



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
INGENIERÍA AMBIENTAL – AGUA

**DESINFECCIÓN DE PATÓGENOS EN AGUA EMPLEANDO DIFERENTES
NANOPARTÍCULAS EN PRESENCIA DE LUZ VISIBLE.**

**TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN INGENIERÍA**

**PRESENTA:
DIAZ PUERTO ZARICK JULIANA**

**TUTOR PRINCIPAL:
DR. THANGARASU PANDIYAN, FACULTAD DE QUÍMICA**

**COMITÉ TUTORAL:
DRA. GEORGINA FERNÁNDEZ VILLAGÓMEZ, FACULTAD DE INGENIERÍA
DR. JESÚS ÁNGEL ARENAS ALATORRE, INSTITUTO DE FÍSICA**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx, Agosto 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO:

Presidente:	Dra. Georgina Fernández Villagómez
Secretario:	M.C. Rolando S. García Gómez
Vocal 1:	Dr. Jesús Arenas
Vocal 2:	M.I. Mercedes Esperanza Ramírez Camperos
Vocal 3:	Dr. Pandiyan Thangarasu

Lugar o lugares donde se realizó la tesis: LABORATORIO F-114, FACULTAD DE QUIMICA, UNAM

TUTOR DE TESIS:

DR. PANDIYAN THANGARASU

FIRMA

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia, Mamá, Tía y Abue, por siempre estar ahí, apoyarme en cada decisión por más temerosa que pareciera, por hacerme sentir como en casa a pesar de la distancia.

A ti Mamá por brindarme las herramientas personales, cognitivas, profesionales, emocionales, y tantas cosas más, que en conjunto me han traído a culminar esta etapa personal y académica.

Al Doctor Pandiyan por su orientación, experiencia y apoyo en la investigación.

Al Dr. Carlos Huertas por su apoyo, paciencia, constancia, y orientación en la investigación.

Al Dr. Juan Manuel Asensio, por ser el profe, amigo y apoyo, por guiarme en el mundo de la escritura académica, y por trascender en la ciencia.

Al Dr. Bruno Chaudret y al Laboratoire de Physique et Chimie des Nano-objets (LPCNO) por formarme para la investigación desde otra perspectiva.

A mis amigos, Citlalli por ser más que una amiga, y apoyarme cuando más lo necesité. Diana por ser esa hermana de otra madre. Dani por ser mi compañero de duelos. Eric, por hacerme creer que la ciencia todo lo vale y Javi por ser la constante de mi vida.

Por supuesto a la UNAM, por abrirme las puertas como una nacional más, por formarme con los mejores, por permitirme explorar y aprender en la mejor casa de estudios de Latinoamérica

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme la beca para realizar esta maestría y la estancia de investigación.

Al comité tutorial, la Dra. Georgina Fernández, el Dr. Jesús Arenas y el Dr. Pandiyan, por contribuir constantemente a la mejora del presente trabajo de investigación a partir de sus comentarios, reflexiones y puntos de mejora.

A la Dirección General Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por el apoyo con análisis de muestras, materiales y reactivos para el desarrollo de esta investigación, bajo el proyecto No. 222419.

« Faites que le rêve dévore votre vie afin que la vie ne dévore pas votre rêve »

- Antoine de Saint-Exupéry

Cuando el límite son las estrellas, las fronteras sólo son un paso.

INDICE

SIGLAS Y ABREVIACIONES	X
RESUMEN	XI
ABSTRACT	XII
1 Capítulo: Introducción	1
2 Capítulo: Marco teórico	6
2.1 Contaminación del agua	6
2.2 Contaminación del agua con organismos patógenos	7
2.2.1 Bacterias patógenas	8
2.2.2 Bacterias patógenas de interés	12
2.3 Tratamientos convencionales para remoción de microorganismos patógenos en el agua. 13	
2.4 Tratamientos biológicos aerobios y anaerobios	16
2.5 Tratamientos de desinfección de agua para uso y consumo humano.	18
2.6 Tratamientos de agua no convencionales por medio de nanotecnología.	20
2.7 Limitaciones de nanomateriales y procesos basados en nanopartículas en aplicaciones en agua.	22
2.8 Definición de nanomateriales (NMs) y nanopartículas (NPs)	22
2.8.1 Estructura cristalográfica de nanomateriales (NMs) cristalinos.	24
2.9 Fotocatálisis y óxidos metálicos	27
2.9.1 Fotocatálisis heterogénea.....	27
2.10 Selección de ferritas como fotocatalizadores	31
2.10.1 Ferritas de Zinc	32
2.10.2 Ferritas de hierro o magnetitas	33
2.10.3 Actividad antibacteriana en óxidos metálicos	35
2.11 Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) y mecanismo de acción antibacteriana por acción de óxidos metálicos.	37
2.11.1 Nanopartículas de plata	40
3 Capítulo: Justificación	42
3.1 Objetivo general	43
3.2 Objetivos específicos	43
3.3 Hipótesis	43
3.4 Alcances	43
4 Capítulo: Metodología	45
4.1 Metodología Experimental.....	46

4.1.1	Preparación de nanopartículas	46
4.1.2	Dopaje de nanopartículas con Ag	49
4.2	Caracterización de nanomateriales (NMs).....	50
4.2.1	XRD – Difracción de rayos X	50
4.2.2	Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)	50
4.2.3	Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución (HRTEM)	51
4.2.4	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	51
4.2.5	Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)	51
4.2.6	Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS).....	51
4.2.7	Magnetometría de muestra vibrante (VSM).....	52
4.2.8	Espectrofotometría UV-Vis	52
4.2.9	Plasma de acoplamiento inductivo (ICP)	52
4.3	Estudios antibacteriales.....	53
4.3.1	Determinación de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC).....	53
4.3.2	Efecto en las células bacterianas debido a la exposición a los nanomateriales de ZnFe ₂ O ₄ , ZnFe ₂ O ₄ -Ag, Fe ₃ O ₄ and Fe ₃ O ₄ -Ag.	54
5	Capítulo: Resultados y discusión.....	56
5.1	Síntesis de nanopartículas	56
5.2	Caracterización de nanomateriales sintetizados.....	56
5.2.1	Difracción de rayos X (XRD).....	56
5.2.2	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	61
5.2.3	Microscopia electrónica de transmisión (TEM)	64
5.2.4	Microscopia electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM)	67
5.2.5	Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR).....	68
5.2.6	UV-Vis.....	69
5.2.7	Fotoespectroscopia de rayos X (XPS)	72
5.2.8	Magnetometría de Muestra Vibrante (VSM).....	74
5.3	Efecto de nanomateriales en microorganismos de interés.	76
5.3.1	Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)	77
5.4	Microscopia confocal.....	82
6	Capítulo: Conclusiones y perspectivas	83
6.1	Conclusiones	83
6.2	Perspectivas.....	84
7	Referencias	86
8	ANEXOS.....	98

8.1	Datos de referencia de difracción de rayos X.....	98
8.2	MANUAL DE SIEMBRA BACTERIANA.....	100
8.3	Tinción de Gram	101
8.4	PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO.....	102
8.5	OBTENCIÓN Y MANTENIMIENTO DE CULTIVOS PUROS	103

INDICE DE TABLAS

Tabla 2-1. Límites máximos permisibles de contaminantes en aguas residuales tratadas para su reúso en servicios al público ¹³	7
Tabla 2-2. Agentes patógenos de interés en el presente estudio, transmitidos por agua y su importancia en los sistemas de tratamiento ¹⁴	8
Tabla 2-3. Características de bacterias Gram positivas y Gram negativas. ¹⁹	10
Tabla 2-4. Tratamientos convencionales para la reducción de microorganismos patógenos en agua ¹⁴	14
Tabla 2-5. Nanomateriales y NPs de óxidos metálicos empleados en tratamiento de agua contaminada ³⁴	21
Tabla 3-1. Cepas Bacterianas aisladas y medios de cultivo específicos.	44
Tabla 4-1. Volúmenes empleados para diferentes porcentajes de dopaje con plata al nanomaterial de ferritas de zinc ($ZnFe_2O_4$).	49
Tabla 4-2. Composición iónica de nanomateriales sintetizados y porcentaje de dopaje	50
Tabla 4-3. Masas en relación a volumen de suspensión de nanomaterial a implementar	54
Tabla 4-4. Concentraciones de dilución de nanomateriales empleadas en microscopía confocal	55
Tabla 5-1. Porcentaje de metales presente en nanomateriales sintetizados y no dopados	56
Tabla 5-2. Picos de difracción en 2θ (grados) para materiales de ferrita de zinc dopados.	58
Tabla 5-3. Tamaño de grano promedio para picos identificados en XRD, ferritas de zinc con y sin dopaje.	59
Tabla 5-4. Picos de difracción en 2θ (grados) para magnetita con y sin dopaje.....	60
Tabla 5-5. Tamaño de cristal promedio para picos identificados en XRD, magnetitas.	61
Tabla 5-6. Bandgap de ferritas de zinc y magnetitas determinados a partir de datos experimentales.	71
Tabla 5-7. Bandgap de ferritas de zinc y magnetitas de valores reportados.	71

Tabla 5-8. Composición elemental superficial de nanomateriales sintetizados determinada por XPS.....	74
Tabla 5-9. MIC Ferritas de Zinc.....	78
Tabla 5-10. MIC Ferritas de Zinc dopadas con Plata	78
Tabla 5-11. MIC Magnetitas.....	79
Tabla 5-12. MIC Magnetitas dopadas con plata.....	79
Tabla 5-13. Concentración mínima inhibitoria de nanomaterial [μM] a cada cepa bacteriana.	80

INDICE DE FIGURAS

Figura 1-1. Esquema representativo de acción de nanomateriales sintetizados en bacterias Gram positivas y Gram negativas. Elaboración propia.....	5
Figura 2-1. Principales morfologías bacterianas 18.....	9
Figura 2-2. Representación visual de composición externa bacterias Gram positivas y Gram negativas. 19.....	10
Figura 2-3. Peptidoglicano de Staphylococcus aureus, bacteria Gram positiva 20	11
Figura 2-4. Peptidoglicano de Escherichia coli, Bacteria Gram negativa 20	11
Figura 2-5. Staphylococcus aureus 23	12
Figura 2-6. Bacillus cereus 24	12
Figura 2-7. Escherichia coli 26	13
Figura 2-8. Salmonella typhi ²⁷	13
Figura 2-9. Esquema de funcionamiento de lodos activados por aireación. Elaboración propia.....	17
Figura 2-10. Dibujo esquemático de un reactor anaerobio de flujo ascendente 30	18
Figura 2-11. Ocupación en el espacio de materiales y nanopartículas. Elaboración propia.....	24
Figura 2-12. Incremento de área superficial en nanopartículas en relación a material bulk. Elaboración propia.....	24
Figura 2-13. Representación gráfica de celda unitaria y estructuras cristalinas basada en celdas unitarias. Elaboración propia.....	25
Figura 2-14. Representación gráfica de estructuras cristalinas cúbicas 48.....	25
Figura 2-16. Fracción de espacio ocupado por disposición de átomos en estructuras cristalinas cúbicas 48.....	26
Figura 2-16. Familia de planos (111) para una estructura fcc. Elaboración propia.....	26
Figura 2-17. Intersticios tetraédricos en estructura fcc	27
Figura 2-18. Intersticios octaédricos en estructura fcc	27
Figura 2-19. Esquema de proceso de fotocátalisis heterogénea. Elaboración propia ..	28

Figura 2-20. Esquema representativo de band gap en materiales conductores, semiconductores y aislantes 50.	29
Figura 2-21. Band gap, banda de valencia (VB) y banda de conducción (CB) para diferentes semiconductores, y potenciales redox 52.	29
Figura 2-22. Esquema teórico de fotocatalisis heterogénea con materiales semiconductores en degradación de contaminantes orgánicos 55.	30
Figura 2-23. Esquema teórico de estructura de una espinela normal de ferritas ⁵⁸	32
Figura 2-24. Esquema teórico de estructura de una espinela inversa de magnetitas ⁶⁵ 34	
Figura 2-25. Octaedros de ferritas de zinc visualizados mediante Microscopía Electrónica de Transmisión. Magnificación 30,000X. Imagen propia	35
Figura 2-26. Representación gráfica de acción de ROS al interior de la célula. Elaboración propia.....	37
Figura 2-27. Esquema de generación de radicales •OH por acción de ZnFe ₂ O ₄ bajo luz visible a partir de reacción Fenton. Elaboración propia.....	39
Figura 2-28. Esquema de mecanismo de acción antibacterial de las NPs de plata en bacterias 92.....	41
Figura 4-1. Diagrama de metodología experimental empleada en la presente investigación.....	46
Figura 4-2. Diagrama de metodología experimental preparación nanopartículas ferritas de zinc.....	47
Figura 4-3. Diagrama de metodología experimental preparación nanopartículas ferritas de zinc.....	48
Figura 4-4. Metodología Concentración mínima inhibitoria.....	53
Figura 4-5. Ejemplo esquemático de Metodología para determinación de Concentración Mínima Inhibitoria	54
Figura 5-1. Patrón XRD de ferritas de zinc (ZnFe ₂ O ₄ y ZnFe ₂ O ₄ -Ag).	57
Figura 5-2. a) Posición enlace octaédrico Zn ²⁺ -(Zn-O), 32 puntos de enlace b) Posición enlace tetraédrico Fe-O y Zn ²⁺ , 64 puntos de enlace c) Estructura centrada en las caras	59
Figura 5-3. Patrón XRD de magnetitas (Fe ₃ O ₄ y Fe ₃ O ₄ -Ag).	60

Figura 5-4. SEM ferritas de zinc a diferentes porcentajes de dopaje con plata y magnificaciones. Tomadas a 5.0 kV. a) 1% 80,000X. b) 1,5% 50,000X. c) 2% 50,000X y d) 2,5% 30,000X.....	62
Figura 5-5. SEM con electrones retrodispersados. Ferritas de zinc a diferentes porcentajes de dopaje con plata y magnificaciones. Tomadas a 15.0 kV. a) 1% 15,000X, b) 1,5% 45,000X, c) 2% 60,000X y d) 2,5% 11,000X.....	63
Figura 5-6. SEM con electrones secundarios. Magnetitas (Fe_3O_4) en diferentes magnificaciones a 5.0 kV. a) Morfología general sin dopaje 8,000X, b) Morfología cuboctaédrica dopada con plata al 2% (w/w) 20,000X, c) Morfología cuboctaédrica sin dopaje 20,000X, d) distribución morfológica general de NPs 10,000X.....	64
Figura 5-7. Imágenes TEM. a) NPS de Ferritas de zinc dopadas con Ag b) Interface NPs Ag - ZnFe_2O_4 c) NPs de Ferritas de zinc d) NPs de plata.....	65
Figura 5-8. Cristalografía ferritas de zinc a diferentes posiciones de pico 2. a) 30,10 b) 35,46 c) 37,09 d) 89,70.....	66
Figura 5-9. TEM Magnetita (Fe_3O_4). a) cuboctaedros con caras en 1 0 0 y 1 1 1. b) Aglomerado de nanopartículas.....	67
Figura 5-10. HRTEM a) NPs ZnFe_2O_4 , b) NPs de Ag, c) Índices de Miller ZnFe_2O_4 , d) Interfaz Ag- ZnFe_2O_4 con índices de Miller.....	67
Figura 5-11. Patrón FTIR ferritas de zinc a diferentes porcentajes de dopaje.....	68
Figura 5-12. Gráfico de Tauc, magnetita. Bandgap 2,08 eV.....	70
Figura 5-13. Gráfico de Tauc, ferritas de Zinc. Bandgap 1,95 eV.....	70
Figura 5-14. Esquema teórico de generación de ROS en nanomateriales, identificando su respectivo bandgap. Figura propia.....	72
Figura 5-15. Patrón XPS Completo nanomateriales sintetizados y dopados.....	73
Figura 5-16. Zoom XPS Nanomateriales sintetizados y dopados.....	73
Figura 5-17. VSM Ferritas de Zinc a temperatura ambiente, dopadas con plata al 2% (w/w) y sin dopaje.....	75
Figura 5-18. VSM Magnetitas a temperatura ambiente, dopadas con plata al 2% (w/w) y sin dopaje.....	75
Figura 5-19. Esquema representativo de acción antibacteriana de nanomateriales sobre bacterias Gram + y Gram -. Elaboración propia.....	76
Figura 5-20. Pared celular de Bacteria Gram negativa. Elaboración propia.....	77

Figura 5-21. Pared celular de bacteria Gram positiva. Elaboración propia	77
Figura 5-22. Resultados MIC en bacterias de interés por nanomateriales sintetizados.	80
Figura 5-23. Microscopía confocal obtenida a una longitud de onda de 405 nm, con escala a 1µm en cada imagen. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para diferentes nanomateriales. a) NPs Ferrita de Zinc b) Célula de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> con Magnetita c) NPs Ferritas de Zinc dentro de estructura celular <i>Saccharomyces cerevisiae</i> d) NPs de Magnetita dentro de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	82
Figura 7-1. Demostración gráfica del manejo y toma de inóculo ¹³⁶	100
Figura 7-2. Demostración gráfica preparación de frotis bacteriano para tinción ¹³⁶ ..	101
Figura 7-3. Demostración gráfica de metodología para tinción simple ¹³⁶	102
Figura 7-4. Demostración gráfica de metodología para tinción simple. Figura propia	102
Figura 7-5. Demostración gráfica de metodología para tinción simple ¹³⁶	103

ECUACIONES

Ecuación 2-1	38
Ecuación 2-2	38
Ecuación 2-3	38
Ecuación 2-4	40
Ecuación 2-5	40
Ecuación 2-6	40
Ecuación 2-7	40
Ecuación 2-8	40
Ecuación 4-1. Scherrer- Debye.....	57
Ecuación 5-2. Ecuación de Einstein - Planck.....	69
Ecuación 5-3. Función de Kubelka-Munk.....	69

SIGLAS Y ABREVIACIONES

ROS	Especies reactivas de oxígeno
Fcc	Red Cúbica Centrada en las Caras
NMs	Nanomateriales
NPs	Nanopartículas
ca.	Aproximadamente
QDs	Quantum dots
Band gap	Ancho de banda prohibida
RAFA	Reactores anaerobios de flujo ascendente
UV	Ultravioleta
Vis	Visible
XRD	Difracción de Rayos X
TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
HRTEM	Microscopía Electrónica de Transmisión de alta Resolución.
VSM	Magnetometría de muestra vibrante
FT-IR	Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier
XPS	Espectroscopía electrónica de rayos X
ICP	Plasma de acoplamiento inductivo
MIC	Concentración mínima inhibitoria

RESUMEN

La contaminación del agua por la presencia de microorganismos patógenos ha sido una problemática global, ya que causan enfermedades gastrointestinales en los humanos. Aunque estos microorganismos pueden eliminarse del agua mediante diferentes procesos de tratamiento biológico y desinfección, la resistencia de las bacterias se ha incrementado con el paso del tiempo y los métodos de tratamiento no pueden desinfectar algunos microorganismos. Como resultado, el consumo de agua se convierte en un problema debido a la presencia de bacterias patógenas. Por lo tanto, el desarrollo de nuevas técnicas es esencial, ya que es posible prevenir las infecciones bacterianas a través de la inhibición del crecimiento celular de estas bacterias.

