic pathogens, *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 14,990) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 43,636), was tested. The minimum bactericidal concentration (MBC) results showed that ZnFe₂O₄ was more effective against *S. epidermidis*, while CuFe₂O₄ was for *P. aeruginosa*. On the other hand, when 27 mg/mL of nano ferrites were dispersed in the agar plates, the growth of *S. epidermidis* was 100% inhibited, whereas ZnFe₂O₄ and CuFe₂O₄ inhibited 67% and 78% of *P. aeruginosa* growth, respectively.

Keywords Mechanochemical · Nanocrystals · Zinc ferrite · Copper ferrite · Antibacterial activity

Introduction

Due to their superparamagnetic and catalytic behavior, ferrites nanoparticles have received much attention in recent times [1]. In particular, spinel ferrites with general formula AB₂O₄, where A is a divalent cation and B is Fe³⁺, are amongst the most studied systems. They have very desirable properties for various applications, including

antimicrobial activity against some pathogenic microorganisms.

Zinc ferrite (ZnFe₂O₄) is a mixed oxide where the Zn²⁺ ions occupy the tetrahedral (A) sites while the Fe³⁺ ions take up the octahedral (B) sites in a unit cell of 32 oxygen (O) atoms in a cubic close-packed (ccp) arrangement [2]. ZnFe₂O₄ is a semiconductor with a narrow bandgap of 1.9 eV [3] for bulk material. Over the last two decades, this compound has received considerable attention because of its technological applications in ferrofluids, medical imaging, drug targeting, magnetic data storage, and catalysis [4–7]. ZnFe₂O₄ nanoparticles (NPs) significantly contribute to biomedical applications mainly due to their biocompatible nature [8]. Synthesis methods like sol-gel [9], microemulsion [10], precipitation [11], sonochemical synthesis [12], hydrothermal [13], pulsed laser deposition [14], combustion method [15], solid-state [16] and biosynthesis [17] have been used to prepare ZnFe₂O₄ NPs.

✉ América R. Vázquez-Olmos
america.vazquez@icat.unam.mx

¹ Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior S/N, 04510 CDMX, México

² Facultad de Odontología, DEPeI, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 CDMX, México

³ Instituto Mexicano del Petróleo, Eje Central Lázaro Cárdenas Norte, 152 Col. San Bartolo Atepehuacan, 07730 CDMX, México

Oppositely, copper ferrite (CuFe_2O_4) has an inverse spinel structure with ferromagnetic behavior [18]; it is a p-type semiconductor with a bandgap around 1.39 to 2.5 eV [19, 20]. In this ferrite, Cu^{2+} occupies the octahedral sites, while Fe^{3+} occupies tetrahedral and octahedral sites. The distribution of cations will strongly affect crystal symmetry and the properties of the nanoparticles [21]. When the synthesis is carried out at lower temperatures, around 300 °C, this ferrite crystallizes in a tetragonal phase, with space group $I41/amd$. However, when the temperature increases above 350 °C, the cubic phase, with a space group $Fd-3m$, is favored [22]. When the crystal is cubic, there is a partial migration of the divalent cations (copper) to the tetrahedral site. The distribution of the copper ion provides unique properties to this ferrite and influences the type of crystal structure that it can present, due primarily to the contribution of the Jahn–Teller effect [21]. Several methods to synthesize CuFe_2O_4 NPs have been employed such as sol–gel [22–24], combustion [20], sonochemical [25], solvothermal [23, 26], co-precipitation [21, 27–29], microemulsion [30] and solid-state [18, 23, 31, 32]. In biomedicine, the main application of CuFe_2O_4 NPs is in drug delivery, magnetic resonance imaging, and magnetic separation of cancer cells [33]. The tetragonal crystal structure is mostly used in catalytic applications, while the cubic structure is preferred for magnetic properties [34, 35].

It is well known that the properties nanomaterials exhibit depend on the composition, size, and shape. Therefore, the synthesis method may directly influence their chemical, optical, mechanical, electrical, magnetic, and antimicrobial properties. [36, 37]. This work employs an uncomplicated and solvent-free mechanochemical synthesis method to produce ZnFe_2O_4 and CuFe_2O_4 nanocrystals. *Mechanosynthesis* is a term used to describe substances' chemical and physicochemical transformation during aggregation processes initiated by mechanical energy. These phenomena occur due to the generation of crystalline defects and the accumulation of tension in the crystal lattice produced during the mechanical alloy process [36]. The main advantages over other procedures to obtain nanoparticles include less complicated and environmentally friendly processes since it excludes using large amount of solvents [38, 39]. Milling can be carried out in various ways; the simplest is the use of an agate mortar. Hand-milling processes can generate many mechanochemical reactions that do not require overcoming a high energy barrier [40]. Nevertheless, ball mills are used when higher energies are needed; the milling usually goes through hours or even days.

To evaluate their antimicrobial activity, the zinc and copper ferrites obtained in this work were tested against two opportunistic pathogens that have recently gained

relevance: *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa*.