Entre varios microorganismos patógenos que se presentan en los sistemas de agua, las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhi* y *Escherichia coli* son comunes y causan problemas de salud, como enfermedades diarreicas agudas. Recientemente, la inhibición bacteriana por nano-materiales ha sido un tema de estudio de gran atención, ya que el tamaño de las partículas juega un papel crucial en la interacción con los sistemas bacterianos. Además, cuando el tamaño de las partículas es inferior a 100 nm, las partículas exhiben propiedades foto-físicas y químicas únicas debido a su confinamiento cuántico. Se ha reportado que los elementos metálicos zinc y plata presentan propiedades antibacterianas, por lo que la síntesis de nanomateriales basados en estos elementos es de importancia. Por lo tanto, se prepararon NPs de $ZnFe_2O_4$ y $ZnFe_2O_4$ -Ag y se estudiaron sus propiedades antibacterianas después de la caracterización completa mediante diferentes técnicas analíticas (XRD, SEM, TEM, HRTEM y XPS). En los sistemas propuestos, se sintetizaron NPs de Fe_3O_4 , consideradas para la separación rápida de la solución por sus propiedades magnéticas y su reutilización posterior al tratamiento. Los resultados muestran que el tamaño de los materiales es inferior a 100 nm con una morfología adecuada que facilita la interacción con las células bacterianas. Esto significa que la adsorción de materiales en la membrana celular que se inserta en la pared celular inhibiría el crecimiento celular. Además, bajo luz UV, el nanomaterial puede producir especies radicales. Tales como especies reactivas de oxígeno (ROS) y otras especies oxidativas que escinden los sistemas de ADN que interactúan con otros componentes celulares. Esto es consistente con los resultados obtenidos, donde los NMs de $ZnFe_2O_4$ y $ZnFe_2O_4$ -Ag muestran mejores propiedades de inhibición de crecimiento celular en los sistemas bacterianos que los NMs de Fe_3O_4 o Fe_3O_4 -Ag. En esta investigación, se estudió la actividad antibacteriana de las nanopartículas a diferentes concentraciones, para las bacterias Gram positivas y las Gram negativas. Con los resultados obtenidos, los nanomateriales actuales serían eficaces para tratar las cepas bacterianas debido a sus propiedades antibacterianas y pueden considerarse para la desinfección de la contaminación del agua. Además, los NMs se pueden separar fácilmente del agua mediante imanes externos, ya que muestran un buen comportamiento magnético.

ABSTRACT

The water contamination by the presence of pathogenic microorganisms has been a global problem, due to gastrointestinal diseases that cause in humans. Although these microorganisms can be eliminated from the water through different biological treatment and disinfection processes, the bacterial resistances are being increased over the time, and the treatment methods are unable to disinfect microorganisms. As a result, the drinking of water becomes an issue due to pathogenic bacteria. Therefore, the development of new techniques is essential as it is able to disinfect the bacterial infections through the cell growth inhibition of these bacteria.

Among several pathogenic microorganisms that are present in water systems, the bacteria *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhi* and *Escherichia coli* are common causing many health issues, such as acute diarrheal diseases. Recently, the bacterial inhibition by nano-materials has been a great attention as size of the particles plays a crucial role in the interaction with bacterial systems. Furthermore, if the size of particles is less than 100 nm, the particles exhibit unique photo-physical and chemical properties due to their quantum confinement. In particular, Zn, Ag metals have been reported to possess antibacterial properties, thus the fabrication of nano-materials based on these metals are important. Thus ZnFe₂O₄ and ZnFe₂O₄-Ag NPs were prepared and studied their antibacterial properties after complete characterization by different analytical techniques (XRD, SEM, TEM, HRTEM, and XPS). In the systems, Fe₃O₄ NPs are considered for the quick separation from the solution by its magnetic properties and reuse it further treatment. The results show that the size of the materials are less than 100 nm having adequate morphology that facilitate for the interaction with bacterial cells. This means that the adsorption of materials on cell membrane inserting into cell wall would inhibit cell growth. Besides, under UV light, the nano-material can produce radical species such as reactive oxygen species (ROS) and other oxidative species that cleavage DNA systems interacting with other cell components. This is consistent with our results that ZnFe₂O₄ and ZnFe₂O₄-Ag exhibit strongly antibacterial behavior in the bacterial systems than that by Fe₃O₄ or Fe₂O₄. In the study, antibacterial activities of nano-particles at different concentrations were studied for both Gram positive and Gram negative bacteria. Therefore, the present nano-materials would be efficient to treat the bacterial strains because of their anti-bacterial properties and can be considered for the disinfection of water contamination. Moreover, the above material can be easily separated from the water by magnetic bar as they show good magnetic behavior.

1 Capítulo: Introducción

La contaminación del recurso hídrico, ha sido una problemática de gran interés para los sectores de salud y gobierno en todo el mundo, los cuales buscan mejorar la calidad del agua para la población. A lo largo de la historia se han realizado diferentes estudios físicos, químicos y biológicos que permiten identificar los contaminantes del agua y sus componentes, así como su relación e interacción con el medio ambiente y con el ser humano; traduciendo dichos estudios en identificación y clasificación de compuestos del agua, según su naturaleza. Así, los contaminantes de origen biológico se asocian a la presencia de microorganismos tales como: bacterias, protozoos, virus, helmintos, entre otros. Identificando dentro del grupo de bacterias aquellas que son patógenas y que representan un peligro a la salud por causar enfermedades infecciosas al ser humano, tales como la fiebre tifoidea e infección entérica, llamadas bacterias patógenas; donde en algunos casos su presencia en agua es asociada a contaminación fecal, denominado a estos microorganismos: coliformes fecales, como es el caso de la bacteria *Escherichia coli*. La ingestión por parte del ser humano de algunas bacterias tales como *E. coli* puede generar síntomas perjudiciales a la salud como enfermedad diarreica aguda (EDA), dolor estomacal y en algunos casos fiebres. Aunque la diarrea afecta a todos los grupos de edad, las EDA afectan más a los niños, principalmente en los países en desarrollo donde se producen anualmente entre 5 a 6 millones de muertes, constituyendo la segunda causa global de mortalidad infantil, el periodo pediátrico de mayor vulnerabilidad incluye a los menores de 5 años, quienes se deshidratan con mayor rapidez. 1. En México, el director de la campaña del Día Mundial de la Salud Digestiva, señaló que el 20% de las muertes infantiles se debe a diarrea y sólo el 39% de los niños con diarrea recibe el tratamiento recomendado 1. Además de sumarle el hecho de que para 2015 la Comisión Nacional del Agua, reportó que 94.4% de la población tenía cobertura de agua entubada 2

Para mitigar el riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas a la población por la presencia de éstos microorganismos, se han implementado diferentes mecanismos de desinfección en el agua con compuestos convencionales tales como hipoclorito y cloro gaseoso que generan un efecto residual con subproductos cancerígenos tales como los trihalometanos y las cloraminas. También se ha usado la luz ultravioleta y el ozono como mecanismos de desinfección no convencionales, los cuales se basan en la inactivación de los microorganismos a través del contacto con los mismos; sin embargo no dejan efecto residual en el agua para su almacenamiento y distribución. Con base en dicha problemática, a nivel mundial se han realizado diferentes estudios en miras de reemplazar las metodologías convencionales de tratamiento, empleando compuestos que no resulten tóxicos a la salud humana y que sean factibles. Del mismo modo, se han desarrollado estudios en campos no convencionales para la desinfección de agua, como

es el caso de la nanotecnología. Esta ciencia ha tenido avances impresionantes en las últimas décadas, generando nanomateriales (NMs) y nanopartículas (NPs) aplicados a procesos de tratamiento de agua; dentro de los nano-objetos más implementados se encuentran las membranas, materiales de adsorción, nanocatalizadores, recubrimientos y reactivos, los cuales resultan siendo más eficientes que los procesos convencionales, debido a su capacidad de adsorción y recuperación.

En las NPs se presenta el efecto de tamaño cuántico, el cual hace referencia al incremento del área superficial a medida que disminuye su tamaño, esto hace que las NPs presenten propiedades electrónicas, magnéticas y ópticas excepcionales. En las ciencias médicas, los nanomateriales se han empleado para mejorar los diagnósticos, tratamientos médicos e incluso implantes ³. Los materiales nanoporosos con una gran área de superficie y tamaño uniforme han sido propuestos como portadores de diversas sustancias activas en los sistemas de administración de fármacos ⁴. Se han aplicado nanocristales semiconductores o puntos cuánticos (QDs por sus siglas en inglés) como sondas fluorescentes eficientes para la bioimagen de células cancerosas como alternativa a los fluoróforos orgánicos tradicionales ⁵. Y es así como los nanomateriales y nanopartículas no sólo han ganado lugar en aplicaciones médicas, sino también en procesos de catálisis, recordando que la catálisis es el proceso por el cual se aumenta la velocidad de una reacción química y que el catalizador se puede encontrar en una fase diferente al del medio de reacción, siendo entonces una catálisis heterogénea. Se han empleado diferentes nanomateriales sólidos en catálisis heterogénea, debido a la posibilidad de separar el catalizador de la reacción por acciones físicas, sin embargo, el tamaño de las NPs o de los NMs en ocasiones dificulta dicho proceso o lo hace costoso. De acuerdo a esto, en catálisis heterogénea, se busca usar NMs que sean fácilmente separables mediante campos magnéticos.

Las ferritas se han empleado en el campo de la medicina, la electrónica y en la degradación de compuestos orgánicos presentes en el agua, gracias a la actividad fotocatalítica que presentan bajo el espectro de luz visible y luz ultra violeta ⁶. Dentro los estudios que se han realizado, se ha visto que en el mecanismo de acción bajo luz visible las ferritas de zinc son capaces de generar especies reactivas de oxígeno, que con el oxígeno de la atmósfera y el medio acuoso en el que se encuentren, son capaces de generar especies súper oxidantes en forma de radicales, tales como radicales hidroxilo, hidroperóxido y H_2O_2 , a lo cual se le llaman especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés); mientras que, en un medio con presencia de peróxido de hidrógeno también pueden llegar a generar reacciones tipo Fenton. Para generar estas ROS es necesario que el material sea activado por medio de energía (fotones) con una energía mayor a la separación de las bandas de conducción (CB) y de valencia (VB) que presentan sus átomos, a esta separación se le conoce como bandgap. Por ejemplo, para

el caso de las ferritas de zinc y las magnetitas, se han reportado valores cercanos a los 2eV de bandgap, lo que indica que dichos materiales serán activados para fotocátalisis con el espectro de luz visible (380 – 760nm) ⁷.

Para aplicaciones fotocatalíticas en procesos de inhibición de crecimiento celular, el material más estudiado ha sido el ZnO, ya que es considerado como el agente antibacteriano más tóxico para los microorganismos entre las NPs de óxidos metálicos (Al₂O₃, SiO₂ y TiO₂) contra *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas fluorescens*, y podría ser un agente antibacteriano eficaz para proteger los productos agrícolas y los alimentos contra patógenos⁸. Sin embargo, el bandgap de este material se ha reportado en 3.2 eV, lo que indica que como fotocatalizador, debe ser activado bajo luz UV ($\lambda < 380$ nm). Se ha visualizado el mecanismo de acción del ZnO sobre los microorganismos, identificando que hay tres puntos de acción que inciden sobre la inhibición del crecimiento celular, a partir de la activación del material. En primer lugar se da la generación de ROS en la superficie del material, las cuales producen H₂O₂, que causa daño tanto en la membrana celular como al interior del microorganismo, impidiendo los procesos de replicación del ADN. En segundo lugar, la generación de iones divalentes de zinc (Zn²⁺) que, producen estrés oxidativo en el medio de la célula y también generan daño en la membrana. Finalmente, el contacto directo de las NPs de ZnO con la membrana celular y la internalización de las NPs por parte de la célula, donde seguido se lleva a cabo el proceso de generación de ROS y liberación de radicales divalentes, que alteran los procesos funcionales normales del microorganismo.

La presente investigación estudia la inhibición de crecimiento celular en cepas bacterianas que causan enfermedades gastrointestinales diarreicas Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*) y Gram negativas (*Salmonella typhi*, *Escherichia coli*), a partir de la actividad fotocatalítica de nanomateriales sintetizados a escala laboratorio de ferritas de zinc (ZnFe₂O₄) y magnetitas (Fe₃O₄), dopados y sin dopar con plata (Ag); el interés del dopaje de los nanomateriales radica en identificar la influencia de la actividad antibacterial de la plata en el mecanismo de acción de los nanomateriales sobre las bacterias. Por otra parte, se emplean estas NPs por el interés académico de evaluar a largo plazo, la posibilidad de emplear materiales con estructura química de ferritas en procesos de desinfección de agua contaminada con los patógenos de interés, bajo la acción de luz visible, y con esto, identificar como potenciar su actividad antibacterial.

En el marco de identificar el mecanismo de inhibición de crecimiento celular en las bacterias de interés debida a la acción de los NMs, se identificó la síntesis de NPs más apropiada para la obtención de octaedros (como morfología deseada) tanto para las ferritas como para las magnetitas. Asimismo, para identificar las propiedades físicas y químicas de los NMs sintetizados se emplearon diversas técnicas de caracterización en

las NPs sintetizadas, permitiendo identificar sus propiedades, permitiendo correlacionar dichas propiedades con la actividad fotocatalítica de cada NM.

Del mismo modo se doparon los materiales en diferentes porcentajes con Ag, realizando las caracterizaciones del material para identificar la distribución de la Ag y definir el porcentaje más apropiado de dopaje para las ferritas y magnetitas.

Continuando con el objetivo de identificar la concentración a la cual se presenta inhibición de crecimiento celular en las cepas de interés por acción de los nanomateriales dopados y no dopados, se identificó la concentración mínima de los NMs a la cual los microorganismos no presentan crecimiento celular, con base en metodologías planteadas previamente ¹⁰.

En el capítulo 2 se describe de manera general la problemática actual referente a la contaminación del agua con diferentes compuestos, haciendo énfasis en la contaminación por bacterias patógenas. Asimismo, se abordan los tratamientos de agua convencionales más implementados para la remoción de éstos microorganismos y las metodologías de tratamiento alternas basadas en NMs que han surgido, así como sus puntos de aplicación y limitaciones. Se presentan las propiedades fisicoquímicas de los NMs sintetizados y seleccionados para la presente investigación, así como el mecanismo de acción en fotocátalisis, y la incidencia de la plata en la actividad antibacterial.

En el capítulo 3 se presenta la justificación, objetivo general, objetivos específicos, hipótesis y alcance de la presente investigación.

En el capítulo 4 se presenta la metodología experimental que se llevó a cabo para la síntesis de los NMs, describiendo la técnica hidrotermal, con los respectivos reactivos y cantidades empleados. Se realiza la descripción de las técnicas empleadas en la caracterización física y química de los NMs para identificar su calidad y posibilidad de aplicación en los microorganismos. Finalmente se muestra la metodología implementada para la determinación de la concentración mínima de los NMs a la cual no se presenta crecimiento celular (MIC).

En el capítulo 5 se presentan los resultados asociados a la caracterización de los NMs, evidenciando las propiedades físicas y químicas de cada uno. Discutiendo y correlacionando los diferentes factores de incidencia en la generación de especies reactivas de oxígeno en los NMs, y las diferencias presentadas entre los mismos. Se presentan los resultados obtenidos en la determinación del MIC para cada material, identificando que la morfología, bandgap y dopaje de los materiales, son factores determinantes en la actividad antibacterial que éstos ejerce. De igual manera se

presentan los estudios realizados para determinar las propiedades magnéticas de los NMs y con esto identificar la posibilidad de recuperar los mismos mediante la aplicación de campos magnéticos externos.

Por último en el capítulo 6 se presentan las conclusiones y perspectivas resultado de los análisis, observaciones, limitaciones y continuidad, asociados a la presente investigación. A continuación se presenta un esquema representativo con los resultados esperados de la actividad fotocatalítica bajo luz visible de ferritas de zinc y magnetitas en bacterias las Gram positivas y Gram negativas de interés en esta investigación.

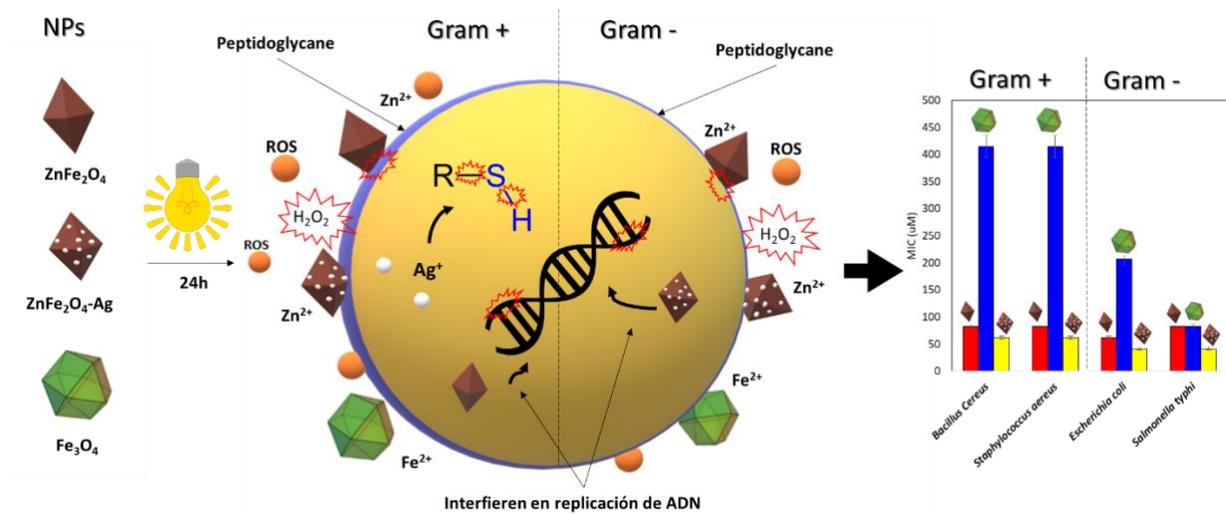


Figura 1-1. Esquema representativo de acción de nanomateriales sintetizados en bacterias Gram positivas y Gram negativas. Elaboración propia.

2 Capítulo: Marco teórico

2.1 Contaminación del agua

En general es posible definir la contaminación del agua como el exceso de una sustancia que puede causar daños al ser humano o al ambiente. El nivel de dicha contaminación depende de la concentración de los contaminantes, del impacto ambiental de los mismos y del uso que se le da al agua. A su vez, los contaminantes se derivan de procesos biológicos, químicos o físicos, así como de procesos naturales tales como erupciones volcánicas. A nivel mundial se presentan diferentes problemáticas relacionadas con el acceso a agua dulce, agua potable y al saneamiento, empeorándose la situación por la contaminación del recurso hídrico. En México y Latinoamérica dicha contaminación se debe generalmente a la descarga de aguas residuales¹¹, definidas como: aguas de composición variada provenientes de las descargas de usos municipales, industriales, comerciales, de servicios, agrícolas, pecuarios, domésticos, incluyendo fraccionamientos y en general de cualquier otro uso, así como la mezcla de ellas¹².

En las aguas residuales se encuentran diferentes indicadores de contaminantes, tales como la presencia de, grasas y aceites, materia orgánica flotante, sólidos sedimentables, sólidos suspendidos totales, DBO₅, nitrógeno total, fósforo total, temperatura y pH. Así como también se presentan indicadores y microorganismos patógenos que representan un riesgo para la salud humana, los cuales pueden ser parásitos, bacterias, helmintos, flora o fauna. Se consideran patógenos los coliformes fecales y huevos de helminto. ¹².

En la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-001-SEMARNAT-1996 se establecen los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Entendiendo los bienes nacionales como: los bienes cuya administración está a cargo de la Comisión Nacional del Agua en términos del artículo 113 de la Ley de Aguas Nacionales¹².

A continuación se presentan los límites máximos permisibles de contaminantes en aguas residuales tratadas para su reúso en servicios al público, según lo establecido en la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-003-SEMARNAT-1997.

Tabla 2-1. Límites máximos permisibles de contaminantes en aguas residuales tratadas para su reúso en servicios al público ¹³.

LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES DE CONTAMINANTES					
TIPO DE REUSO	PROMEDIO MENSUAL				
	Coliformes fecales [NMP/100mL]	Huevos de helmintos [h/L]	Grasas y aceites [mg/L]	DBO ₅ [mg/L]	SST [mg/L]
Servicios al público con contacto directo	240	≥ 1	15	20	20
Servicios al público con contacto directo u ocasional	1000	≤ 5	15	30	30

2.2 Contaminación del agua con organismos patógenos

La organización mundial de la salud reconoce que hay diversos microorganismos que, según pruebas obtenidas en estudios epidemiológicos ocasionan enfermedades por ingestión o contacto con agua potable ¹⁴. Los riesgos para la salud relacionados con el agua de consumo más comunes y extendidos son las enfermedades infecciosas ocasionadas por agentes patógenos como bacterias¹⁴, asimismo existen diversos tipos de agentes patógenos que pueden transmitirse por agua contaminada, y que es empleada para consumo humano.

Dentro de las bacterias establecidas como contaminantes del agua se han aislado las Gram negativas, con especial énfasis en las bacterias coliformes o enterobacterias, las cuales corresponden a 10% de los microorganismos intestinales humanos y animales, por lo que su presencia se asocia a contaminación fecal. En este grupo de bacterias se encuentran géneros como *Shigella*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, entre otras, causantes de enfermedades tales como infecciones en vías urinarias, infecciones gastrointestinales, fiebre tifoidea, entre otras. Asimismo se han aislado las bacterias Gram positivas, las cuales son menos comunes en agua, pero igualmente indicadores de contaminación fecal ya que habitan el intestino de humanos; algunos géneros que representan este grupo son: *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Enterococcus*.¹⁵ Por otro lado, en los alimentos se encuentran y transmiten otras bacterias como *Bacillus cereus*, que crecen a temperatura ambiente y se adaptan fácilmente; además se caracterizan

por producir toxinas que causan afectaciones a la salud del ser humano¹⁶. A continuación se mencionan las enterobacterias de interés para la presente investigación, que pueden ser transmitidas por agua contaminada, y su importancia en los sistemas de abastecimiento de agua.

Tabla 2-2. Agentes patógenos de interés en el presente estudio, transmitidos por agua y su importancia en los sistemas de tratamiento¹⁴

Enterobacterias	Importancia para la salud	Persistencia en los sistemas de abastecimiento de agua	Resistencia al cloro
<i>Escherichia coli</i>	Alta	Moderada	Baja
<i>Salmonella typhi</i>	Alta	Puede proliferar	Baja
<i>Staphylococcus aureus</i>	Alta	No se reporta	
<i>Bacillus cereus</i>	Alta		

Sin embargo, es importante recalcar que la transmisión de agentes patógenos por agua es solo un mecanismo de transmisión, también se puede presentar por medio de alimentos contaminados. Es decir que, para reducir la transmisión de enfermedades es importante mejorar la calidad del agua y alimentos. ¹⁴.

2.2.1 Bacterias patógenas

Los microorganismos se han clasificado en procariotas y eucariotas. Los procariotas son organismos con células que no presentan núcleo, es decir, tienen el material genético en el citoplasma y poseen únicamente un cromosoma. Pueden multiplicarse por bipartición, conjugación, transformación y transducción. ¹⁷. Dentro de estos organismos encontramos a las bacterias. Por otro lado, los organismos y microorganismos eucariotas son aquellos que contienen su material genético dentro del núcleo celular y además poseen también otros organelos internos ¹⁷ con un tamaño superior a los 5 µm, dentro de esta clasificación se encuentran las células de hongos, parásitos, animales y vegetales.

Los organismos patógenos se definen como aquellos que causan enfermedades en un receptor de los mismos, en este caso los seres humanos¹⁵; estos organismos pueden ser virus, hongos, bacterias y protozoos. Para la presente investigación se centra la atención en bacterias patógenas causantes de enfermedades diarreicas. Las bacterias son microorganismos unicelulares procariotas que se reproducen por fisión binaria,

con un tamaño entre los 0,5 y 3 μm , y con una pared celular compuesta por peptidoglicano (eubacterias). Poseen cadena de ADN, y presentan diferentes morfologías, las cuales se deben a la rigidez de su pared celular ¹⁸. A continuación se muestran las principales morfologías (bacilos, cocos y espirilos) que se presentan en las bacterias:

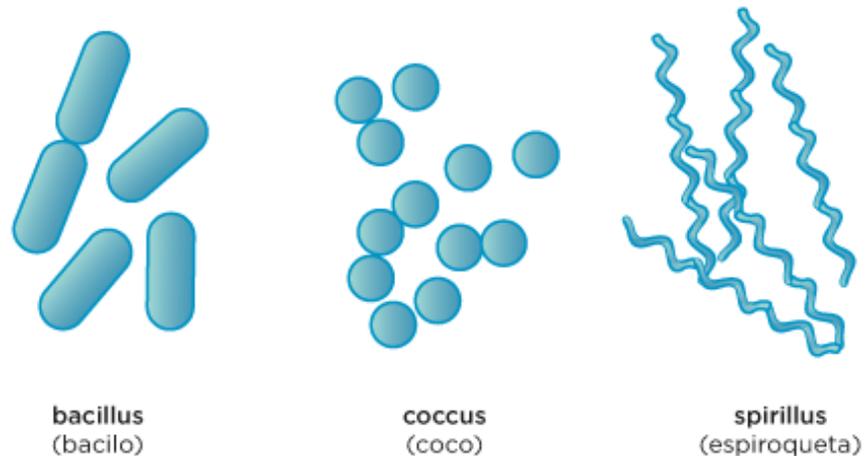


Figura 2-1. Principales morfologías bacterianas ¹⁸

Dentro de las principales morfologías de la figura anterior, existen clasificaciones más puntuales y exactas respecto las variaciones de forma para las bacterias, debidas a la pared celular. A su vez, las bacterias poseen una membrana plasmática, la cual es una estructura vital para la célula. Dicha membrana se encuentra estabilizada por puentes de hidrógeno, con interacciones hidrofóbicas y cationes de calcio y magnesio que se combinan con los fosfolípidos cargados negativamente. Dentro de esta membrana se encuentran múltiples proteínas transmembrana, que facilitan el transporte de sustancias hidrofílicas a través de ésta.¹⁸

Teniendo como base de morfología la pared celular bacteriana, es posible realizar una caracterización de las bacterias en Gram positivas y Gram negativas. Las bacterias Gram positivas presentan una única capa homogénea de 20 a 80 nm de grosor de peptidoglicano o mureína, situada por fuera de la membrana celular. Mientras que las bacterias Gram negativas presentan una capa más delgada de peptidoglicano con 2 a 7 mm de grosor. A su vez, esta capa está rodeada por una membrana externa, dejando un espacio llamado espacio periplasmático donde se encuentran diferentes proteínas y enzimas hidrolíticas tales como proteasas, lipasas y fosfatasa, que participan en la captación de nutrientes y en la conversión de macromoléculas en moléculas más pequeñas que pueden ser metabolizadas por la bacteria ¹⁸.

A continuación, se muestra un breve listado con la diferenciación entre las bacterias Gram positivas y Gram negativas:

Tabla 2-3. Características de bacterias Gram positivas y Gram negativas. 19

Características bacterias Gram positivas	Características bacterias Gram negativas
<ul style="list-style-type: none"> • Capa gruesa de peptidoglicano, en forma de capas múltiples de 0,02 a 0,06µm de grosor • Presencia de ácido teicoico (polisacáridos que se unen al ácido N-acetilmurámico) • Presencia de proteínas en la superficie externa del peptidoglicano • En tinción de Gram presentan coloración violeta • No contienen membrana externa • No hay espacio periplásmico • Baja concentración de lipopolisacáridos (LPS) 	<ul style="list-style-type: none"> • Capa única y fina de peptidoglicano de 0,01 µm de grosor • Presencia de membrana plasmática • Espacio periplásmico • Membrana externa: bicapa lipídica constituida por una molécula anfipática: el lipopolisacárido (LPS), con fosfolípidos y proteínas que la unen al peptidoglicano. • La membrana externa es más permeable que la plasmática y permite el pasaje de pequeñas moléculas • En tinción de Gram presentan coloración rosa • No presentan ácido teicoico

La siguiente figura permite ver esquemáticamente la diferencia de grosor entre la capa de peptidoglicano en cada las células Gram positivas y Gram negativas.

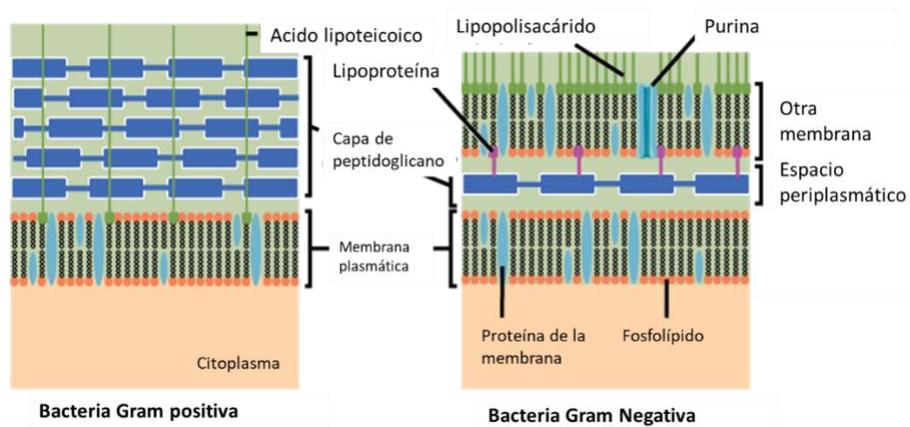


Figura 2-2. Representación visual de composición externa bacterias Gram positivas y Gram negativas. 19

Del mismo modo, a continuación se muestra la capa de peptidoglicano para bacterias Gram positivas y para las bacterias Gram negativas. La letra G hace referencia al monosacárido N-acetil-glucosamina (NAG), mientras que la letra M corresponde al ácido N-acetilmurámico.

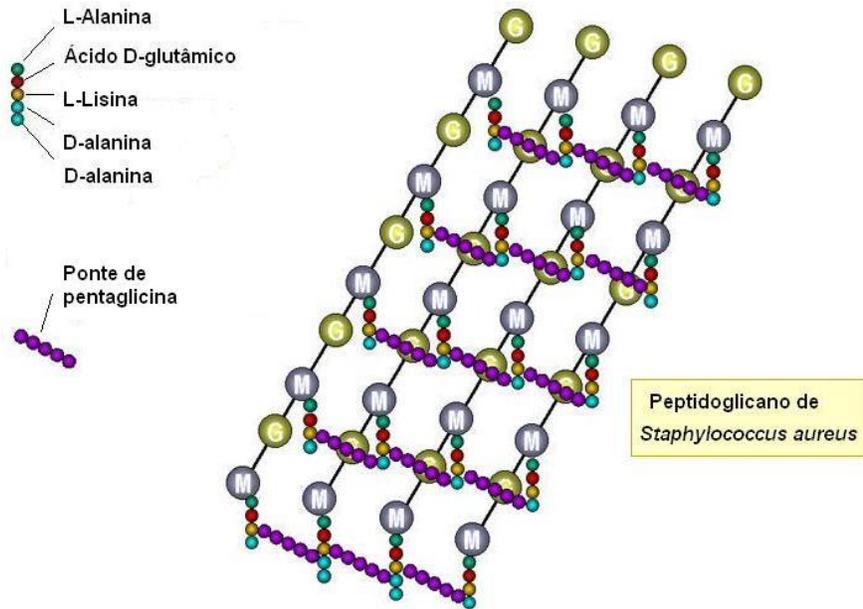


Figura 2-3. Peptidoglicano de *Staphylococcus aureus*, bacteria Gram positiva 20

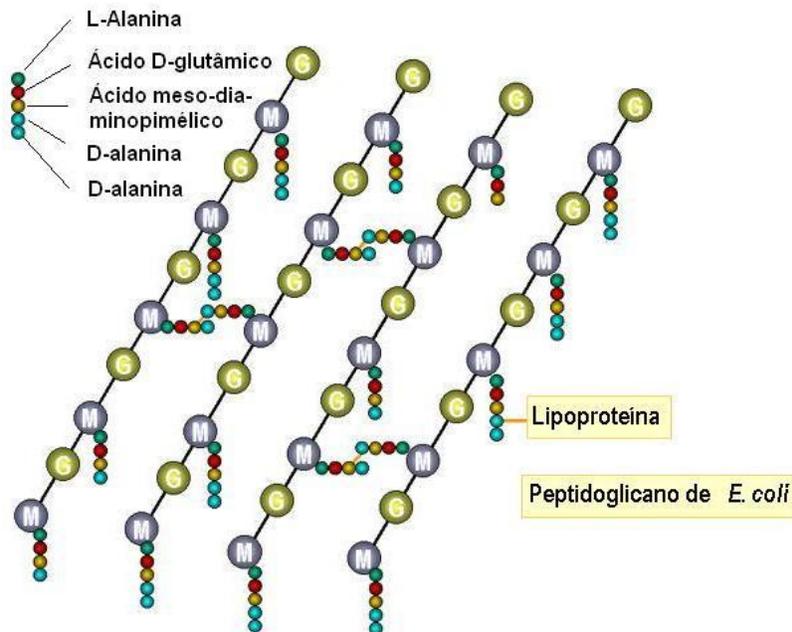


Figura 2-4. Peptidoglicano de *Escherichia coli*, Bacteria Gram negativa 20

2.2.2 Bacterias patógenas de interés

Staphylococcus aureus: Este microorganismo no solo afecta a humanos, sino también a animales, tanto que es la cepa de estafilococos más común alrededor del mundo tanto en humanos como en animales. Este microorganismo produce infecciones gastrointestinales debido a su fácil transmisión, y además es resistente a la penicilina ²¹. Aunque irónicamente, habita en las mucosas del ser humano. Es una bacteria Gram positiva con forma de coco y que contiene carotenoides ²².

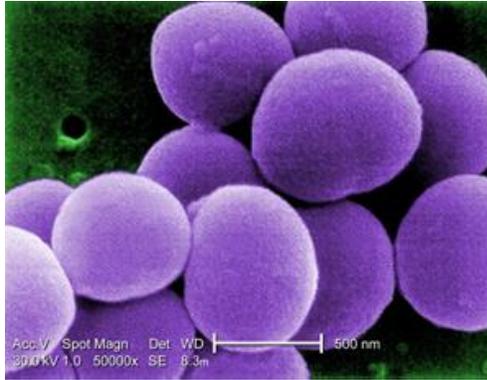


Figura 2-5. *Staphylococcus aureus* ²³

1. ***Bacillus cereus***: Es una bacteria con forma de bacilo Gram positiva que crece entre 30 y 37°C y genera infecciones gastrointestinales para quienes la consumen, es resistente a los procesos de pasteurización y de cocción²⁴.

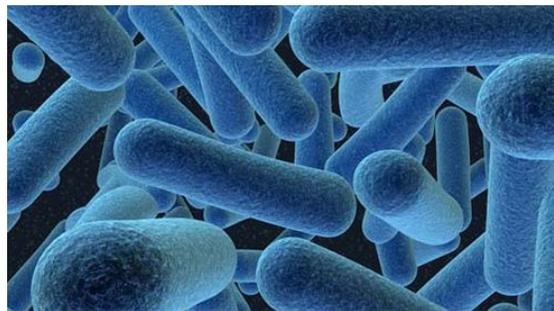


Figura 2-6. *Bacillus cereus* ²⁴

2. ***Escherichia coli***: Es una bacteria Gram negativa de la familia de las *Enterobacteriaceae*, con forma de bacilo que se encuentra principalmente en el intestino de los humanos y que a su vez, cuando es ingerida genera gastroenteritis y en niños puede llegar a ocasionar enfermedades diarreicas agudas, así como también puede generar infecciones en el tracto urinario²⁵

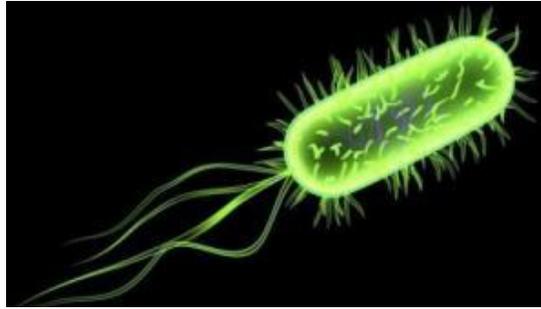


Figura 2-7. *Escherichia coli* ²⁶

3. ***Salmonella typhi***: Es una bacteria Gram negativa de la familia *Enterobacteriaceae*, con forma de bacilo. Causa enfermedades graves como la fiebre tifoidea y la fiebre paratifoidea, también es una de las principales causas de intoxicación alimentaria colectiva. ²⁷

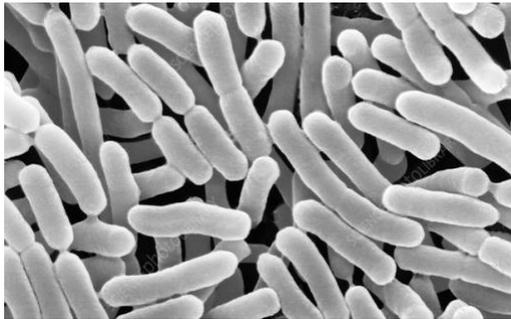


Figura 2-8. *Salmonella typhi* ²⁷

2.3 *Tratamientos convencionales para remoción de microorganismos patógenos en el agua.*

La remoción de microorganismos patógenos del agua se define como desinfección. Ésta puede realizarse a través de: a) agentes químicos, siendo el cloro y sus compuestos los más utilizados; b) agentes físicos, bien sea a través de medios mecánicos (se logra una remoción parcial de bacterias y otros organismos mediante operaciones de tratamiento, cuyos propósitos son distintos a la desinfección, entre ellas, el cribado grueso y fino, la desarenación y la sedimentación primaria), también se puede presentar mediante calor, o bien, mediante radiación (luz ultravioleta y rayos gamma)²⁸.

A lo largo de la historia se han presentado diferentes mecanismos y procesos de tratamiento según las necesidades y, recursos físicos y económicos de cada población. Para efectos del presente trabajo se presenta la información resumida sobre los procesos de tratamiento comúnmente aplicados, para reducir la carga microbiana.

Tabla 2-4. Tratamientos convencionales para la reducción de microorganismos patógenos en agua 14.

Tratamiento	Grupo de microorganismos	Tasa de eliminación de referencia	Tasa de eliminación máxima posible
Pretratamiento			
Pre filtros	Bacterias	50%	Hasta el 95% si se protegen contra los picos de turbidez mediante un filtro dinámico
Coagulación, floculación, sedimentación			
Sedimentación convencional	Bacterias	30%	90% (en función del coagulante, el pH, la temperatura, la alcalinidad y la turbidez) 70% (mismos factores) (90%) mismos factores
Ablandamiento con cal	Bacterias	20% a pH 9,5, durante 6h a 2-8°C	99% a pH 11,5, durante 6h a 2-8°C
Filtración			
Filtración granular de caudal alto	Bacterias	No hay datos	99% en condiciones de coagulación óptimas
Filtración lenta en arena	Bacterias	50%	99,5% en condiciones óptimas de maduración, limpieza y relleno.