S. epidermidis is a Gram-positive bacterium that belongs to the group of coagulase-negative [41]. This pathogen is part of the human epithelia microflora; however, this strain has emerged as an opportunistic pathogen causing different infections. *S. epidermidis* represents the most frequent cause of infections related to medical devices, such as peripheral or central intravenous catheters. Specifically, catheter-related infections are associated with increased mortality and more extended hospital stays. This type of infection is higher healthcare costs, which is not always affordable for developing countries. [42]. *P. aeruginosa* is a Gram-negative bacterium found in water, plants, soil, and animals' epidermis. In nature, it is commonly found as plankton swimming through water or as a biofilm. Uniquely, *P. aeruginosa* can survive in a variety of temperatures and low nutrient conditions. Being an opportunistic pathogen, *P. aeruginosa* requires a lack of immunity from the host to be able to cause an infection. For this reason, it is such a substantial nosocomial threat for patients with ventilation machines, cancers, and burns. Colonization of *P. aeruginosa* in the respiratory tract is associated with sepsis and death. Any immunosuppressed patient who has experienced significant amounts of trauma is at risk of getting an infection [43].

Materials and Methods

Materials

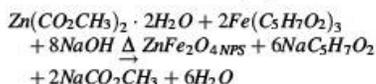
Zinc acetate dihydrate, $\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (99%), copper acetate, $\text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ (99.99%), iron acetylacetonate, $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2)_3$ (99.9%), sodium hydroxide, NaOH (98%), and acetone $\text{CO}(\text{CH}_3)_2$ (99.5%) were obtained from Sigma-Aldrich. All chemicals were used without further purification. Ultrapure water ($18\text{M}\Omega/\text{cm}$) was obtained from a Barnstead E-Pure deionization system.

The bacterial strains used for the antibacterial assays were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC®). Two aerobic strains, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC®43,636TM) and *Staphylococcus epidermidis* (ATCC®14,990TM), were cultured using Trypticase soy broth (TSB) and trypticase agar base from Becton–Dickinson, Microbiology Systems, BBL®. Hemin and menadione from Sigma-Aldrich.

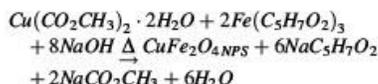
Synthesis of Nano Ferrites

The synthesis of the ZnFe_2O_4 NPs was carried out as follows. 0.27 g (10^{-3} mol) of zinc acetate dihydrate, $\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ were ground in an agate mortar with 0.73 g

(2×10^{-3} mol) of iron acetylacetonate, $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2)_3$ for 10 min. Then, 0.33 g (8×10^{-3} mol) of sodium hydroxide, NaOH previously ground, was added to the metallic salts' mixture, and the milling continued for 30 min. The obtained powder was washed with distilled water four times and then twice with acetone. In each case, the product was separated by centrifugation at 3500 rpm for 10 min. The product was dried at room temperature and then calcined at 400 °C for 2 h. Finally, a powder with a light orange color was obtained. The general chemical reaction to obtain the ZnFe₂O₄ NPs is as follows.



CuFe₂O₄ NPs were synthesized from 0.73 g (2×10^{-3} mol) of iron acetylacetonate, $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2)_3$, and 0.18 g (10^{-3} mol) of copper acetate, $\text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ milled for 10 min. Then, 0.33 g (8×10^{-3} mol) of ground NaOH was added to the previous mixture. All reagents were milled for 30 min obtaining a dark orange powder, washed with distilled water four times, and then twice with acetone. In each case, it was separated by centrifugation at 3500 rpm for 10 min. Finally, the product was dried at room temperature and then calcined at 400 °C for 2 h. The general chemical reaction to obtaining the CuFe₂O₄ NPs is shown below.



The yielding of the reactions was around 85%, and they were carried out in triplicate to guarantee the reproducibility of the synthesis method.

Instruments for Characterization of Nano Ferrites

X-ray diffraction patterns were performed at room temperature with Cu K α radiation ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$) in a D5000 Siemens diffractometer; diffraction intensity was measured between 2.5° and 70°, with 2 θ step of 0.02°, for 0.8 s per point. The average crystal size (D) of the NPs was estimated from their diffractograms, using the Debye-Scherrer formula, $D = \kappa\lambda/\beta\cos\theta$, where κ is the shape factor equal to 0.9, λ is the CuK α radiation, β is the full width at half maximum intensity of selected peaks (FWHM), and θ is the Bragg angle. Raman spectra from 100 to 900 cm^{-1} were evaluated using a TriVista 557 dispersive Raman spectrometer with an exciting radiation of 532 nm and detected by a CCD camera at 25 s and a resolution of $\sim 1.9 \text{ cm}^{-1}$. Electron paramagnetic resonance spectra (EPR) were obtained in an ELEXSYS E500 Bruker at room

temperature in X band, using a frequency of 9.8586×10^9 Hertz, power of 0.002 Watts, with a field centered at 3350 Gauss. Transmission electron micrographs (TEM) were obtained with an FEI Tecnai F20 microscope, operating at 200 kV S/TEM field emission with an X-TWIN lens and a high brightness field emission electron gun (FEG), by deposition of a drop of the powdered ZnFe₂O₄ or CuFe₂O₄ NPs dispersed in ethanol onto 300 mesh Cu grids coated with a carbon layer.

Antimicrobial Assays

Bacterial strains were cultured on enriched TSA plates (Trypticase Soy Agar added with 0.3 $\mu\text{g/mL}$ menadione and 5 $\mu\text{g/mL}$ hemin) in aerobic conditions at 37 °C. The antimicrobial effect of the ZnFe₂O₄ and CuFe₂O₄ nanoparticles was determined using the minimum bactericidal concentration (MBC) and the agar dispersion methods, based on the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) for the evaluation of antimicrobial susceptibility tests. All experiments were performed in triplicate.