Filtración de membrana: microfiltración	Bacterias	99,9 – 99,99%, con un pretratamiento adecuado y si se conserva íntegra la membrana	No se reporta
Filtración de membrana: ultrafiltración, nanofiltración y ósmosis inversa	Bacterias	Eliminación completa, con un pretratamiento adecuado	No se reporta
Desinfección			
Cloro	Bacterias	Ct99: 94 mg·min/l a 1–2 °C, pH 7 278 mg·min/l a 1–2 °C, pH 8,5 Ct: 0,6 mg·min/l a 23°C, pH 10	
	Virus	Ct99: 12 mg·min/l a 0–5 °C; 8 mg·min/l a 10 °C; ambos a pH 7–7,5	
	Protozoos	<i>Giardia</i> Ct99: 230 mg·min/l a 0,5 °C; 100 mg·min/l a 10 °C; 41 mg·min/l a 25 °C; todos a pH 7–7,5 No destruye <i>Cryptosporidium</i>	
Monocloramina	Bacterias	Ct99: 94 mg·min/l a 1–2 °C, pH 7; 278 mg·min/l a 1–2 °C, pH 8,5	
	Virus	Ct99: 1240 mg·min/l a 1 °C; 430 mg·min/l a 15 °C; ambos a pH 6–9	
	Protozoos	<i>Giardia</i> Ct99: 2550 mg·min/l a 1 °C; 1000 mg·min/l a 15 °C; ambos a pH 6–9. No inactiva <i>Cryptosporidium</i>	

Dióxido de cloro	Bacterias	Ct99: 0,13 mg·min/l a 1–2 °C, pH 7; 0,19 mg·min/l a 1–2 °C, pH 8,5	
	Virus	Ct99: 8,4 mg·min/l a 1 °C; 2,8 mg·min/l a 15 °C, ambos a pH 6-9	
	Protozoos	<i>Giardia</i> Ct99: 42 mg·min/l a 1 °C; 15 mg·min/l a 10 °C; 7,3 mg·min/l a 25 °C; todos a pH 6-9 <i>Cryptosporidium</i> Ct99: 40 mg·min/l a 22 °C, pH 8	
Ozono	Bacterias	Ct99: 0,02 mg·min/l a 5 °C, pH 6-7	
	Virus	Ct99: 0,9 mg·min/l a 1 °C; 0,3 mg·min/l a 15 °C	
	Protozoos	<i>Giardia</i> Ct99: 1,9 mg·min/l a 1 °C 0,63 mg·min/l a 15 °C, pH 6-9	
Radiación UV	Bacterias	99% de inactivación: 7mJ/cm ²	
	Virus	99% de inactivación: 59 mJ/cm	
	Protozoos	<i>Giardia</i> 99% de inactivación: 5 mJ/cm ² <i>Cryptosporidium</i> 99.9% de inactivación: 10 mJ/cm ²	

Nota: Ct y UV son para microorganismos en suspensión ¹⁴

2.4 Tratamientos biológicos aerobios y anaerobios

Los tratamientos biológicos eliminan la materia orgánica del agua, oxidan el nitrógeno amoniacal, eliminan el fósforo, y remueven otros contaminantes. Los contaminantes en el agua sirven de como fuente de carbono y/o como fuente de energía (denominada sustrato) para los microorganismos, generando biomasa, dióxido de carbono, y otros compuestos inocuos.

Podemos hacer una clasificación de los tratamientos biológicos de acuerdo con el soporte de la biomasa, la cual puede ser suspendida o fija. Para el caso de la biomasa suspendida se suele decantar y recircular la misma, como es el caso de los lodos activados y lagunas de aireación. Por otro lado, los de soporte sólido pueden ser filtros percoladores y biodiscos. Las técnicas más implementadas para reducir el contenido de materia orgánica, de nutrientes y de microorganismos patógenos en las aguas contaminadas son los tratamientos biológicos aerobios y anaerobios. El tratamiento biológico aerobio más empleado es el de lodos activados, en el cual se emplean microorganismos que responden a cambios físicos y químicos, y con los que se mantiene el sistema, de acuerdo a la edad y metabolismo de los mismos. El funcionamiento general de los lodos activados, como se muestra en la Figura 2-9, empieza cuando el agua residual entra en el proceso de pretratamiento, posteriormente se reduce la carga biológica que es posible retirar en la fase de sedimentación primaria, para pasar al tanque de aireación o reactor biológico en donde las bacterias metabolizan la materia orgánica empleando oxígeno, y generando nuevas bacterias, CO₂ y agua. Sin embargo, una parte de las bacterias mueren y liberan su contenido celular, el cual es utilizado por otras bacterias. Toda esta mezcla, cuantificada como sólidos suspendidos en el licor mezclado (SSLM), es decantada en el sedimentador secundario, donde a su vez, se recirculan los lodos jóvenes (según tiempo de residencia en el reactor previo) al inicio del reactor biológico. El agua que sale del sedimentador secundario sigue su proceso de tratamiento hasta llegar a la desinfección. 29

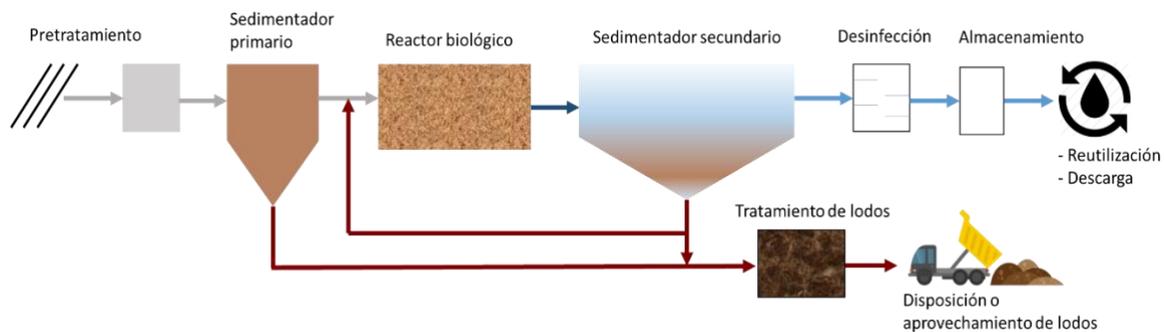


Figura 2-9. Esquema de funcionamiento de lodos activados por aireación. Elaboración propia.

Uno de los tratamientos anaerobios más empleados para el tratamiento de lodos y residuos con alta carga orgánica es el reactor anaerobio de flujo ascendente (RAFA), en donde la materia orgánica es convertida principalmente a metano, CO₂ y masa microbiana. Una de las ventajas de este reactor es que consume poca energía, pero se debe controlar el volumen y temperatura interna de los lodos en el interior del mismo. El funcionamiento general de los reactores anaerobios de flujo ascendente, como se

muestra en la Figura 2-10 se basa en la conducción del afluente desde la parte superior del reactor hacia el fondo del mismo por medio de un sistema de tuberías. El tratamiento se lleva a cabo cuando el afluente atraviesa de abajo hacia arriba el lecho de lodos que contiene microorganismos anaerobios. El biogás, lodo y agua generados en el tratamiento, van a la parte superior del reactor, en donde se separa el biogás y el lodo, para su aprovechamiento o disposición 30.

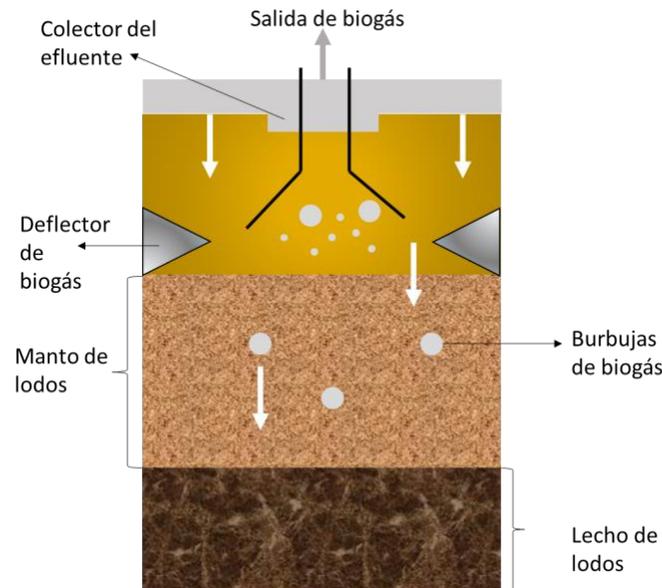


Figura 2-10. Dibujo esquemático de un reactor anaerobio de flujo ascendente 30

2.5 Tratamientos de desinfección de agua para uso y consumo humano.

Para promover la salud y el bienestar del ser humano cuando bebe agua o está en contacto con agua residual tratada, es necesario garantizar que en ninguno de los dos casos hay presencia de microorganismos patógenos. Para garantizar esto, al terminar los procesos de tratamiento de agua a gran escala tanto para consumo humano, como agua residual, se realiza la desinfección del agua, donde se eliminan los microorganismos patógenos. Para esto, se emplean agentes de desinfección los cuales pueden ser clasificados en: agentes oxidantes, cationes de metales pesados, agentes gaseosos y agentes físicos (calor, luz UV) 31. Generalmente se emplean agentes oxidantes, aunque se eligen los agentes desinfectantes en función de la calidad del recurso, del gasto de agua a desinfectar y generalmente en los procesos a gran escala se busca que estos agentes tengan un efecto residual para garantizar la calidad del agua durante el almacenamiento y la distribución en la red hasta el usuario final 31. Los desinfectantes más empleados son el ozono y el cloro por su poder oxidante, sin embargo el proceso de desinfección con cloro, bien sea con cloro gaseoso o hipoclorito sódico, puede generar subproductos nocivos a la salud, como es el caso de los trihalometanos y cloraminas generados por la reacción de compuestos orgánicos en el

agua con el cloro residual. Por otro lado, el ozono, se usa debido al poder oxidante y la capacidad que tiene para interferir en los procesos metabólicos de los microorganismos, aunque, puede producir aumento del carbono orgánico disuelto biodegradable en las redes de distribución, generando proliferación bacteriana en las mismas; además la implementación del ozono es un proceso costoso y en ocasiones difícil de implementar debido al costo de los equipos, al mantenimiento de los mismos, y a la adquisición de personal cualificado para su manejo³², aunque en Europa es uno de los mecanismos de desinfección más empleados tanto en la industria como en plantas de tratamiento de agua.

Por otro lado y como mecanismo alternativo se ha empleado la radiación ultravioleta (luz UV) con longitudes de onda entre los 200 a 310nm, ya que éste es el rango en donde se presenta actividad bactericida, siendo la mejor opción a 255nm, donde se ha reportado actividad letal a los microorganismos³¹ al dañar las proteínas, ácidos nucleicos, e interferir en el proceso de replicación del ADN. Sin embargo, se ha comprobado que con insuficiente tiempo de exposición de los microorganismos a la luz UV, éstos se pueden reactivar entre 60 y 100 min después de la irradiación³³, lo que no hace que sea un método efectivo para grandes caudales, ni grandes redes de distribución.

También se han desarrollado diferentes nanotecnologías para el tratamiento de agua y agua residual a través de diferentes presentaciones de nano-objetos, tales como nanopelículas, NMs, NPs de óxidos metálicos, nanoabsorbentes, y fotocatalizadores. Las NPs de plata se han usado desde los años 50 como inhibidor de crecimiento de algas en piscinas, y en filtros de agua desde los años 70. Lo anterior, debido las propiedades antibacterianas que presenta por la liberación constante de iones Ag^+ , a bajo costo y sin necesidad de ser activadas por energía adicional, lo que ha sido una solución como desinfectante en áreas remotas³⁴. Tal como la plata, se han estudiado NPs con valencia cero para la degradación de contaminantes orgánicos presentes en el agua, tales como pesticidas organoclorados y nitroaromáticos, estas NPs actúan como fotocatalizadores en los procesos de degradación. Generalmente estos NMs suelen ser de óxidos metálicos, tales como SiO_2 , ZnO , TiO_2 , Al_2O_3 , se ha demostrado que el TiO_2 es un excelente fotocatalizador debido a su bajo costo, estabilidad química y disponibilidad en la tierra, sin embargo no presenta acción antibacteriana. En contraparte, el ZnO se ha empleado como fotocatalizador en procesos de remoción de contaminantes y *Escherichia coli* en aguas residuales, bajo la activación de luz UV, estudiándose a su vez la posibilidad de recuperar el material y reutilizarlo.

En otra aplicación de los óxidos metálicos como nanoabsorbentes debido a su gran área superficial específica, corta distancia de difusión intraparticular y el tamaño de poro ³⁵.

Se han realizado estudios que demuestran que la adsorción de los iones metálicos puede revertirse fácilmente reduciendo el pH de la solución, con una tasa de recuperación por encima del 90% cuando el $\text{pH} > 2$ y cuando el $\text{pH} < 2$ puede llegar cerca del 100%. Además, la capacidad de adsorción del Zn^{+2} permanece estable después de la regeneración; según los resultados reportados por ³⁴, la capacidad de adsorción disminuyó en menos de un 25% después de 10 regeneraciones y ciclos de reuso, mientras que otros adsorbentes convencionales como el carbón activado redujeron su capacidad de adsorción en más de un 50% con una sola regeneración. Asimismo se tienen registros que la capacidad de regeneración del Zn^{+2} puede ser de hasta 100 veces sin perder su capacidad adsorción. ³⁶ y si le sumamos el hecho de que los óxidos metálicos son fácilmente separables, los nanoabsorbentes metálicos los hacen una tecnología económicamente viable.³⁷

Los procesos de catálisis en general pueden ser homogéneos o heterogéneos pero los fotocatalizadores se emplean en catálisis heterogénea con la finalidad de recuperar el catalizador y reutilizarlo, generalmente se emplean campos magnéticos sobre los fotocatalizadores, para realizar su separación del medio de reacción. La mayor ventaja de emplear sistemas de fotocatalisis con nanopartículas en sistemas de pequeña escala, radica en el efecto de confinamiento cuántico, donde es posible reducir el band gap de las NPs, de acuerdo a la variación de su tamaño, y sus propiedades fisicoquímicas; y con esto, permitir la activación de los materiales en el rango de luz visible y no solo de luz UV, lo cual los puede hacer aplicables en áreas alejadas. Además se ha sugerido recientemente la síntesis de nanomateriales que actúen como fotocatalizadores en rangos visibles y probar dopajes con diferentes materiales para evaluar la toxicidad de los mismos³⁸.

2.6 Tratamientos de agua no convencionales por medio de nanotecnología.

Debido al aumento de descarga de microcontaminantes en cuerpos de agua tanto en países en vía de desarrollo como en países industrializados se hace evidente la necesidad de adaptación de la nanotecnología a ésta problemática, con la finalidad de desarrollar procesos avanzados para el tratamiento de aguas para contaminadas con los diferentes microcontaminantes. ³⁴

Los NMs tienen propiedades físicas y químicas dependientes de su tamaño, relacionadas con el área de superficie específica, tales como: disolución rápida, alta reactividad, sorción fuerte, y propiedades discontinuas, tales como: supermagnetismo y efecto de confinamiento cuántico. Dichas características permiten el desarrollo de nuevos NMs para procesos más eficientes de tratamiento de aguas contaminadas, tales como membranas, materiales de adsorción, nanocatalizadores, recubrimientos y

catalizadores ³⁴. A continuación, se presentan algunas de las tecnologías más destacadas y desarrolladas durante los últimos años para diferentes aplicaciones, identificando sus ventajas y desventajas.

Tabla 2-5. Nanomateriales y NPs de óxidos metálicos empleados en tratamiento de agua contaminada ³⁴.

Nanomateriales y NPs de óxidos metálicos	Ventajas (+) y desventajas (-)	Aplicaciones
Nanoabsorbentes	(+) Alta área de superficie específica, altas tasas de absorción, nanopartículas pequeñas (-) Alto costo de producción	Eliminación de sustancias orgánicas, metales pesados y bacterias.
NPs de óxidos metálicos	(+) Corta distancia de difusión intraparticular compresible, resistente a la abrasión, magnética, actividad fotocatalítica. (-) Poco reutilizable en remoción de metales pesados	Remoción de metales pesados (arsénico), filtro de medios.
Membranas y procesos que involucran membranas	(+) Proceso confiable y automatizado (-) Alta demanda energética	Todos los campos de tratamiento de aguas residuales
NPs de Ag y NPs de TiO₂	(+) Bactericida, baja toxicidad al ser humano. (+) NPs de TiO ₂ , químicamente estables, largo tiempo de vida (-) NPs de Ag, durabilidad limitada. (-) NPs TiO ₂ , requieren activación por luz UV	Desinfección de agua, prevención de acumulación de microorganismos, plantas o algas (superficies antiincrustantes), descontaminación de componentes orgánicos.
Nanopartículas magnéticas	(+) Recuperación por medio de campos magnéticos. (-) Se requiere estabilización	Remediación de agua subterránea. Osmosis inversa

2.7 Limitaciones de nanomateriales y procesos basados en nanopartículas en aplicaciones en agua.

La implementación de nanomateriales y tecnologías basadas en nanopartículas para la desinfección se ve enmarcada en el impacto que pueden tener dichos nanomateriales en el ambiente y la salud. A lo largo de la historia se han llevado a cabo numerosos estudios que incluyen pruebas de toxicidad, análisis del ciclo de vida, evaluación de las vías de dispersión de las NPs en cuerpos de agua para evaluar los posibles riesgos para la salud humana, entre otros. Los resultados de dichos estudios han permitido una mejor comprensión del comportamiento de algunas nanopartículas en sistemas acuosos, permitiendo así que se articule la política, administración, ciencia e industria para generar o modificar leyes y regulaciones que permitan la implementación apropiada de NMs y tecnologías basadas en NPs ³⁴. En Europa y Estados Unidos se están llevando a cabo diferentes evaluaciones de legislación para la implementación de NMs y NPs en procesos de desinfección de superficies. Adicionalmente, diferentes NMs como las NPs de Ag, ZnO, Ce₂O₄ y TiO₂ evidencian propiedades antimicrobianas sin tendencia a formar productos tóxicos para la salud,³⁹ que permiten su implementación en procesos de desinfección con microorganismos de interés. Aunque, es importante tener en cuenta y considerar que la acción catalítica de los NMs y NPs depende de su tamaño, morfología, estructura, y otras propiedades fisicoquímicas que determinan su efectividad en el medio de aplicación. En respuesta a la necesidad de controlar tanto como sea posible la formación de las NPs de la manera deseada, se han diseñado reactores para la síntesis de NPs, en busca de mejorar los procesos de fotocatalisis ³⁸.

Sin embargo, a pesar de que se ha investigado mucho y se ha avanzado en la síntesis y aplicación de diferentes nano-objetos a diferentes procesos de interés para la descontaminación del agua, aún no se puede hablar de aplicación a gran escala, y en este sentido, no son competitivos con los procesos de tratamiento convencionales ³⁴, sin embargo es importante mencionar que estas aplicaciones pueden tener mayor impacto en el futuro, sobre todo en sistemas de tratamiento descentralizados y áreas sin acceso a agua tratada.

2.8 Definición de nanomateriales (NMs) y nanopartículas (NPs)

Se ha mencionado la utilidad de los nanomateriales y las nanopartículas en las diversas aplicaciones, sin embargo no se ha dado una definición para éstos. La Agencia de Protección ambiental de los Estados Unidos (EPA, por sus siglas en inglés) define a los NMs como una diversa clase de sustancias que tienen componentes estructurales menores a los 100 nm en al menos una dimensión. Los NMs incluyen NPs y tienen una alta relación de área de superficie a volumen, donde el número de átomos de superficie y su disposición determina el tamaño y las propiedades del NM. Desde 2014, más de

1,800 productos de consumo, que contienen NM están en el mercado, como por ejemplo es el caso de los protectores solares para la piel, que contienen TiO₂ 40.

A su vez los nanomateriales pueden ser clasificados según sus componentes, tal como se enlistan a continuación:

- a) NMs basados en Carbono: Generalmente, estos NMs contienen carbono y presentan morfologías como tubos huecos, elipsoides o esferas. Los fullerenos (C₆₀), los nanotubos de carbono (CNT), las nanofibras de carbono y el grafeno (Gr) se consideran como NMs a base de carbono. 41 42
- b) NMs basados en compuestos inorgánicos: Estos NMs incluyen nanopartículas de metales y óxidos metálicos, y pueden ser dopados con NPs de oro (Au) o plata (Ag). Del mismo modo, las NPs de óxidos metálicos pueden ser semiconductores cerámicos. Existen varias formas de sintetizarlos y los métodos sol-gel e hidrotérmal son los más conocidos e implementados. Dependiendo de la metodología empleada se puede controlar la morfología y tamaño de las nanopartículas, de acuerdo con el tiempo de maduración de la reacción. Asimismo, para dichas síntesis se suelen emplear reactores hidrotérmal de volumen no superior a los 100 mL, en donde se eleva la temperatura y presión para la formación de las NPs deseadas. 41
- c) NMs basados en compuestos orgánicos: Aquí se encuentran los NMs hechos de materia orgánica (que no es carbono ni compuestos metálicos). El ensamblaje se basa en interacciones no covalentes débiles. Asimismo, el diseño de moléculas ayuda a transformar los NMs orgánicos en estructuras específicas deseadas, tales como dendrímeros, micelas, liposomas y polímeros 41.
- d) NMs compuestos: Estos NMs tienen NPs en diferentes fases, una fase se encuentra a nanoescala (<100 nm) y ésta, se puede combinar con otras NPs más grandes, con materiales “bulk” como nanofibras híbridas, o con compuestos organometálicos. Su morfología dependerá de la aplicación que se le quiera dar 41.
- e) Puntos cuánticos (QDs): son nanocristales de materiales semiconductores con tamaños de 2 a 10 nm. Estos nanocristales son semiconductores con propiedades electrónicas, ópticas, catalíticas y en algunos casos magnéticas. 43

Asimismo, los materiales se pueden presentar en 0, 1, 2 o 3 dimensiones. Cuando se habla de materiales en dimensión cero, se hace referencia a los materiales que tienen todas sus dimensiones en el rango nanométrico <100 nm, aquí se pueden encontrar las NPs y nanocristales. A su vez las NPs ocupan un tamaño entre los 10 nm y 1µm. Los nanomateriales en una dimensión, hacen referencia a los materiales que varían su largo o longitud y que a la vez conservan las dimensiones de altura y anchura (en el rango nanométrico), aquí se encuentran las nano cuerdas. Los nanomateriales en dos

dimensiones son nano películas muy delgadas con áreas de tamaño indefinido y con un espesor en el rango nanométrico, es decir entre 1 y 100 nm. Finalmente los materiales en tres dimensiones o a gran escala, hace referencia a todos aquellos materiales que tienen área, largo y espesor fuera del rango nanométrico. A continuación se presenta la ilustración esquemática que muestra la forma general de la densidad de los estados en que se presentan los nanomateriales 44.

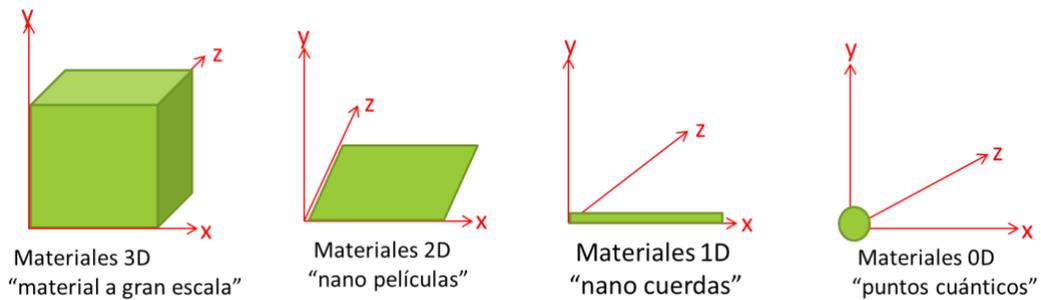


Figura 2-11. Ocupación en el espacio de materiales y nanopartículas. Elaboración propia.

A medida que disminuye el tamaño de los materiales, aumenta el área superficial (Figura 2-12). Del mismo modo, es posible observar que al reducir el tamaño de los materiales a nivel de nanómetros puede mejorarse la formación de radicales debido al proceso de confinamiento cuántico 45. El confinamiento cuántico modifica la estructura electrónica, pasando los electrones confinados a ocupar diferentes niveles de energía; se produce una cuantización de los niveles de energía, de los estados de densidad electrónica y de la carga. Esto se puede presentar en una, dos o tres dimensiones.

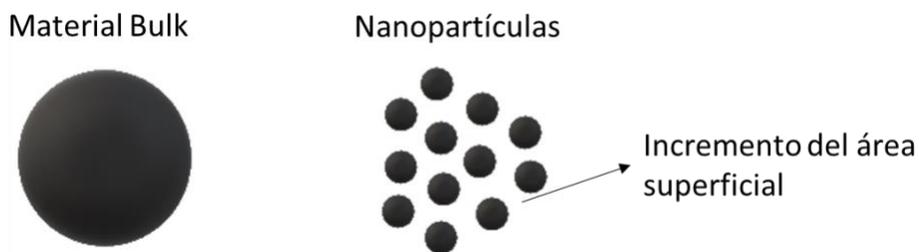


Figura 2-12. Incremento de área superficial en nanopartículas en relación a material bulk. Elaboración propia.

2.8.1 Estructura cristalográfica de nanomateriales (NMs) cristalinos.

Los sólidos cristalinos se construyen desde la repetición en el espacio de una estructura elemental llamada celda unitaria, la cual a su vez es un exaedro con sus 3 pares de caras paralelas, ver Figura 2-13. La repetición de ésta celda en las tres dimensiones del espacio define la estructura del cristal, asimismo, la celda tiene vectores que

determinan las direcciones independientes del sistema de coordenadas de la celda (x,y,z), proporcionando así los parámetros de red (distancia constante de las celdas en cada una de las dimensiones e identificados por las letras a , b y c). De acuerdo a los parámetros de red es posible clasificar las estructuras cristalinas en: cúbicas, hexagonales, tetragonales, trigonales, rómbicas, monocónicas o triclínicas ⁴⁶.

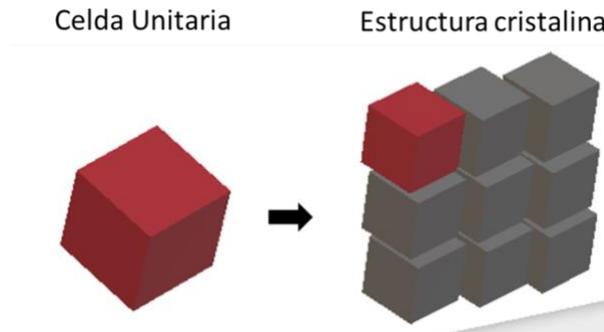


Figura 2-13. Representación gráfica de celda unitaria y estructuras cristalinas basada en celdas unitarias. Elaboración propia.

Para la presente investigación nos centraremos en las estructuras cristalinas cúbicas en donde los tres ejes todos de igual longitud ($a = b = c$). Dentro de éstas estructuras, se pueden presentar tres tipos de redes cristalinas: red cúbica simple, red cúbica centrada en el cuerpo (bcc, por sus siglas en inglés) o red cúbica centrada en las caras (fcc, por sus siglas en inglés) ⁴⁷, ver figura 2-14.

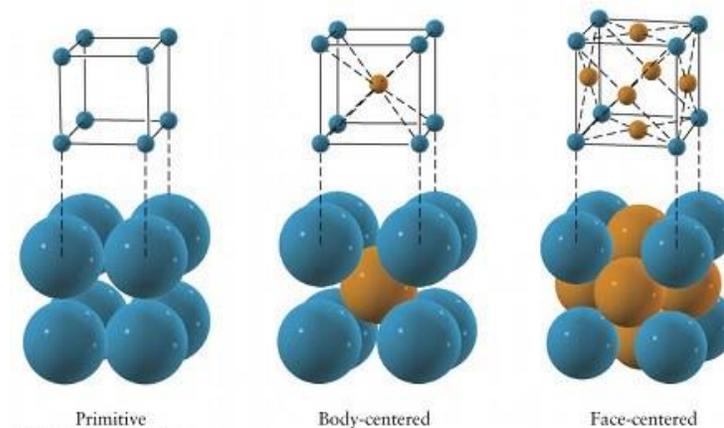


Figura 2-14. Representación gráfica de estructuras cristalinas cúbicas ⁴⁸

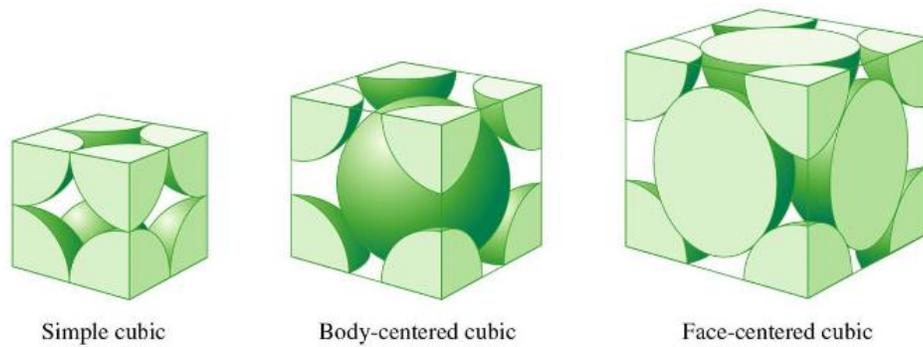


Figura 2-15. Fracción de espacio ocupado por disposición de átomos en estructuras cristalinas cúbicas ⁴⁸

A su vez es de nuestro interés la estructura cúbica centrada en las caras (fcc) la cual presenta el mayor factor de empaquetamiento, es decir que, presenta el mayor volumen ocupado por átomos en la celda unitaria, tal como se evidencia en la figura anterior. Como consecuencia de esto, en ésta estructura se encuentran los planos cristalográficos con la mayor concentración atómica posible, o con mayor densidad planar (ca. 74%) ⁴⁹, esta familia de planos es la (111), ver figura 2-16. Los planos cristalográficos se encuentran definidos por tres átomos no alineados, uniendo tres nudos de una celda unitaria, y se encuentran determinados por los Índices de Miller, determinados por las letras (hkl) para planos y [hkl] para direcciones. Estos son, las posiciones o lugares por donde el elemento es más susceptible a sufrir movimientos en su interior cristalino, a su vez, son vectores, por lo que pueden ser positivos o negativos y con esto poseer la misma línea de acción pero diferente sentido. Cuando en los sistemas cúbicos se presentan grupos de direcciones con una misma combinación de coordenadas (grupos de planos de redes equivalentes) se les llama familia. Es importante resaltar que un material posee las mismas propiedades en todas y cada una de las diferentes direcciones de una familia.

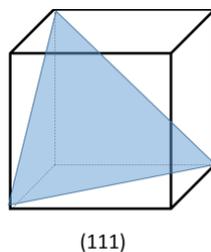


Figura 2-16. Familia de planos (111) para una estructura fcc. Elaboración propia.

Asimismo dentro de las estructuras cúbicas centradas en las caras, los espacios vacíos o intersticios donde pueden estar los átomos, tienen formas regulares, que pueden ser formas octaédricas o tetraédricas. Para hacer esto más visual, es como dividir un cubo en 8 partes, los intersticios tetraédricos están en el centro de las 8 partes, entonces hay

en total 8 intersticios tetraédricos, (con número de coordinación 4) por cada celda unitaria, tal como se muestra a continuación:

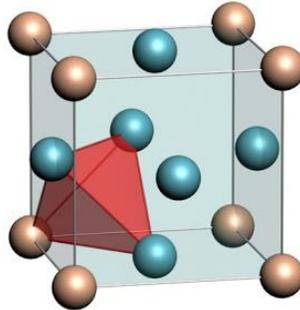


Figura 2-17. Intersticios tetraédricos en estructura fcc

Por otro lado los intersticios octaédricos se encuentran en el centro del cubo y en el punto medio de cada uno de los lados de la celda unitaria. Hay 4 intersticios octaédricos (con número de coordinación 6) por cada celda. Tal como se muestra en la figura 2-18. Es decir que si tuviéramos que definir en términos de n (cantidad de átomos), el número de intersticios o huecos octaédricos y tetraédricos por celda unitaria en estructuras cúbicas compactas, este sería $2n$ para los tetraédricos y n para los octaédricos.

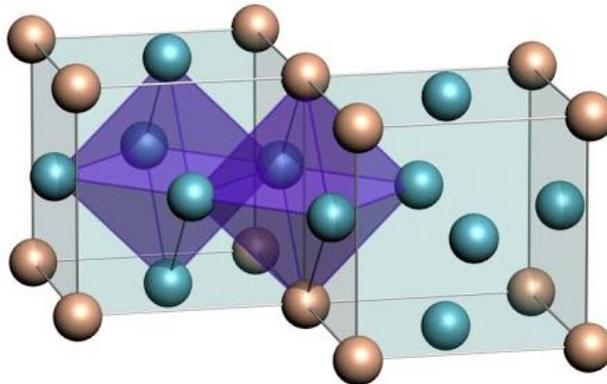


Figura 2-18. Intersticios octaédricos en estructura fcc

2.9 Fotocatálisis y óxidos metálicos

2.9.1 Fotocatálisis heterogénea

Para entrar en el tema de fotocatalisis heterogénea es importante aclarar que es catálisis, fotocatalisis y catálisis heterogénea. En primer lugar, la catálisis, es el proceso en el cual se aumenta la velocidad de la reacción por medio de un catalizador, a su vez, este catalizador puede estar en fase sólida, líquida o gaseosa. Cuando el catalizador se encuentra en una fase diferente a la fase de los reactivos se habla de catálisis heterogénea. El comportamiento catalítico dependerá de las propiedades químicas de la superficie del catalizador en estado sólido. Mientras estas propiedades son a su vez reflejo de composición química y estructural del catalizador y su selectividad. Ahora la fotocatalisis se refiere al proceso de catálisis pero con la absorción de luz por parte del

catalizador. Sin embargo, el proceso de fotocatalisis dependerá de la capacidad del catalizador para generar pares electrón-hueco (e^-h^+), y radicales hidroxilo que reaccionen con el medio en el que se aplique el material para desencadenar otras reacciones, (figura 2-19). A su vez, la capacidad para generar los pares e^-h^+ en el catalizador dependerá de su ancho de banda “prohibida” o como lo llamaremos de ahora en adelante band gap.

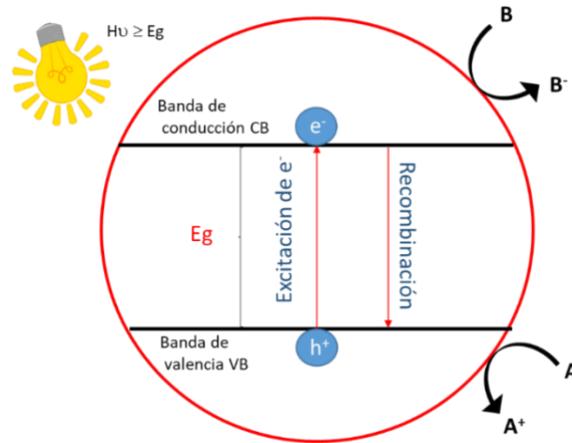


Figura 2-19. Esquema de proceso de fotocatalisis heterogénea. Elaboración propia

El bandgap es el lugar entre la banda de conducción y banda de valencia de un átomo donde no pueden haber estados electrónicos, en otras palabras, es la energía necesaria para mover un electrón de la capa de valencia unido a un átomo a la banda de conducción, también llamada E_g o “energy gap”. Cuando el e^- pasa de la capa de valencia a la de conducción, se convierte en un e^- de conducción, que es libre de moverse dentro de la red cristalina. Que tan grande sea el band gap de un material, determina su conductividad y también acción como catalizador bajo fotocatalisis.

Los materiales hechos con elementos conductores no tienen band gap, o es muy pequeño, mientras que los materiales aislantes tienen un band gap grande y los materiales semiconductores tienen un band gap intermedio entre los aislantes y los conductores. Ver figura 2-20.

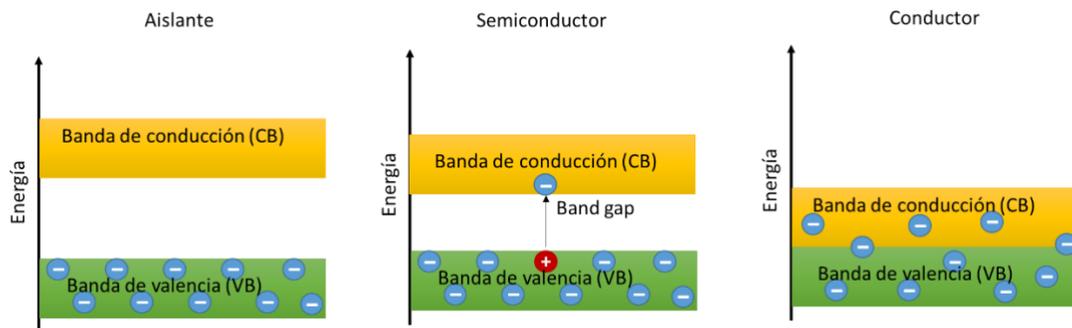


Figura 2-20. Esquema representativo de band gap en materiales conductores, semiconductores y aislantes 50.

Se han empleado diferentes materiales como fotocatalizadores (ZnO , Al_2O_3 , Fe_2O_3 , entre otros), sin embargo, el más investigado ha sido el TiO_2 , debido a su alta eficiencia, estabilidad química, bajo costo y disponibilidad⁵¹.

Cada material presenta un valor diferente de bandgap, a continuación se presentan los valores reportados en la literatura para diferentes materiales semiconductores que han tenido diferentes aplicaciones en la nanotecnología.

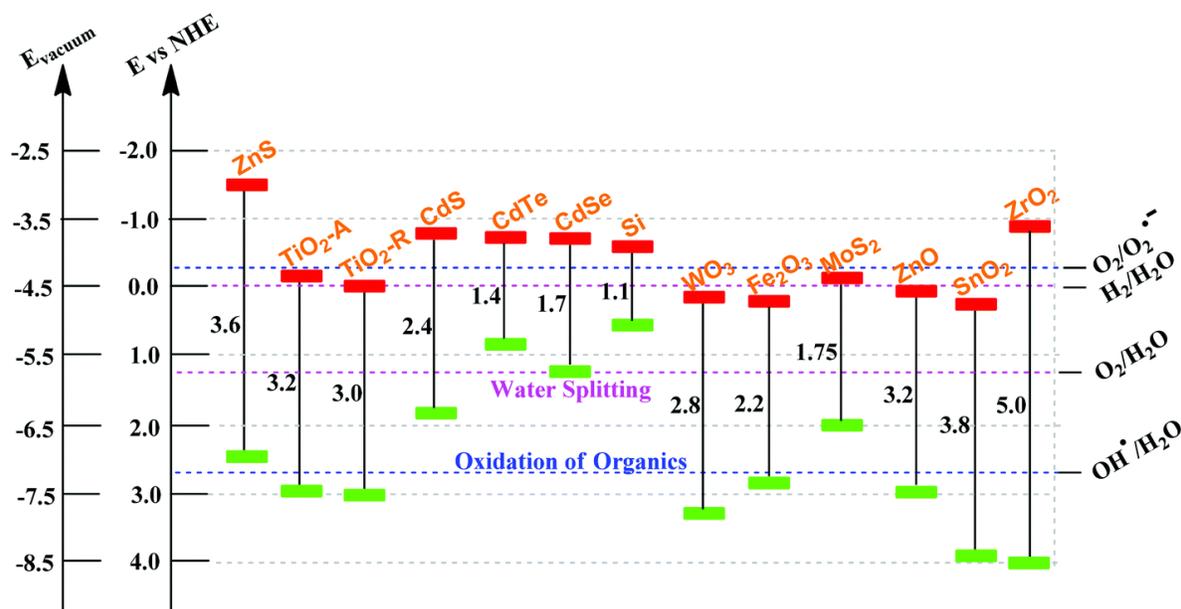


Figura 2-21. Band gap, banda de valencia (VB) y banda de conducción (CB) para diferentes semiconductores, y potenciales redox 52.

Como se observa en la gráfica anterior, es posible identificar cada band gap correspondiente a los materiales, así como la ubicación de la banda de valencia y de la banda de conducción. Es importante evidenciar donde se ubican estas bandas, ya que su ubicación permite identificar si el band gap se encuentra dentro de los intervalos de potenciales redox para la generación de radicales hidroxilo o superóxidos. El potencial de oxidación para los radicales hidroxilo es ($E_0(\text{H}_2\text{O}/\cdot\text{OH}) = 2.8 \text{ V vs. NHE}$) y el potencial de reducción para los radicales superóxido es ($E_0(\text{O}_2/\cdot\text{O}_2^-) = -0.28 \text{ V vs. NHE}$). Es decir, que el potencial redox de los huecos de la banda de valencia debe ser lo suficientemente positivo para producir radicales hidroxilo, mientras que los electrones CB deben ser suficientemente negativos para producir radicales superóxido⁵³.