The MBC is the most common estimation of bactericidal activity. It is the lowest concentration of antimicrobial agent needed to kill 99.9% of the final inoculum after 24 h of incubation under a standardized set of conditions. The MBC can be determined by the counting of the colony-forming units (CFUs) that can be observed after broth microdilution or microdilution by sub-culturing a sample, yielding a negative microbial growth on the surface of non-selective agar plates to determine the number of surviving cells (number of CFU/mL) [44, 45]. First, the growth of pure cultures of each strain was harvested from the agar surfaces and suspended in individual tubes with enriched TSB culture broth (Trypticase Soy Broth added with 0.3 $\mu\text{g/mL}$ of menadione and 5 $\mu\text{g/mL}$ of hemin). Each tube's optical density (OD) was measured in a spectrophotometer (600 nm) and adjusted to obtain a suspension with 10^4 cells/mL. Then, 20 μL of the adjusted suspension of the bacterial strains were individually transferred in 96-well microplates, and different concentrations of the NPs (from 0.3 to 75 to mg/mL) were separately placed on each well in a total volume of 200 μL . The TSB culture broth without NPs was used as the negative control and TSB with chlorhexidine (0.2%) as the positive control. The microplates were incubated for 24 h at 37 °C using orbital shaking at 100 rpm. After incubation, 10 μL were taken from each well, previous homogenization, inoculated on TSA plates and incubated for 24 h at 37 °C. Then, the agar plates were visually examined, and the MBCs were determined based on the plates where no visible bacterial growth was observed.

The agar dispersion method was done as follows: adjusted suspensions of 10^3 cells/mL of each strain were plated and incubated on enriched TSA plates prepared with 27 mg/mL of ZnFe_2O_4 or CuFe_2O_4 NPs, using TSA agar plates without NPs as negative controls. Plates were incubated at 37°C under aerobic conditions for 24 h. After incubation, the number of Colony Forming Units (CFUs) was visually counted. The antibacterial effectiveness of the NPs was expressed as the inhibition ratio according to the following equation:

$$\text{Inhibition ratio (\%)} = \left(\frac{A1 - A2}{A1} \right) \times 100$$

A1 = total number of CFUs in the plates without NPs (negative control).

A2 = total number of CFUs in the NPs containing plates.

All experiments were performed in triplicate.

Results and Discussion

Nanoparticles of ZnFe_2O_4 and CuFe_2O_4

The powder X-ray diffraction patterns of the ZnFe_2O_4 and CuFe_2O_4 NPs are shown in Fig. 1. For the ZnFe_2O_4 NPs, all the diffraction peaks correspond to the cubic phase for a spinel-type structure with space group $Fd\bar{3}m$, according to JCPDS 89-7412 card (Fig. 1a). In contrast, the CuFe_2O_4 NPs shows an XRD pattern with peaks corresponding to the cubic phase (JCPDS 25-0283) and some diffraction peaks due to the tetragonal phase (JCPDS 34-0425) at 43.8° (220), 54.5° (312), 57.8° (321) and 63.7° (400) marked by asterisks in Fig. 1b. The temperature treatment

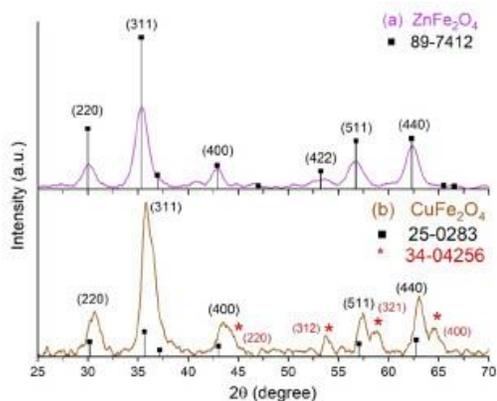


Fig. 1 X-ray diffraction patterns of **a** ZnFe_2O_4 NPs and **b** CuFe_2O_4 NPs, the peaks marked by asterisks correspond to the tetragonal phase

has been the most studied factor that determines the crystal structure for this ferrite; however, there have been several reports that show that the final crystal structure of the system will be determined by the synthesis method and its overall conditions (pH, solvent, atmosphere, reactants, reactants concentrations) [21]. In this case, using a mechanochemical synthesis and a thermal treatment at 400°C , both crystal structures can coexist. The crystalline structure will depend on the cation distribution since the system will adopt a less energetic structure. More specifically, the distribution of Cu^{2+} will induce a distortion on the crystalline structure due to the Jahn Teller effect, favoring either the cubic or tetragonal structure [35]. Using Scherrer's equation, we estimated the average crystallite sizes of 8 ± 1 nm and 9 ± 1 nm for ZnFe_2O_4 and CuFe_2O_4 over all the diffraction peaks.

TEM micrographs of ZnFe_2O_4 and CuFe_2O_4 NPs corroborate the formation of nanoparticles with dimensions close to those obtained from their XRD patterns. The ZnFe_2O_4 NPs obtained in this work present a nearly spherical morphology (Fig. 2a), whereas the CuFe_2O_4 NPs show shapes close to a cuboid (Figs. 2b and 2c). Average sizes of 7 ± 2 nm for the ZnFe_2O_4 NPs and 10 ± 1.0 nm for the CuFe_2O_4 NPs were determined from their corresponding histograms by counting 100 NPs (insets in Figs. 2a and 2b). In this work, the apparent size obtained (crystallite size) is similar to the particle size calculated by transmission electron microscopy, which indicates the coincidence between crystallite and particle in the analyzed samples.

Raman scattering spectra of ZnFe_2O_4 and CuFe_2O_4 NPs (Fig. 3) confirm the structure and composition of the phases. The group theory predicts the following vibrational modes $\Gamma_{opt} = A_{1g} + E_g + F_{1g} + 3F_{2g} + 2A_{2u} + 2E_u + 4F_{1u} + 2F_{2u}$ for spinel-type systems with a cubic structure, where A_{1g} , E_g and $3F_{2g}$ are Raman active. The Raman spectrum of the cubic ZnFe_2O_4 NPs (Fig. 3a) shows three characteristic signals at 345 , 489 , and 657 cm^{-1} , with symmetries $2F_{2g} + A_{1g}$. The mode at 643 cm^{-1} is due to zinc-oxygen vibration at the tetrahedral sites, while the rest correspond to the vibration Fe-O at the octahedral sites [46]. The Raman frequency depends on the Fe (Zn)-O bond length, which changes with the lattice parameter variation and particle size [16, 47]. Conversely, the spectrum of CuFe_2O_4 NPs shows five signals. The peaks at 217 , 288 , 491 , and 673 cm^{-1} are assigned to the cubic inverse-spinel copper ferrite and correspond to $2F_{2g}$, E_g , and A_{1g} symmetries accordingly [48]. Additionally, a band around 399 cm^{-1} marked with an asterisk in Fig. 3b is observed. The appearance of different Raman peaks has been attributed to a breakdown of the momentum conservation rule since the wavelength of the exciting radiation (532 nm) is much larger than the particle diameter

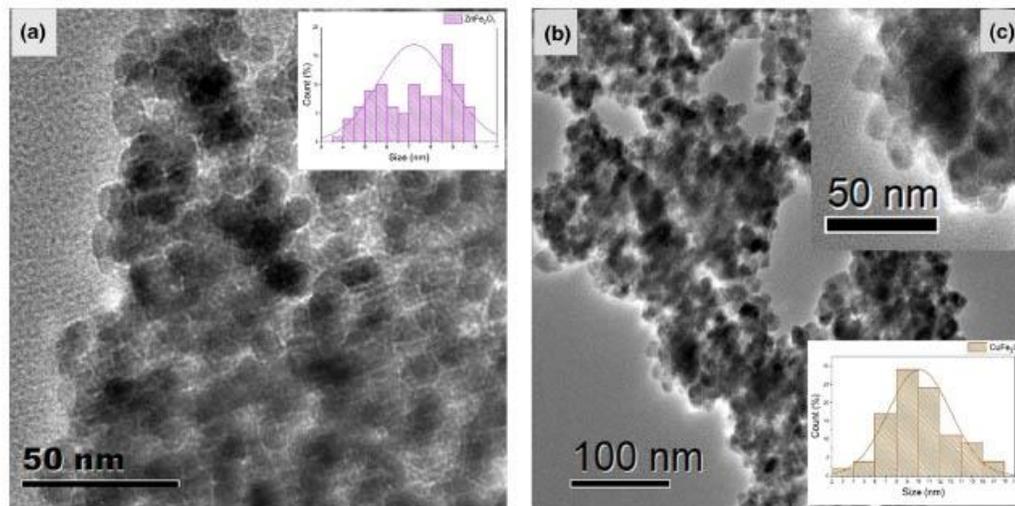


Fig. 2 Representative TEM micrographs of ZnFe₂O₄ NPs (a) and CuFe₂O₄ NPs (b and c). The corresponding histograms appear inserted

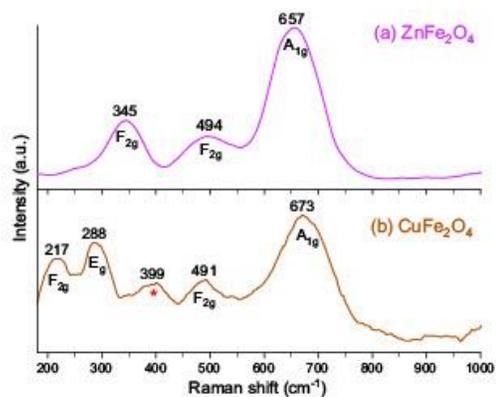


Fig. 3 Raman spectra of a ZnFe₂O₄ NPs and b CuFe₂O₄ NPs

(~ 10 nm). In the case of a perfect crystal with a size much larger than the wavelength, i.e., $k = 0$, it means that only the phonons near the center of the Brillouin zone are allowed in the Raman scattering due to the momentum conservation rule. However, the momentum conservation rule is violated for nanoparticles, and phonons for $k \neq 0$ become allowed in the Raman scattering. Therefore, for $k \neq 0$, the inversion center of the cubic centrosymmetric crystal is absent, which explains the appearance of extra Raman modes in the spectra [48, 49]. For this ferrite type, the lower frequency modes correspond to metal–oxygen vibration in the octahedral sites, while the higher frequency Raman modes above 600 cm^{-1} are assigned to metal–

oxygen vibration in the tetrahedral sites [48]. For both ferrites, the broadening of Raman peaks is due to the small size of the particles.