Se busca realizar una síntesis con alto rendimiento para los NMs o NPs de óxidos metálicos, que se usan en fotocatalisis, cabe mencionar que estos materiales o partículas deben tener un bandgap angosto para que sean efectivos en fotocatalisis. Así

mismo, se debe poder facilitar la recuperación del material a partir de campos magnéticos externos y el material debe ser estable a temperatura ambiente, tal es el caso de los óxidos metálicos, que presentan grandes ventajas, como alta estabilidad y compatibilidad⁵². Para generar un hilo conductor entre los óxidos semiconductores y la fotocatalisis, es importante en primer lugar definir que los óxidos semiconductores se encuentran conformados por NPs, las cuales sufren confinamiento cuántico, es decir que a menor tamaño de grano de la partícula, menor será su bandgap y mayor su área superficial, por lo que la actividad fotocatalítica será mejor.

Ahora, la actividad fotocatalítica de los materiales, se refiere a la propiedad de un material sólido inducida por la irradiación de fotones con energía igual o superior a la energía de la banda prohibida (band gap) del material en su superficie, lo que provoca que los e- de la banda de valencia (VB) se exciten hacia la banda de conducción (CB) y dejen huecos en la primera. De esta manera, se generan pares electrón-hueco (e-h+) llamados excitones, que posteriormente llevan a cabo reacciones de reducción y oxidación ⁵⁴ que terminan generando especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) que, hasta el momento tal como se mencionó anteriormente, se ha empleado para la degradación de compuestos orgánicos.

A continuación se muestra un esquema que ejemplifica la actividad fotocatalítica de óxidos metálicos semiconductores en catálisis heterogénea en la degradación de contaminantes orgánicos.

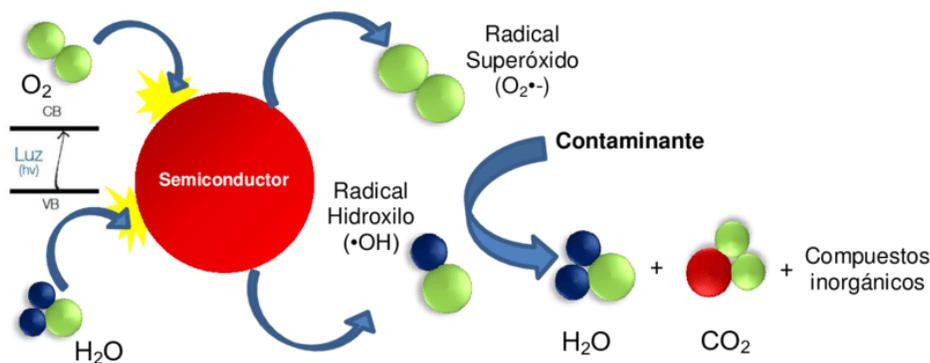


Figura 2-22. Esquema teórico de fotocatalisis heterogénea con materiales semiconductores en degradación de contaminantes orgánicos ⁵⁵.

El uso de fotocatalizadores compuestos por óxidos de hierro (magnéticos y semiconductores) obtenidos a partir de la combinación de NMs magnéticos de óxido de hierro con NMs semiconductores, es un método simple y efectivo para los procesos de fotocatalisis ⁵². Del mismo modo, los óxidos metálicos que tienen la fórmula AB_2O_4 y estructura cristalina cúbica centrada en las caras (fcc), son espinelas. En esta

estructura, se encuentran los enlaces tetraédricos para los cationes A_{2+} mientras que los cationes B_{3+} ocupan las posiciones octaédricas. Las espinelas que más se han empleado para aplicaciones en medios magnéticos, microondas, chips, materiales pigmentantes, entre otros, son las ferritas y cromitas, debido a sus propiedades catalíticas, eléctricas, ópticas y magnéticas. Asimismo cabe mencionar que las condiciones de síntesis de las ferritas inciden directamente en las características estructurales de las mismas, tales como los parámetros de red, la densidad, la porosidad y el tamaño de las nanopartículas⁵⁶.

Un ejemplo de aplicación de óxidos metálicos semiconductores aplicados en el campo ambiental son las magnetitas (Fe_3O_4), las cuales se han empleado para la separación de contaminantes del agua en remediación de aguas subterráneas, en especial para la eliminación de arsénico. Las magnetitas se inyectan directamente en el suelo contaminado y las partículas cargadas se pueden eliminar a través de un campo magnético, evitando así bombear el agua subterránea contaminada y su posterior tratamiento³⁴. Dado que las nanopartículas magnéticas se han empleado en aplicaciones médicas durante algún tiempo, y están aprobadas por la Administración de Medicamentos y Alimentos de los EE. UU. Como un agente de contraste para la resonancia magnética, ya se han realizado estudios exhaustivos de toxicidad in vitro / in vivo. Por lo tanto, se proporciona una extensa base de datos para la toxicidad de las nanopartículas magnéticas que ayuda a desarrollarlas y aplicarlas con una toxicidad mínima en los procesos de desinfección de agua potable y aguas residuales, adicionalmente es una gran ventaja el hecho de que se pueden recuperar con la aplicación de un campo magnético. ³⁴

2.10 Selección de ferritas como fotocatalizadores

Las ferritas han sido estudiadas por diferentes estudios e investigaciones por su capacidad para degradar contaminantes orgánicos. Tal como se ha mencionado anteriormente, en el presente documento se estudia la aplicación de estas NPs como agente antibacterial en las cepas bacterianas Gram positivas (*Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*) y Gram negativas (*Salmonella typhi* y *Escherichia coli*) de interés. Es decir, como fotocatalizadores en la inhibición de crecimiento celular de las cepas mencionadas bajo la presencia de luz visible. Como se mencionó previamente las ferritas son espinelas, que pueden ser normales o inversas, las cuales presentan la fórmula química AB_2O_4 , donde A es un catión con carga +2, mientras que B es un catión con carga +3. Para la presente investigación se emplean ferritas de zinc con fórmula $ZnFe_2O_4$, donde se encuentran los cationes Zn_{2+} y Fe_{3+} , y ferritas de hierro o también conocidas como magnetitas, con fórmula Fe_3O_4 , donde se encuentran los cationes Fe_{2+} y Fe_{3+} .

2.10.1 Ferritas de Zinc

Las ferritas en general, se encuentran compuestas por 96 sitios intersticiales, que corresponden a la presencia de átomos de oxígeno que se encuentran en una red cúbica ubicada en las caras (fcc). En las ferritas de zinc (espinelas normales), hay 64 puntos son de posición tetraédrica para los iones divalentes, donde se presenta el enlace Zn-O (enlace sp^3). Del mismo modo los iones trivalentes se encuentran en 32 posiciones octaédricas generando enlaces Fe-O. Sin embargo de todas estas posiciones, solo se encuentran ocupadas 24 posiciones (16 octaédricas por Fe^{3+} y 8 tetraédricas por Zn^{2+}), el resto de posiciones no ocupadas se encuentran libres para deposición o modificación de la superficie externa ⁵⁷. La deposición de metales tiende a atrapar electrones dentro de los sitios activos (estados de energía casi estables) lo que hace que la tasa de recombinación del par electrón-hueco se vuelva baja, y aumenta significativamente la transferencia de electrones a la molécula adsorbida para mejorar la eficiencia fotocatalítica. Por lo tanto, la actividad fotocatalítica de $ZnFe_2O_4$ o Fe_2O_4 podría mejorarse si se realiza de manera apropiada la deposición o mezcla adecuada de óxidos metálicos. A continuación se presenta esquemáticamente la espinela normal, y la ubicación de los cationes metálicos divalentes (M^{2+}), cationes metálicos trivalentes (M^{3+}) e ion oxígeno (O^{2-}).

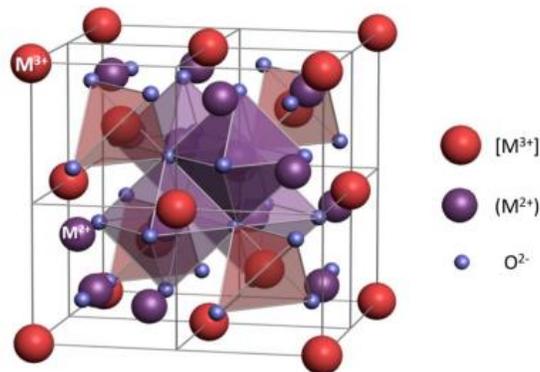


Figura 2-23. Esquema teórico de estructura de una espinela normal de ferritas⁵⁸

La posición de los espines dentro de las NPs magnéticas define el comportamiento magnético de las mismas, este comportamiento puede ser ferromagnético (FM) o antiferromagnético (AFM). Gracias a que los átomos de Zinc no son magnéticos, las ferritas de zinc tienen un comportamiento antiferromagnético, con una temperatura de Néel de 10 K (temperatura a la cual desaparece el efecto antiferromagnético de los materiales, y empiezan a comportarse como paramagnéticos) ⁵⁹. Sin embargo, cuando la ferrita está en tamaño nanométrico, aumenta el grado de inversión de la distribución catiónica, ya que ésta depende del tamaño de partícula. El hecho de que los cationes se reordenen permite que se generen subredes magnéticas internas, aumentando las interacciones entre sí, y por ende, la magnetización en las NPs en relación con el

material Bulk ⁶⁰. Esto se debe a efectos de superficie, los átomos superficiales de una nanopartícula inciden en los efectos de superficie e interfase. Las NPs presentan una gran área superficial donde los espines superficiales hacen una contribución importante a la magnetización ^{61 62}.

Se han reportado estudios que analizan la actividad antibacteriana de las ferritas de zinc en cepas Gram positivas y en cepas Gram negativas a partir de nanopartículas sintetizadas por métodos de coprecipitación, identificando que el material presenta actividad antibacteriana bajo luz solar ⁶³. Se presenta incremento de la reactividad de las NPs cuando aumenta la relación entre la superficie y el volumen de las mismas, lo cual es de particular importancia en los mecanismos de interacción con los sistemas biológicos.

Las ferritas además de ser química y térmicamente estables en sistemas acuosos, ofrecen la ventaja de tener un bandgap capaz de absorber la luz visible (cerca de 2 eV), así como la estructura cristalina espinela, la cual mejora la eficiencia debido a los sitios catalíticos adicionales disponibles gracias a su red cristalina. Lo que le ofrece una ventaja sobre aquellos materiales que tienen un bandgap más grande y que absorben luz ultravioleta. El bandgap y la longitud de onda son inversamente proporcionales, es decir que a menor bandgap, la longitud en la que absorben los materiales, será mayor, es decir que se encontrará en el espectro de luz visible; mientras que a mayor bandgap, como el caso del TiO₂ con un bandgap de 3.2 eV, éste absorberá energía en la región de luz ultravioleta. Por esta razón el uso de ferritas en la degradación de contaminantes (orgánicos e inorgánicos, tintes y bacterias) en el agua a través de la fotodegradación ha ganado mucho interés en los últimos años, y se han realizado diferentes estudios para identificar la actividad de éstas en la fotocatalisis bajo luz solar y luz artificial. Otra ventaja de usar ferritas son sus propiedades magnéticas. Los óxidos metálicos con Fe³⁺ son materiales altamente magnéticos y pueden ser separados fácilmente del medio de catálisis, mediante presencia de imanes externos ⁶⁴.

2.10.2 Ferritas de hierro o magnetitas

También existen espinelas inversas, donde la mitad de los cationes trivalentes se encuentran localizados en las posiciones tetraédricas, ocupándolas en su totalidad, mientras que los cationes divalentes ocupan la mitad de las posiciones octaédricas. Las ferritas de hierro o magnetitas son espinelas inversas, con relación estequiométrica de cationes (Fe³⁺)[Fe²⁺Fe³⁺]₂O₄, donde la mitad de los cationes Fe³⁺ ocupan la posición tetraédrica y el resto de cationes Fe³⁺ y Fe²⁺ ocupan las posiciones octaédricas ⁶². Caracterizaciones previas han reportado que la composición química corresponde a un 27,6% de O₂, y un 72,4% de hierro ⁶⁵. Estas nanopartículas se cristalizan en un sistema cúbico centrado en las caras (fcc). Presenta 56 átomos, de los cuales 32 son de oxígeno

y 24 son cationes de hierro (16 trivalentes Fe^{3+} en posiciones tetraédricas y 8 divalentes Fe^{2+}), del mismo modo en las posiciones octaédricas se encuentran cationes de Fe^{3+} y Fe^{2+} por igual⁶⁵. A continuación se muestra la representación esquemática de esta espinela con sus respectivos sitios intersticiales.

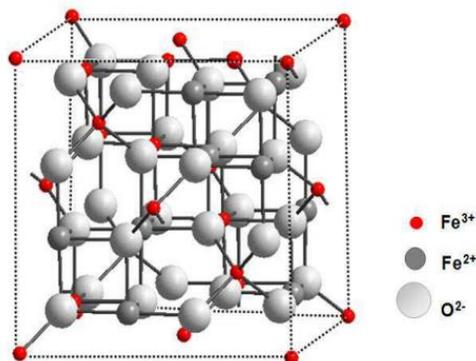


Figura 2-24. Esquema teórico de estructura de una espinela inversa de magnetitas⁶⁵

Las propiedades magnéticas de las magnetitas dependen mucho del tamaño de partícula. Cuando las partículas de este material se reducen a escala nanométrica sus propiedades magnéticas decaen: la magnetización de saturación (M_s), la remanencia magnética (B_r) y el campo coercitivo (H_c), lo que hace que se presente entonces un comportamiento superparamagnético, es decir que las NPs adquieren cierta magnetización cuando se aplica el campo magnético externo pero lo pierden cuando se quita el campo externo. Lo cual permitiría su recuperación por la aplicación campos magnéticos externos.

La nucleación y crecimiento de los cristales tanto de ferritas como de magnetitas en la dirección $[111]$ hace que las nanopartículas tengan una forma octaédrica, por lo que las ferritas de zinc y magnetitas tienden a tener esta morfología. Los octaedros regulares tienen energías de red cristalina bajas, por lo que resultan energéticamente favorables ⁶⁵. Sin embargo a través de diferentes metodologías de síntesis es posible controlar la morfología y tamaño de las NPs.

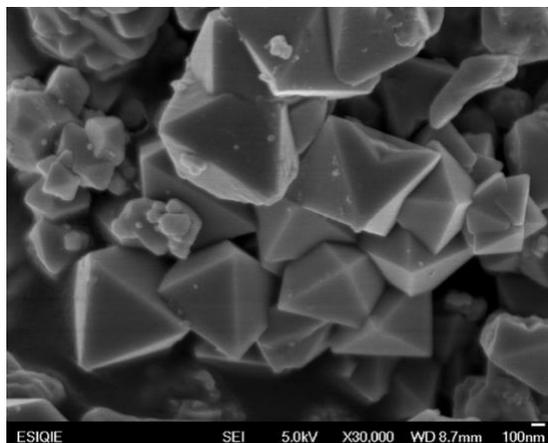


Figura 2-25. Octaedros de ferritas de zinc visualizados mediante Microscopía Electrónica de Transmisión. Magnificación 30,000X. Imagen propia

El tamaño de las NPs de los catalizadores influye en la actividad fotocatalítica en catálisis heterogénea. Es el mismo caso con las magnetitas, ya que a medida que las NPs disminuyen de tamaño, éstas presentan más sitios activos por la cantidad de átomos expuestos en la superficie del material ⁶⁵. Cuando se emplean catalizadores con diferentes fines, en los sistemas catalíticos homogéneos es muy difícil recuperar el catalizador, por lo que emplear sistemas heterogéneos (líquido-sólido), tal como se ha dicho previamente, ha sido una alternativa para recuperar los catalizadores, sin embargo el tamaño de partículas del sólido dificulta la separación del catalizador del medio, por lo que se busca entonces emplear sólidos con comportamiento magnético que permitan su recuperación del medio, con la posibilidad de reutilizarlos y que no tengan una gran pérdida de su actividad catalítica. Las magnetitas se han empleado en catálisis heterogénea por su comportamiento ferrimagnético o superparamagnético (cuando las partículas son nanométricas), fácil síntesis, posibilidad de funcionalización de su superficie, estabilidad durante las reacciones y baja toxicidad, entre otras ⁶⁵.

2.10.3 Actividad antibacterial en óxidos metálicos

La actividad antibacterial es la acción por la cual el crecimiento microbiano se inhibe o se destruye. A lo largo de los últimos años, se ha estudiado la actividad antibacterial ejercida por el óxido de zinc en diferentes microorganismos tanto en agua como en alimentos, debido a que ha sido considerado como un material seguro por la “Food and Drug Administration (FDA)” (21CFR182.8991) en Estados Unidos ⁶⁶.

A continuación se describe alguna de la información presentada en la literatura para el óxido de zinc, como referente existente de óxido metálico aplicado como agente antibacterial en cepas bacterianas de interés.

A lo largo de estos estudios se ha comprobado que el ZnO tiene potentes propiedades antibacteriales entre los diversos óxidos metálicos, e incluso se ha empleado en los revestimientos de diferentes envases de alimentos como latas y paquetes, para evitar su deterioro. Además, el ZnO es estable químicamente, lo que lo hace adecuado para aplicaciones antimicrobianas⁶⁷ y se ha reportado que estas NPs tienen selectividad tóxica a las bacterias, pero mínimo efecto en las células humanas ⁶⁸. Además se ha comprobado como material bioseguro que tiene la capacidad de foto-oxidar y fotocatalizar especies químicas y biológicas. ⁶⁹. Dentro de los factores que influyen en la actividad antibacteriana, está el tamaño de nanopartícula, donde a menor tamaño, aumenta la actividad antibacteriana del ZnO. Esto se atribuye al mayor volumen por proporción de superficie, que resulta en un medio más eficiente para la actividad antibacteriana⁷⁰. Concordante con lo mencionado, diferentes estudios han demostrado que a menor tamaño de partícula, se produce mayor daño a la membrana celular de la bacteria patógena. Tal es el caso, que Padmavathy y Vijayaraghavan, sometieron *Escherichia coli* a suspensiones de ZnO con diferentes tamaños de partícula, para finalmente demostrar que la suspensión con partículas más pequeñas fue más efectiva que la suspensión con partículas de mayor tamaño.⁷¹

Se ha reportado que la actividad antibacteriana del óxido de zinc es mayor en las bacterias Gram negativas que en las bacterias Gram positivas, la cual se lleva a cabo por medio de la interacción de las NPs de ZnO con diferentes componentes celulares de las bacterias. *Tayel* ⁷² investigó la actividad antibacteriana de las NPs de ZnO en nueve cepas bacterianas (Gram positivas y Gram negativas), que son en su mayoría, cepas patógenas transmitidas en los alimentos. Se encontró que las bacterias Gram negativas eran más susceptibles a las NPs de ZnO, debido a su estructura de membrana celular más delgada. También se supuso que la membrana celular de las bacterias Gram positivas al ser más gruesa puede evitar la penetración de las NPs de ZnO en las células y su posterior interacción con los componentes internos de las bacterias. Entre las cepas examinadas, *Bacillus cereus* fue la más sensible, mientras que la más resistente fue *Pseudomonas spp.* Por otro lado, tras exponer *S. aureus* a las NPs de óxido de zinc durante 2 horas se presentó lisis celular, y la desaparición completa ocurrió después de 4 horas de exposición. Estos resultados muestran que el óxido de zinc es un buen agente antibacteriano contra los microorganismos patógenos transmitidos por alimentos, y que es bioseguro ⁶⁷. Es importante mantener en el panorama que la actividad antibacteriana de las NPs depende de sus propiedades fisicoquímicas y de las bacterias donde se implementan éstas. Aunque la concentración del material es un factor importante, el tamaño de las partículas, especialmente a escala nanométrica, es un factor determinante en la actividad antibacteriana, incluso más que la concentración ⁷³.

2.11 Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) y mecanismo de acción antibacteriana por acción de óxidos metálicos.