The EPR spectra for ZnFe₂O₄ and CuFe₂O₄ NPs (Fig. 4) show a strong, broad resonance band, with $g \sim 2.0$, characteristic of ferromagnetic (FM) oxide nanostructures [50]. For ZnFe₂O₄ NPs (Fig. 4a), two ions may contribute to the resonance signal, Fe³⁺ cations with five unpaired electrons in the d-orbitals and the oxygen vacancies, singly ionized [51]. For CuFe₂O₄ NPs (Fig. 4b), the EPR spectrum is associated with O²⁻ and Cu²⁺ vacancies [35]. Similarly, the EPR spectrum of CuFe₂O₄ NPs (Fig. 4b) could be associated with Fe³⁺ cations as well with O²⁻ and Cu²⁺ vacancies [35]. These vacancies are favored because the CuFe₂O₄ cubic and tetragonal phases coexist. The structural transition has been explained by forming an oxygen-deficient copper ferrite. The annealing treatment initiated the transformation, favoring the transition of Cu²⁺ from B (octahedral) to A (tetrahedral) sites, creating Cu-rich and Cu-poor regions and the loss of oxygen. These chemical inhomogeneities explain the copper and oxygen vacancies [52]. The transition temperature (T_t), from tetragonal to cubic structure, can vary according to the synthesis method.

The obtained results show that an uncomplicated methodology allows the synthesis of ZnFe₂O₄ and CuFe₂O₄ NPs with small average diameters. Therefore, as a possible alternative to disinfect and prevent bacterial spreading, these NPs were tested against two opportunistic pathogens: *S. epidermidis* and *P. aeruginosa*.

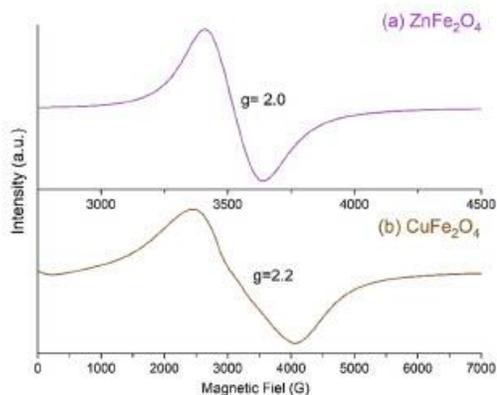


Fig. 4 EPR spectra of **a** ZnFe₂O₄NPs and **b** CuFe₂O₄NPs

Antimicrobial Assays

The minimum bactericidal concentration (MBC) of ZnFe₂O₄ and CuFe₂O₄ NPs against *S. epidermidis* and *P. aeruginosa* are presented in Table 1. The values correspond to the NPs concentration at which CFUs were not observed on the agar plate after 24 h of incubation.

The results show that both ferrites present a concentration-dependent antimicrobial effect against the two bacterial strains tested. The MBC determined for ZnFe₂O₄ is 4.7 mg/mL for *S. epidermidis* and 75 mg/mL for *P. aeruginosa*, while CuFe₂O₄ NPs have an MBC of 9.4 mg/mL and 18.8 mg/mL respectively. *S. epidermidis* is more susceptible to the action of both nanoparticles since there is no observable bacterial growth at lower concentrations compared to *P. aeruginosa*. This result was expected since

the Gram-negative bacterium is more resistant to antibacterial agents.

Agar Dispersion

For the agar dispersion test, 27 mg/mL of the nano ferrites were dispersed in the TSA medium. This concentration was the highest that can easily be dispersed in the medium to ensure a homogeneous distribution of the nanoparticles. Figure 5 (a) shows the respective agar plates with ZnFe₂O₄ NPs before inoculation, and Figs. 5 (b and c) show the agar plates with these nanoparticles after the inoculations and 24-h incubation with *P. aeruginosa* and *S. epidermidis*, respectively. Figure 6 shows the agar plates for CuFe₂O₄ NPs without bacteria (a) and 24-h after incubation with *P. aeruginosa* (b) and *S. epidermidis* are presented (c).

The ZnFe₂O₄ nanoparticles are orange, and this same color can be observed in Fig. 5(a) once the NPs are dispersed in the culture media before incubation. CuFe₂O₄ NPs initially have a dark brown color, and once they are dispersed in the media, the color stays the same, as shown in Fig. 6(a). This behavior could indicate that the nanoparticles do not dissolve in the media; therefore, the nanoparticles are responsible for the antimicrobial activity observed. Figure 5 (b) and Fig. 6 (b) show the media with some UFC on the plate after 24-h incubation, which indicates the bacteria *P. aeruginosa* can grow in the presence of these nanoparticles but not in the same quantity as the control plate. Figure 5 (c) and Fig. 6 (c) show the plates after 24-h incubation with *S. epidermidis*. Both cases show no UFC on the plates, indicating no bacterial growth at this concentration; the nanoparticles can fully inhibit bacterial growth.

Table 1 Minimum Bactericidal Concentration for ZnFe₂O₄ and CuFe₂O₄ NPs against *S. epidermidis* and *P. aeruginosa*

Nanoparticles	Minimum bactericidal concentration (MBC) (mg/mL)	
	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
ZnFe ₂ O ₄	4.7	75
CuFe ₂ O ₄	9.4	18.8

Fig. 5 Agar plates with ZnFe₂O₄ NPs (a), after 24-h incubation with *P. aeruginosa* (b), and after 24-h incubation with *S. epidermidis* (c)



Fig. 6 Agar plates with CuFe₂O₄ NPs (a), after 24-h incubation with *P. aeruginosa* (b), and after 24-h after incubation with *S. epidermidis* (c)



The percentage of bacterial growth inhibition by the ZnFe₂O₄ and CuFe₂O₄ NPs at 27 mg/mL is shown in Fig. 7. Both ferrite NPs inhibited 100% of *S. epidermidis* growth, which agrees with the MBC results because 99.9% of bacteria were killed at 4.7 and 9.4 mg/mL of ZnFe₂O₄ and CuFe₂O₄, respectively.

The *P. aeruginosa* growth was inhibited $67 \pm 1\%$ and $78 \pm 1\%$ by the ZnFe₂O₄ and CuFe₂O₄ NPs. These results are consistent with those of the MBC test. The dispersion test results corroborate that *S. epidermidis* is more susceptible to the antimicrobial action of the nanoparticles synthesized in this work; in the case of *P. aeruginosa*, the CuFe₂O₄ NPs have more significant antimicrobial activity. The differences between the obtained results could be attributed to the experimental methodology followed in each test. For the MBC test, the culture was a broth while it was an agar for the dispersion test. The contrast in the culture causes a different type of interaction between the nanoparticles and the bacteria. Therefore, the activity observed in each test will be determined by the mechanisms involved in the bacteria-killing.

All the antimicrobial assays showed better inhibition of the bacterial growth for Gram-positive *S. epidermidis* than for Gram-negative *P. aeruginosa*. This phenomenon could be attributed to Gram-negative bacteria containing a lipid-bilayer membrane with a lipopolysaccharide outer layer on their cell envelope, which may confer them higher protection to these NPs. Several mechanisms have been proposed for the antimicrobial activity of nanoparticles [45]. From the characterization of the ZnFe₂O₄ and CuFe₂O₄ NPs, we can suggest some mechanisms by which these nanoparticles can have antimicrobial activity. However, some general aspects that affect the activity must be considered: size, morphology, composition, and defects. Both nanoparticles synthesized here are similar in size, around 10 nm, and the antimicrobial activity observed is not the same. Therefore, we can conclude that the size does not directly influence the activity in the systems studied.

The composition and surface defects might play a relevant role in killing the bacteria, especially when we look at the interaction of the nanoparticles with the outer

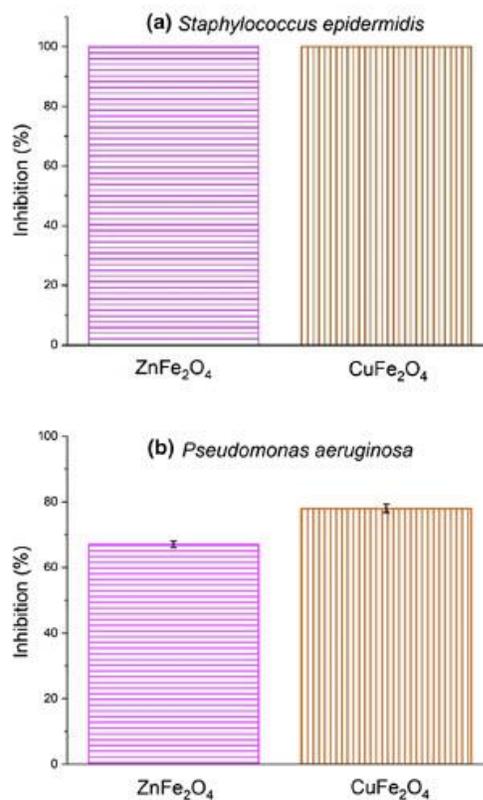


Fig. 7 Percentage of inhibition of a *S. epidermidis* and b *P. aeruginosa* by the ZnFe₂O₄ and CuFe₂O₄ NPs

membrane of the different bacteria. EPR characterization indicates oxygen vacancies for the ZnFe₂O₄ NPs, while CuFe₂O₄ NPs have oxygen and copper vacancies. The presence of vacancies can promote the mobilization of ions from the structure to the culture media to be internalized in the bacteria causing ion imbalance that can eventually result in bacteria death [53]. The NPs can present a charged

surface due to the vacancies in the crystal structure, which causes electrostatic interaction with the bacteria membrane, resulting in the disruption of said membrane and eventually bacterial death [54]. This mechanism could also explain the results for CuFe₂O₄ NPs in the different tests. The ions cannot move as freely in the TSA as in the TSB; without the ion imbalance, the integrity of the membrane is partially sustained, resulting in fewer bacteria being killed. Generally, a unique crystal phase is ideal for the properties displayed and the nanoparticles applications. However, in CuFe₂O₄, where we obtained cubic and tetragonal phases, both can promote antimicrobial activity against *P. aeruginosa*, but not for *S. epidermidis*.

Conclusion

Nanocrystals of ZnFe₂O₄ and CuFe₂O₄ were successfully obtained by an uncomplicated, non-expensive, and environmentally friendly synthesis method. The spectroscopic techniques used to characterize these NPs confirm the composition and structure of the crystal phases. Both NPs showed good antibacterial activity, especially against the Gram-positive *S. epidermidis*. The synthesis method employed in this work encourages the formation of different paramagnetic defects related to the antibacterial effect observed here. The results obtained in this work suggest that the ZnFe₂O₄ and CuFe₂O₄ NPs as antimicrobial agents can be embedded on different surfaces, preventing bacteria growth.