Las NPs tienen propiedades físicas y químicas únicas que las hacen apropiadas para diferentes aplicaciones. El cambio estructural de algunas NPs metálicas les permite desempeñar diferentes funciones en el área biológica, debido a la capacidad de formar especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés). La cantidad de ROS producidas por las NPs está correlacionada con el tamaño, forma, área superficial y composición química. Las ROS generadas por nanopartículas metálicas tienen varias funciones en la biología celular, jugando un papel clave en la toxicidad a las mismas, debido a los daños que causan a la membrana celular. Asimismo las ROS interfieren en la modulación de la señalización celular involucrada en la muerte, proliferación y diferenciación celular ⁷⁴. Dichas características han dado un panorama más amplio para usar las NPs metálicas en diferentes aplicaciones médicas y biológicas. Por otro lado y para el interés de la presente investigación, cabe mencionar que, la mayoría de los NMs basados en NPs metálicas presentan toxicidad en diferentes células bacterianas, debido a la formación de radicales libres, ROS, y reacciones tipo Fenton (para el caso de las magnetitas) con la presencia del catión Fe^{2+} ⁷⁵.

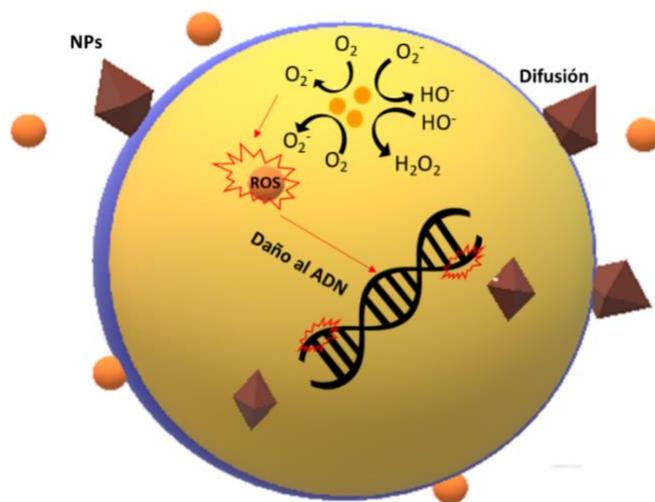


Figura 2-26. Representación gráfica de acción de ROS al interior de la célula.
Elaboración propia.

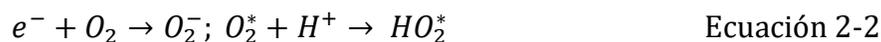
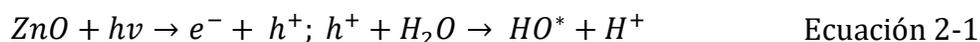
El menor tamaño de las NPs brinda mayor área de superficie y masa, lo cual a su vez regula el número de sitios reactivos en la superficie de las NPs. ^{76 77}. Por ejemplo, las NPs más pequeñas generan alteraciones en las propiedades electrónicas de las partículas, formando así, grupos reactivos en su superficie ^{78 79}. Los NMs presentan efectos de confinamiento cuántico debido a la presencia de momentos magnéticos que

no se presentan en los materiales Bulk. Comparados con sus materiales bulk originales, los átomos localizados en la superficie de las NPs tienen menos átomos vecinos, lo que contribuye a disminuir la energía de enlace de cada átomo ⁸⁰.

Algunas NPs activadas bajo energía fotónica (radiación UV o radiación por luz visible) como NPs de TiO₂ y puntos cuánticos (QDs), producen electrones⁸¹ que poseen energía capaz de convertir O₂ en •O₂, el cual influye en el daño celular mediante interacciones con los ácidos nucleicos, proteínas y lípidos. ⁸² Asimismo se han presentado resultados previos para nanopartículas metálicas que producen estrés oxidativo mediante las reacciones Fenton y Haber-Weiss, las cuales representan reacciones con iones metálicos oxidados y H₂O₂ para producir HO•. ⁷⁴

Para entender el mecanismo de fotoactividad en los óxidos metálicos y su actividad antibacterial, se presenta el mecanismo de reacción bajo luz UV de las nanopartículas de óxido de zinc en medio acuoso y al aire. La actividad antibacterial de las NPs de ZnO implica la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) de la superficie del ZnO que causan daños letales a los microorganismos. Como se ha mencionado, las ROS causan estrés oxidativo al dañar el ADN, las membranas y las proteínas celulares. La ruptura de la pared celular se debe a la actividad superficial del ZnO que causa la descomposición de la pared celular y, posteriormente, la membrana celular, causando la salida o liberación de contenidos celulares y, finalmente, la muerte celular ^{71, 83}.

El mecanismo fue presentado por Padmavathy y Vijayaraghavan ⁷¹ de la siguiente manera:



Las NPs de ZnO se activan bajo luz UV (gracias a los fotones), y se crean pares electrón-hueco (e-/h+). Estos huecos (h+) reaccionan con el medio acuoso en el que se encuentra el material, para producir el primer radical superóxido: •OH (hidroxil) e H+. Mientras que el electrón (e-) que ahora está en la banda de conducción del ZnO reacciona con el oxígeno atmosférico, oxidándolo y transformándolo en radical aniónico súper oxidante (•O₂-), que a su vez reaccionan con H+ para generar el radical hidroperoxilo (-HO₂). Luego, por un choque de electrones, se generan aniones hidroperoxido (HO₂-). Los cuales posteriormente reaccionan con los iones de hidrógeno para producir de H₂O₂. El H₂O₂ generado puede penetrar la membrana celular y matar a las bacterias.

Dado que, los radicales hidroxilo y los súper óxidos son partículas cargadas negativamente, no pueden penetrar en la membrana celular y deben permanecer en contacto directo con la superficie externa de la bacteria; sin embargo, el H_2O_2 puede penetrar en la célula. 71 84

Por otro lado se han explorado los fotocatalizadores altamente activos que funcionan en la región de luz visible debido a su bandgap estrecho 85. Las nanopartículas de ferritas se han empleado en diferentes aplicaciones electrónicas, magnéticas y para catálisis. Dentro del grupo de ferritas, las NPs de ferritas de zinc ($ZnFe_2O_4$) y magnetitas (Fe_3O_4) llaman la atención, porque presentan un comportamiento magnético dependiente del tamaño de las NPs 86. Estas NPs tienen una considerable fotorespuesta en la región de luz visible con un bandgap cercano a 2eV, con buena estabilidad fotoquímica, sugiriendo así, su aplicación en fotocatalisis. Además, teniendo en cuenta que el tamaño de las ferritas de zinc es un factor importante con respecto a las propiedades que presenta el material, se han implementado diferentes técnicas para la obtención de las NPs en escala nanométrica, incluyendo técnicas de co-precipitación, hidrotermal y sol-gel.

También se ha estudiado la potenciación de la actividad catalítica de las NPs de $ZnFe_2O_4$ adicionando H_2O_2 en el medio de reacción, para que se lleve a cabo un sistema tipo fenton 87 88. La acción de las NPs bajo luz visible y en presencia de H_2O_2 se presenta de manera esquemática a continuación:

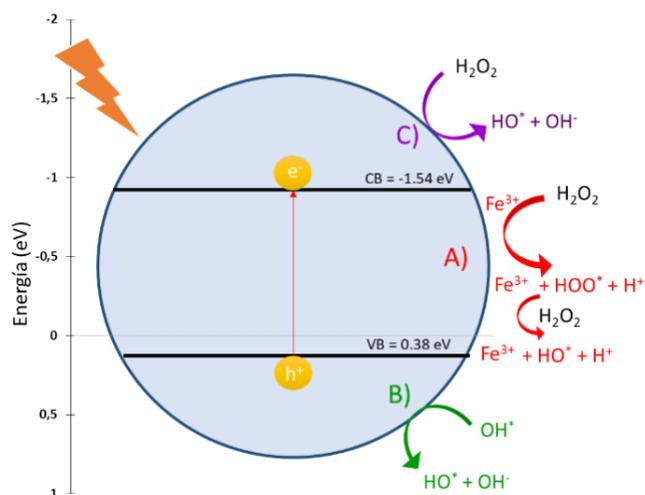
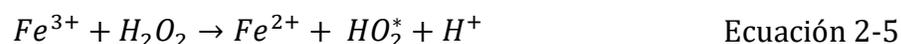


Figura 2-27. Esquema de generación de radicales $\cdot OH$ por acción de $ZnFe_2O_4$ bajo luz visible a partir de reacción Fenton. Elaboración propia.

En el esquema anterior se evidencia que la actividad fotocatalítica para producir radicales hidroxilo, se presenta en tres formas: (A) Debido a la presencia de H_2O_2 en el medio, los iones de hierro Fe^{3+} o $Fe(III)$ de la superficie de las NPs de $ZnFe_2O_4$ pueden

iniciar reacciones que producen radicales $\cdot\text{OH}$ por medio de la reacción fenton. (B) La banda de valencia (VB) de las ferritas de zinc está localizada a 0.38 eV aproximadamente, mientras que la banda de conducción (CB) está a -1.54eV, es decir que hay un bandgap de 2.34 eV. En la presencia de luz, los par electrón-hueco producidos pueden oxidar moléculas de contaminantes o también oxidar el agua a radicales $\cdot\text{OH}$. (C) La captura de electrones produce radicales $\cdot\text{OH}$. 88

Para las NPs de ferritas de hierro o magnetitas, el mecanismo de producción de especies reactivas de oxígeno en presencia de H_2O_2 , sigue el proceso de reacción fenton 89. Dicho proceso se describe como un proceso de oxidación avanzada en donde se producen radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$.) altamente reactivos. A continuación se presentan las fórmulas que explican la reacción:



2.11.1 Nanopartículas de plata

La plata ha sido estudiada como agente antibacteriano contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. En estudios previamente realizados y publicados, se reporta que la actividad antibacteriana de las NPs de Ag depende de la liberación de iones Ag^+ de la superficie de las nanopartículas, y de procesos físicos causados por los nanomateriales en los que se encuentren soportadas las NPs de Ag, traduciéndose en daño a la membrana celular, penetración en el citoplasma de la célula e interferencia en la replicación del ADN 90. Adicionalmente, las NPs tienen gran área y actividad superficial hacen que sean un excelente catalizador en reacciones catalíticas heterogéneas 91. Se ha demostrado que el efecto antibacteriano es más efectivo en las bacterias Gram negativas que en las bacterias Gram positivas, lo que se atribuye al grosor de la capa de peptidoglicano entre los 20 y 80nm en las Gram positivas, y de solo 2-7 nm en las Gram negativas. Además, teniendo en cuenta que la membrana celular de las bacterias tiene

carga negativa debido a la presencia de grupos carboxilo, fosfato y amino; la carga positiva de los iones de Ag liberados, genera atracción electrostática entre las NPs de Ag y la carga negativa de la membrana celular de los microorganismos. Lo que facilita la adhesión de las NPs a las membranas celulares y su posterior ingreso a la célula, provocando la liberación del contenido celular, daños en las proteínas internas de la célula, daño en el ADN y muerte celular ⁹². A continuación se presenta el esquema de mecanismo de acción antibacterial de las NPs de plata.

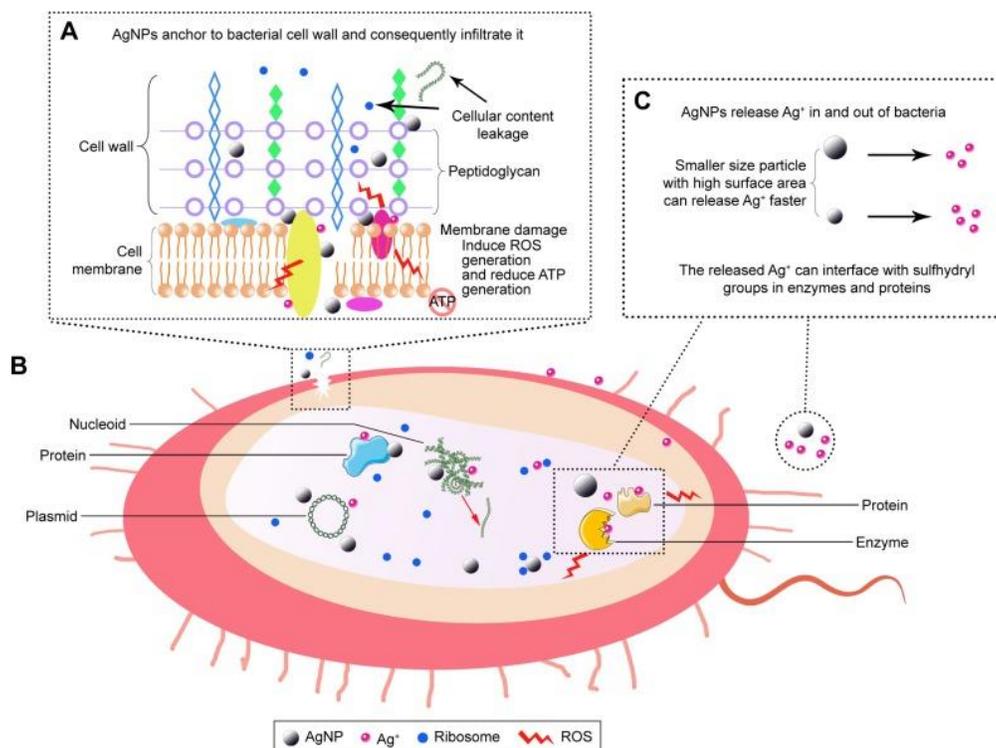


Figura 2-28. Esquema de mecanismo de acción antibacterial de las NPs de plata en bacterias ⁹².

Se han estudiado diferentes métodos de síntesis para las nanopartículas de plata, dependiendo de la morfología que se quiera obtener, tamaño y aglomeración. La forma más común de obtener NPs de Ag es a partir de la reducción química de compuestos orgánicos e inorgánicos, empleando reductores tales como citrato de sodio, ascorbato, borohidruro de sodio (NaBH₄), entre otros. Estos agentes reductores reducen el Ag⁺ y conducen a la formación de plata metálica (Ag₀), que es seguida por aglomeración en grupos oligoméricos⁹³. Estos grupos eventualmente conducen a la formación de partículas metálicas de plata coloidal ⁹⁴. La presencia de tensoactivos tales como tioles, aminas, ácidos y alcoholes es útil para las interacciones con las superficies de las NPs, ya que puede estabilizar el crecimiento de las mismas y evitar su sedimentación, aglomeración o pérdida de sus propiedades superficiales ⁹⁵.

3 Capítulo: Justificación

Los procesos de desinfección en agua contaminada con microorganismos patógenos tales como cloración y ozonificación son eficientes y ampliamente usados a escala industrial y como paso previo al almacenamiento y distribución del agua potable y agua residual tratada en sistemas de tratamiento convencionales, como los que se presentan en la mayoría de ciudades en Latinoamérica y el caribe ⁹⁶; sin embargo, aunque estos procesos son efectivos y generan un efecto residual, en México cerca del 5% de la población nacional no tiene acceso la red de distribución de agua, por lo que en algunos casos, esta población tiene que tomar el recurso hídrico de otras fuentes, donde no se garantiza la calidad del agua, pudiéndose presentar contaminación por microorganismos patógenos que producen enfermedades diarreicas agudas al ser humano, y en el peor de los casos la muerte. Por tanto, se hace necesario pensar en alternativas que permitan la inhibición de crecimiento celular en agua contaminada por microorganismos patógenos. En este contexto, ha surgido el uso de NMs basados en NPs de óxidos metálicos tales como el ZnO para procesos de actividad antibacteriana a pequeña escala, basándose dicha actividad en procesos de generación de radicales súper oxidantes de la superficie de las NPs a partir de absorción de luz UV (debido a un bandgap de 3.2 eV), sin embargo, el emplear luz UV no resulta práctico en todos los casos, ya que hay que usar lámparas UV para la activación del material. Por lo que es necesario entonces, desarrollar nuevos NMs basados en óxidos metálicos, que sean fotocatalíticos y presenten actividad antibacteriana en los microorganismos patógenos de interés, debido a la generación de especies reactivas de oxígeno. Que tengan amplia área superficial y estructura química AB_2O_4 , siendo A un ion divalente (Zn^{2+} o Fe^{2+}) y B el ion Fe^{3+} . Que a su vez presenten un band gap menor al band gap del ZnO, es decir que se activen en la región de luz visible; ampliando así el campo de aplicación de los mismos, permitiendo activar los mismos mediante luz de foco convencional. Debido a estudios previos alrededor del mundo, se han logrado establecer diferentes metodologías de síntesis de NPs, controlando el tamaño, morfología e incluso la estructura de las mismas, de acuerdo a la aplicación para la cual se estén sintetizando. También se ha estudiado la actividad antibacterial de la plata a partir de la formación de iones Ag^+ , y con esto, las metodologías para sintetizar y realizar dopaje de NPs Ag en la superficie de NMs para mejorar su actividad antibacterial. Asimismo, se ha identificado que para facilitar el proceso de separación de los catalizadores en las reacciones, se prefiere emplear catalizadores sólidos que bajo la acción de campos magnéticos externos se puedan separar del medio de reacción. En este sentido, el presente trabajo se enfoca en la síntesis y dopaje con Ag de NMs de ferritas de zinc ($ZnFe_2O_4$) y magnetitas (Fe_3O_4), identificación y análisis de las propiedades físicas y químicas de los NMs a partir de la caracterización por diferentes técnicas instrumentales, su aplicación en las cepas bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Bacillus*

cereus, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, identificación del mecanismo de reacción basado en la actividad fotocatalítica de los nanomateriales bajo luz visible y análisis de los efectos del dopaje en la actividad antibacteriana.

3.1 *Objetivo general*

Evaluar la desinfección de agua contaminada con microorganismos patógenos empleando diferentes NPs activadas por luz visible, a nivel laboratorio.

3.2 *Objetivos específicos*

- Sintetizar NPs de $ZnFe_2O_4$ y Fe_3O_4 mediante la técnica hidrotermal.
- Caracterizar física y químicamente los materiales de $ZnFe_2O_4$ y Fe_3O_4 previamente sintetizados mediante técnicas instrumentales de alta definición.
- Dopar las NPs de $ZnFe_2O_4$ y Fe_3O_4 con plata a partir de procesos de reducción química.
- Aislar las cepas bacterianas Gram positivas: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, y Gram negativas: *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, en medios de cultivo selectivos a cada una.
- Determinar la efectividad antibacteriana de los NMs sintetizados y dopados, en las diferentes cepas bacterianas aisladas, mediante estudios de variación de concentración de los NPs sintetizados, y su visualización en microorganismos.

3.3 *Hipótesis*

Si las NPs de $ZnFe_2O_4$ y Fe_3O_4 dopadas y sin dopaje con NPs de Ag presentan acción antibacteriana bajo luz visible artificial sobre las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*; entonces se podrán emplear focos convencionales para la inhibición de crecimiento bacteriano en agua contaminada con éstos patógenos.

3.4 *Alcances*

Para el desarrollo del presente trabajo se sintetizan cuatro NMs para identificar su toxicidad en cuatro cepas bacterianas distintas, a escala laboratorio. Se sintetizaron los siguientes NMs de óxidos metálicos mediante la técnica hidrotermal descrita en la metodología experimental: $ZnFe_2O_4$, Fe_3O_4 , y doparon de acuerdo a lo descrito en la metodología experimental con Ag, obteniendo los siguientes NMs: $ZnFe_2O_4$ -Ag y Fe_3O_4 -Ag. Para su caracterización de los NMs y la identificación de sus características físicas y químicas, con finalidad de evidenciar su aplicabilidad sobre las cepas bacterianas de interés, se emplearon las siguientes técnicas:

- XRD – Difracción de rayos X
- TEM – Microscopía electrónica de transmisión
- HRTEM - Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución
- SEM - Microscopía electrónica de barrido
- FTIR – Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier
- XPS – Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X
- VSM –Magnetometría de muestra vibrante
- ICP – Plasma de acoplamiento inductivo (ICP)
- UV – Vis

Para la implementación de los NMs, se usaron cepas bacterianas aisladas en medios de cultivo específicos, tal como se evidencia a continuación:

Tabla 3-1. Cepas Bacterianas aisladas y medios de cultivo específicos.