Acknowledgements América Vázquez-Olmos gratefully acknowledges the support for this research to the UNAM-PAPIIT IN108616 grant. Argelia Almaguer-Flores acknowledges the support of the UNAM-PAPIIT # IT200319 grant. Blanca Paz-Díaz gratefully thanks CONACyT for the doctoral scholarship.

Declarations

Conflict of interest The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

- K. K. Kefeni and B. B. Mamba (2020). *Sustain Mater Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.susmat.2019.e00140>.
- M. L. Baynosa, A. H. Mady, V. Q. Nguyen, D. R. Kumar, M. S. Sayed, D. Tuma, and J. J. Shim (2020). *J Colloid Interface Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.11.018>.
- Y. Fu and X. Wang (2011). *Ind Eng Chem Res.* <https://doi.org/10.1021/ie200162a>.
- Y. Zhang, Q. Shi, J. Schliesser, B. F. Woodfield, and Z. Nan (2014). *Inorg Chem.* <https://doi.org/10.1021/ic501487c>.
- J. Haetge, C. Suchomski, and T. Brezesinski (2010). *Inorg Chem.* <https://doi.org/10.1021/ic102052r>.
- C. Yao, Q. Zeng, G. F. Goya, T. Torres, J. Liu, and H. J. Wu (2007). *Phys Chem C.* <https://doi.org/10.1021/jp0732763>.
- M. R. Anantharaman, S. Jagatheesan, K. A. Malini, S. Sindhu, A. Narayanasamy, C. N. Chinnasamy, J. P. Jacobs, S. Reijne, K. Seshan, R. H. H. Smits, H. H. Brongersma, J. Magn. Magn. (1998) [https://doi.org/10.1016/S0304-8853\(98\)00171-1](https://doi.org/10.1016/S0304-8853(98)00171-1).
- M. Gharibshahian, O. Mirzaee, and M. S. Nourbakhsh (2017). *J Magn Magn Mater.* <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2016.10.116>.
- F. Liu, X. Li, Q. Zhao, Y. Hou, X. Quan, and G. Chen (2009). *Acta Mater.* <https://doi.org/10.1016/j.actamat.2009.02.022>.
- Z. H. Yuan and L. D. Zhang (1998). *Mater Res Bull.* <https://doi.org/10.1016/j.actamat.2009.02.022>.
- C. Nordhei, K. Mathisen, I. Bezverkhy, and D. Nicholson (2008). *J Phys Chem C.* <https://doi.org/10.1021/jp7112158>.
- M. Sivakumar, T. Takami, H. Ikuta, A. Towata, K. Yasui, T. Tuziuti, T. Kozuka, D. Bhattacharya, and Y. Iida (2006). *J Phys Chem B.* <https://doi.org/10.1021/jp055024c>.
- S. H. Yu, T. Fujino, and M. Yoshimura (2003). *J Magn Magn Mater.* [https://doi.org/10.1016/S0304-8853\(02\)00977-0](https://doi.org/10.1016/S0304-8853(02)00977-0).
- N. Wakiya, K. Muraoka, T. Kadowaki, T. Kiguchi, N. Mizutani, H. Suzuki, and K. Shinozaki (2007). *J Magn Magn Mater.* <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2006.11.145>.
- R. Zhang, J. Huang, J. Zhao, Z. Sun, and Y. Wang (2007). *Energy Fuels.* <https://doi.org/10.1021/ef070064w>.
- A. R. Vázquez-Olmos, M. Abatal, R. Sato-Berru, G. K. Pedraza-Basulto, V. Garcia-Vázquez, A. Sainz-Vidal, R. Perez-Bañuelos, and A. Quiroz (2016). *J Nanomater.* <https://doi.org/10.1155/2016/9182024>.
- M. Balasubramanian and K. R. Murali (2020). *Ferroelectrics.* <https://doi.org/10.1080/00150193.2019.1691381>.
- E. Manova, T. Tsoncheva, D. Paneva, M. Popova, N. Velinov, B. Kunev, K. Tenchev, and I. Mitov (2011). *J Solid State Chem.* <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2011.03.035>.
- N. Masunga, O.K. Mmesele, K.K., Kefeni, B.B. Mamba, J. of Environ. Chem. Eng. (2019) <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103179>
- A.T. Dhiwahar, M. Sundararajan, P. Sakthivel, C.S. Dash, S. Yuvaraj, J. of Physics and Chemistry of Solids (2020) <https://doi.org/10.1016/j.jpcs.2019.109257>
- V. N. Nikolic, M. Vasić, and M. M. Milić (2018). *Ceramics Int.* <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2018.08.157>.
- A. Subha, M.G. Shalini, B. Sahu, S.C. Sahoo, J. of Materials Science: Materials in electronics (2018) <https://doi.org/10.1007/s10854-018-0221-8>
- Z. Ye, Z. Deng, L. Zhang, J. Chen, G. Wang, and Z. Wu (2020). *Mater Res Express.* <https://doi.org/10.1088/2053-1591/ab778b>.
- V. A. Zhuravlev, R. V. Minin, V. I. Itin, and I. Y. Lilenko (2017). *J of Alloys and Compounds.* <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2016.09.069>.
- W. Lv, B. Liu, Z. Luo, X. Ren, and P. Zhang (2008). *J of Alloys and Compounds.* <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2007.10.049>.
- K. Muthukumar, D. S. Lakshmi, S. D. Acharya, S. Natarajan, A. Mukherjee, and H. C. Bajaj (2018). *Mater Chem and Phys.* <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2018.02.004>.
- P. Chand (2008). *Hyperfine Interact.* <https://doi.org/10.1007/s10751-008-9789-3>.
- M.A. Ansari, A. Baykal, S. Asini, S. Rehman, J. of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials (2018) <https://doi.org/10.1007/s10904-018-0889-5>
- S. J. Stewart, M. J. Tueros, G. Cernicchiaro, and R. B. Scorzelli (2004). *Solid State Communications.* <https://doi.org/10.1016/j.ssc.2003.11.010>.
- M. M. Rashad, S. Soltan, A. A. Ramadan, M. F. Bekheet, and D. A. Rayan (2015). *Ceramics Int.* <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.06.046>.

31. T. F. Marinca, I. Chicinas, and O. Isnard (2013). *Ceramics Int.* <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2012.10.274>.
32. G. F. Goya and H. R. Rechenberg (1998). *J of Appl Phys.* <https://doi.org/10.1063/1.368109>.
33. K. K. Kefeni, T. A. M. Msagati, T. T. Nkambule, and B. B. Mamba (2020). *Mater Sci Eng C.* <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110314>.
34. M. M. Rashad, R. M. Mohamed, M. A. Ibrahim, L. F. M. Ismail, and E. A. Abdel-Aal (2012). *Adv Powder Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.apt.2011.04.005>.
35. V. N. Nikolić, M. M. Vasić, and D. Kisić (2019). *J of Solid State Chem.* <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2019.04.007>.
36. I. Khan, K. Saeed, and I. Khan (2019). *Arab J Chem.* <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>.
37. K. Kaviyarasu, C.M. Magdalane, D. Jayakumar, Y. Samson, A.K.H. Bashir, M. Maaza, D. Letsholathebe, A. Hossam Mahmoud, J. Kennedy, *Journal of King Saud University – Science* (2020) <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.12.006>.
38. G. Kaupp (2009). *Cryst Eng Comm.* <https://doi.org/10.1039/B810822F>.
39. J. L. Do, T. Frišćić, and A. C. S. Cent (2017). *Sci.* <https://doi.org/10.1021/acscentsci.6b00277>.
40. A.R. Vázquez-Olmos, M.E. Sánchez-Vergara, A.L. Fernández-Osorio, A. Hernández-García, R.Y. Sato-Berrú, J.R. Alvarez-Bada, *J. Clust. Sci.* (2018)
41. K. Becker, C. Heilmann, and G. Peters (2014). *Clin Microbiol Rev.* <https://doi.org/10.1128/CMR.00109-13>.
42. D. Chessa, G. Ganau, and M. Mazzarello (2015). *J Infect Dev Ctries.* <https://doi.org/10.3855/jidc.6923>.
43. M. Moradali, S. Ghods, and B. H. A. Rehm (2017). *Front Cell Infect Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00039>.
44. L. B. Zakiyah, E. Saion, N. M. Al-Hada, E. Gharibshahi, A. Salem, N. Soltani, and S. Gene (2015). *Mater Sci Semicond Process.* <https://doi.org/10.1016/j.mssp.2015.07.027>.
45. L. Wang, C. Hu, and L. Shao (2017). *Int J Nanomedicine.* <https://doi.org/10.2147/IJN.S121956>.
46. J. P. Singh, R. C. Srivastava, H. M. Agrawat, and R. Kumar (2010). *J of Raman Spectrosc.* <https://doi.org/10.1002/jrs.2902>.
47. Z. Wanga, D. Schiferla, Y. Zhao, H.St.C. O'Neill, *J. Phys. Chem. Solids.* (2003) <https://doi.org/10.1016/j.jpcs.2003.08.005>
48. M. Bibhas, K. Mousumi, M. Siba, S. Rajat, R. Ujjal Kanti, R. Anirban, D. Dipankar, *ACS Omega* (2019) <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b01477>.
49. K. K. Chattopadhyay, B. K. Chatterjee, K. Bhattacharyya, A. Dey, and C. K. Ghosh (2014). *Dalton Trans.* <https://doi.org/10.1039/C4DT00093E>.
50. N. Pathak, S. K. Gupta, K. Sanyal, M. Kumar, R. M. Kadam, and V. Natarajan (2014). *Dalton Trans.* <https://doi.org/10.1039/C4DT00741G>.
51. M. I. Nemfulwi, H. C. Swart, W. B. Mdlalose, and G. H. Mhlongo (2020). *Appl Surf Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2019.144863>.
52. X. Tang, A. Manthiram, and J. B. Goodenough (1989). *J of Solid State Chem.* [https://doi.org/10.1016/0022-4596\(89\)90272-7](https://doi.org/10.1016/0022-4596(89)90272-7).
53. F. Gunkel, D. V. Christensen, Y. Z. Chen, and N. Pryds (2020). *Appl Phys Lett.* <https://doi.org/10.1063/1.5143309>.
54. M.A. Ansari, A. Baykal, S. Asiri, S. Rehman, *J. of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials* (2018) <https://doi.org/10.1007/s10904-018-0889-5>.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.