Bacteria	Medio de cultivo selectivo
<i>Staphylococcus aureus,</i>	TECRA Staph Growth Media
<i>Bacillus cereus,</i>	Müller-Hinton
<i>Escherichia coli,</i>	EMB Levine (Eosina Azul de Metileno)
<i>Salmonella typhi</i>	SS (<i>Salmonella-Shigella</i>)

- MIC – Concentración mínima inhibitoria

Para identificar las mínimas concentraciones a las cuales los NMs resultan tóxicos a las bacterias de interés, se empleó ésta técnica, poniendo en contacto directo el NM sintetizado y las cepas aisladas.

- Microscopía confocal

Para evidenciar la distribución dentro de los microorganismos de los NMs previamente sintetizados, se empleó esta técnica.

- VSM – Magnetometría de muestra vibrante

Para evidenciar la posibilidad de recuperar el material empleado en la desinfección se empleó esta técnica, identificando el comportamiento magnético de los NMs empleados

4 Capítulo: Metodología

En el marco de identificar el mecanismo de inhibición de crecimiento celular en las bacterias de interés debida a la acción de los NMs, fue necesario identificar la síntesis de NPs más apropiada para la obtención de octaedros (como morfología deseada); así como tamaño de partícula, definiendo la técnica hidrotérmica como el método de síntesis elegido tanto para ferritas como para magnetitas. Por otro lado, para identificar las propiedades físicas y químicas de los NMs sintetizados se emplearon diversas técnicas de caracterización en las NPs sintetizadas, tales como XRD, TEM, HRTEM, SEM, XPS, FTIR, VSM, ICP, las cuales permitieron identificar con mayor detalle las propiedades de los NMs realizados. Gracias a estos resultados fue posible identificar el mejor nanomaterial obtenido para las ferritas de zinc, y con esto estandarizar el procedimiento de síntesis de las NPs, además de correlacionar las propiedades físicas y químicas de los NMs con la actividad fotocatalítica de cada uno. Con la síntesis estandarizada para ZnFe_2O_4 , se procedió a identificar el mejor porcentaje de dopaje con NPs de Ag, en relación peso/peso (w/w) (% entre el material sintetizado y la plata); se realizaron diferentes porcentajes de dopaje con Ag, de acuerdo a valores previamente reportados para Au ⁹, y se procedió a caracterizar nuevamente el material para identificar el porcentaje de dopaje con plata donde se mostraba mejor distribución y adhesión de las NPs de plata en la superficie del material de ZnFe_2O_4 . Al identificar que el 2% (w/w) de Ag fue el mejor porcentaje de distribución se procedió a dopar a este porcentaje en las magnetitas, y caracterizar el material.

Continuando con el objetivo de identificar la concentración a la cual se presenta inhibición de crecimiento celular en las cepas de interés por acción de los nanomateriales dopados y no dopados, se procedió a solicitar las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhi* y *Escherichia coli* al Cepario de la UNAM de la Facultad de Química, y posteriormente se sembraron y aislaron mediante metodologías de microbiología estandarizadas. Con dichas cepas se procedió a identificar la concentración mínima de los NMs a la cual los microorganismos no presentan crecimiento celular, con base en metodologías planteadas previamente ¹⁰. Finalmente todos los resultados experimentales fueron realizados por triplicado y corroborados con las caracterizaciones de los materiales.

4.1 Metodología Experimental

A continuación, se presenta de manera esquemática y general la metodología experimental seguida para dar cumplimiento a los objetivos específicos de la investigación.

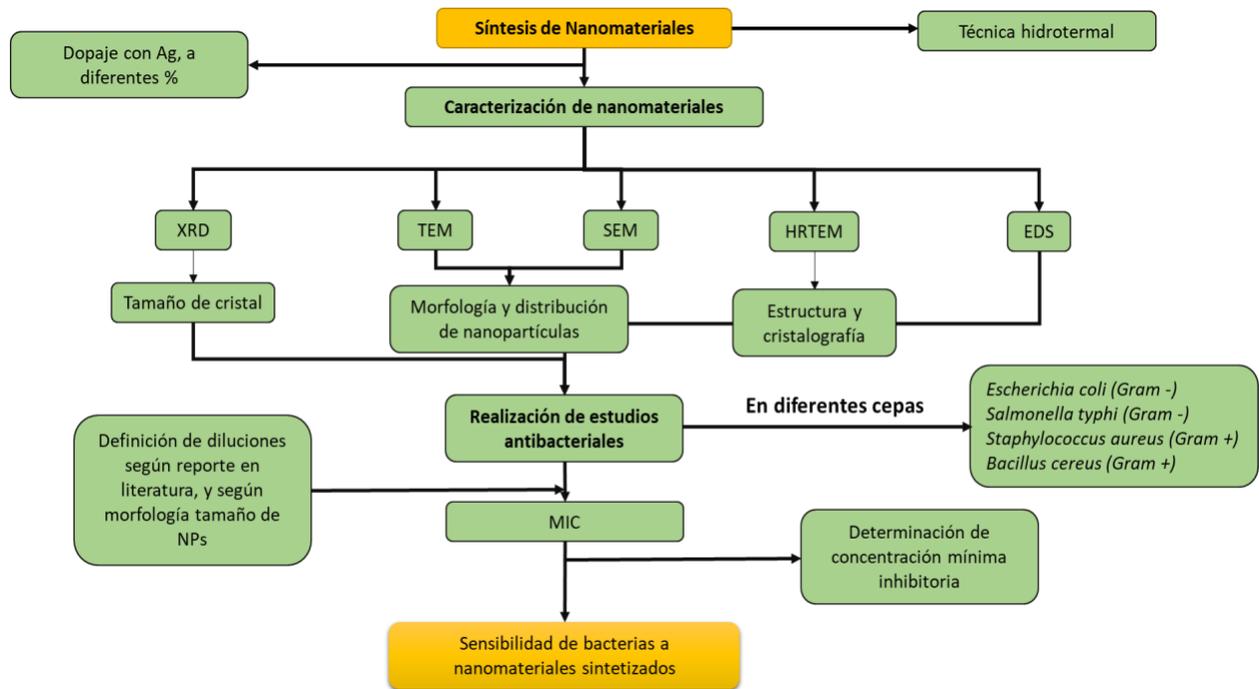


Figura 4-1. Diagrama de metodología experimental empleada en la presente investigación.

4.1.1 Preparación de nanopartículas

A continuación, se describe la técnica hidrotermal estandarizada empleada para la síntesis de las ferritas de zinc y magnetitas de acuerdo a metodologías de síntesis reportadas previamente en otros estudios.

4.1.1.1 Preparación nanopartículas ferritas de zinc (ZnFe_2O_4)

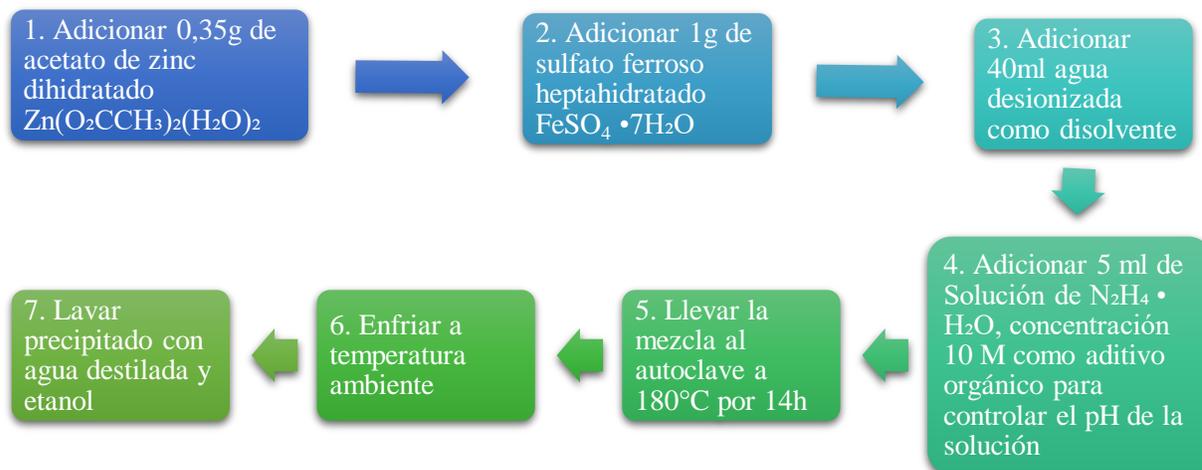


Figura 4-2. Diagrama de metodología experimental preparación nanopartículas ferritas de zinc

La preparación de NPs de ZnFe_2O_4 se realizó de acuerdo con el procedimiento experimental reportado y descrito por *Xing, et al* [29]. En una síntesis típica se empleó 1.00g de acetato de zinc dihidratado (0.43 g of $\text{Zn}(\text{OAc})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1.95 mmol)) y sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (3.59 mmol)) los cuales fueron disueltos en 40 mL de agua desionizada. Más adelante, se adicionaron 5 mL de una solución de hidracina hidratada con concentración 10M como aditivo orgánico para controlar el pH de la solución ^{67, 97}. La mezcla fue inmediatamente transferida dentro de un reactor hidrotérmico de teflón de 50 mL el cual se selló y se introdujo en el horno a 180°C por 14h. Una vez culminado el tiempo de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente. Las nanopartículas fueron aisladas por decantación en presencia de un imán, lavadas varias veces con mezclas de etanol y agua (agua: etanol 1:1, agua: etanol 1:3 y 100% etanol) y centrifugadas a 6000 rpm durante 15 min. Finalmente el sobrenadante se removió y el material se secó en el horno a 60°C durante 13h, obteniendo un rendimiento aproximado de 390 mg (19,1% Zn y 47,8% Fe).

4.1.1.2 Preparación nanopartículas magnetitas (Fe_3O_4)

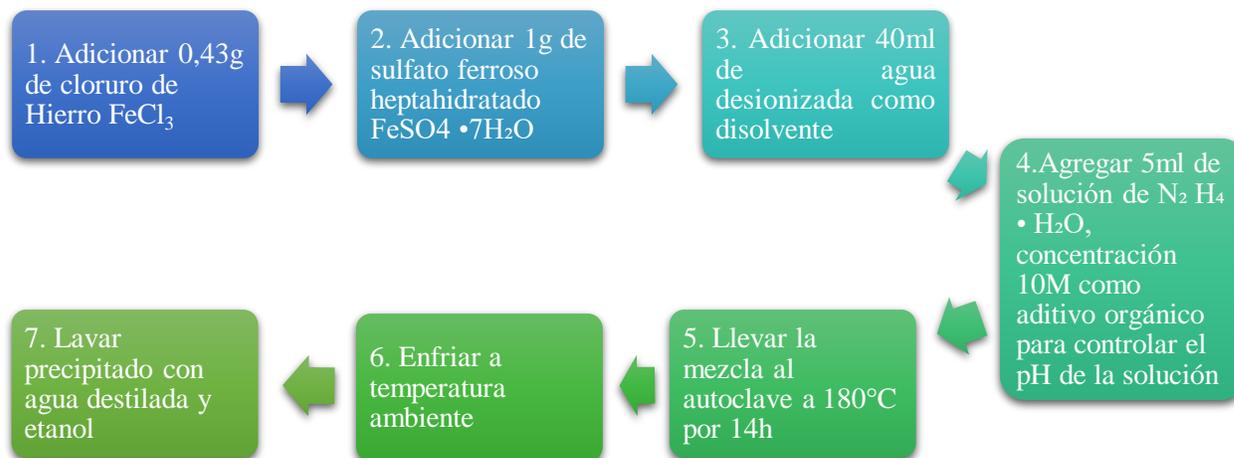


Figura 4-3. Diagrama de metodología experimental preparación nanopartículas ferritas de zinc

Estas NPs se realizan por medio de co-precipitación química, el cual es un método que consiste en mezclar en una disolución acuosa con sales de Fe^{+3} y Fe^{+2} , a temperaturas elevadas. Una vez que se establecieron las condiciones de síntesis, las NPs fueron reproducibles ⁹⁸.

La preparación de magnetitas (Fe_3O_4) se realizó de acuerdo con una modificación del procedimiento reportado por *Xing, et al* [29] reemplazando el precursor acetato de zinc dihidratado por cloruro de hierro (FeCl_2). En una síntesis típica se empleó 1.00g de acetato de zinc dihidratado (0.32 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1.60 mmol)) y sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (3.59 mmol)) los cuales fueron disueltos en 40 mL de agua desionizada. Más adelante, se adicionaron 5 mL de una solución de hidracina hidratada con concentración 10M como aditivo orgánico para controlar el pH de la solución ^{67, 97}. La mezcla fue inmediatamente transferida dentro de un reactor hidrotérmico de teflón de 50 mL el cual se selló y se introdujo en el horno a 180°C por 14h. Una vez culminado el tiempo de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente. Las nanopartículas fueron aisladas por decantación en presencia de un imán, lavadas varias veces con mezclas de etanol y agua (agua: etanol 1:1, agua: etanol 1:3 y 100% etanol) y centrifugadas a 6000 rpm durante 15 min. Finalmente el sobrenadante se removió y el material se secó en el horno a 60°C durante 13h, obteniendo un rendimiento aproximado de 410 mg (72,6% Fe).

4.1.2 Dopaje de nanopartículas con Ag

Las NPs de ferritas de zinc fueron dopadas a diferentes porcentajes en relación peso/peso (%w/w) (tal como se muestra en la Tabla 4-1, empleando el método reportado por *Huerta et al* 99. En un procedimiento típico se emplearon 40 mg de NPs de $ZnFe_2O_4$ suspendidas en 50 mL de etanol y agitadas durante 10 min a 4°C en ausencia de luz. Posteriormente, se adicionó lentamente el volumen correspondiente (de acuerdo al dopaje) de una solución de nitrato de plata ($AgNO_3$) concentración 2mM lentamente en el centro del vortex producido por la agitación magnética. La solución se mantuvo en agitación durante 10 min, y se agregó el volumen de borohidruro de sodio ($NaBH_4$), correspondiente a cada dopaje para mantener la relación 1: 1.3 entre el $AgNO_3$ y el $NaBH_4$, con concentración 10mM. La reacción se dejó en agitación por 10 min más, y el material fue removido por decantación en presencia de un imán y secado en el horno a 60°C durante 12h.

Tabla 4-1. Volúmenes empleados para diferentes porcentajes de dopaje con plata al nanomaterial de ferritas de zinc ($ZnFe_2O_4$).

Masa de $ZnFe_2O_4$ NPs (mg)	Porcentaje de dopaje (%w/w)	Volumen de $AgNO_3$ [2mM] (ml)	Volumen de $NaBH_4$ [10 mM] (ml)
40	1.0	1.18	1.53
	1.5	1.77	2.30
	2.0	2.36	3.10
	2.5	2.95	3.84

Se repitió el mismo procedimiento experimental mencionado previamente para el dopaje al 2% para el material de magnetitas (Fe_3O_4 NPs), teniendo en cuenta que a este porcentaje se obtuvo el mejor dopaje (tal como se presenta en la sección: Caracterización de nanomateriales sintetizados 5.2). El procedimiento se describe a continuación. Se emplearon 40 mg de magnetitas (NPs de Fe_3O_4) suspendidas en 50 mL de etanol y agitadas durante 10 min a 4°C en ausencia de luz. Posteriormente, se adicionaron lentamente 2.36 mL de una solución de nitrato de plata ($AgNO_3$) concentración 2mM en el centro del vortex producido por la agitación magnética. La solución se mantuvo en agitación por 10 min y se agregaron 3.10 mL de borohidruro de sodio ($NaBH_4$) concentración 10 mM. La reacción se dejó en agitación 10min más y el material fue removido por decantación en presencia de un imán y secado en el horno a 60°C durante 12h.

A continuación, se presenta la tabla de iones presentes en los nanomateriales sintetizados, así como los porcentajes de dopaje con Ag.

Tabla 4-2. Composición iónica de nanomateriales sintetizados y porcentaje de dopaje

Nanomaterial	Relación estequiométrica (% peso/peso)			
	Zn ²⁺	Fe ²⁺	Fe ³⁺	Ag _z
Fe ₃ O ₄	0	1	2	Z = 2.0%
ZnFe ₂ O ₄	1	0	2	Z = 1%
				Z = 1.5%
				Z = 2%
				Z = 2.5%

4.2 Caracterización de nanomateriales (NMs)

Para poder evidenciar la estructura, composición, área superficial y propiedades químicas de los nanomateriales sintetizados y dopados, se emplearon las técnicas de caracterización más implementadas a nivel mundial aplicables al presente objeto de estudio, tal como se describen a continuación. Con los resultados obtenidos, entender la relación entre las propiedades del nanomaterial como catalizador y el proceso de desinfección como actividad fotocatalítica. Para dichas caracterizaciones, se emplearon los servicios de La Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI) de la facultad de química, y los servicios del Laboratoire de Physique et Chimie des Nano-objets del Institut National des sciences appliquées.

4.2.1 XRD – Difracción de rayos X

La Difracción de Rayos X se empleó como el método más exacto y completo para determinar la identidad y estructura de los nanomateriales sintetizados y dopados, identificando la cristalinidad de los nanomateriales y tamaño de cristalito con el equipo de difracción Bruker D8 usando la radiación ($\lambda = 1.5406$ nm).

4.2.2 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Debido a que un haz de electrones de alta energía se proyecta a través de la muestra muy delgada, y las interacciones entre los electrones y los átomos se pueden usar para observar características como la estructura cristalina y características en la estructura como dislocaciones y límites de grano¹⁰¹; se empleó esta técnica para estudiar la morfología octaédrica de los nanomateriales sintetizados, con el equipo JEOL 2010 FEG TEM. Las gradillas de TEM fueron preparadas por deposición de una gota de etanol con NPs en suspensión en una gradilla de cobre con carbón amorfo.

4.2.3 Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución (HRTEM)

Esta técnica permite obtener imágenes mediante el microscopio electrónico de transmisión a partir de la estructura cristalográfica de una muestra en una escala atómica, ¹⁰² se empleó esta técnica para visualizar la estructura y crecimientos en caras cristalinas de los nanomateriales sintetizados. Se empleó el mismo equipo que se usó para el TEM.

4.2.4 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

El Microscopio electrónico de barrido o SEM (Scanning Electron Microscopy), utiliza un haz de electrones en lugar de un haz de luz para formar una imagen ampliada de la superficie de un objeto. Esto permite observar y caracterizar superficialmente sólidos de origen orgánico o inorgánico. Para visualizar los nanomateriales sintetizados y dopados se empleó esta técnica, permitiendo definir volúmenes y parámetros geométricos de las NPs. Adicionalmente el microscopio electrónico de transmisión cuenta con la técnica de Espectroscopia por Dispersión de Energía de Rayos X (EDS, del inglés Energy Dispersive Spectroscopy), el cual permite coleccionar los Rayos X generados por la muestra y realizar diversos análisis semicuantitativos y de distribución de elementos en superficies. ¹⁰⁰. Los nanomateriales se depositaron en una cinta de carbón, y se empleó el JEOL JSM-5600LV Scanning Electron Microscopy.

4.2.5 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

La Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) convierte la salida del detector a un espectro interpretable, y genera espectros con patrones que proporcionan información estructural, sobre la estructura molecular de la muestra. Cuando la radiación infrarroja pasa a través de una muestra, una parte de radiación es absorbida por la muestra y la radiación restante es transmitida, generando un espectro representativo de la “huella digital” de la muestra caracterizada. Cada estructura química y molecular genera un espectro distinto. Se empleó el equipo Perkin Elmer Frontier.

4.2.6 Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS)

La Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X, es una técnica analítica de superficie con una profundidad de muestreo de 2–5 nm que permite identificar las concentraciones relativas de diferentes constituyentes de la superficie del material ¹⁰³, así como la identificación de los diferentes estados de oxidación de los elementos presentes en la misma, siendo entonces una técnica muy adecuada para evidenciar la composición de la superficie de nanopartículas y nanomateriales. Se empleó el equipo K-Alpha+ spectrometer.

4.2.7 Magnetometría de muestra vibrante (VSM)

Para la medición de las propiedades magnéticas de los nanomateriales, se empleó el Magnetómetro de muestra vibrante (VSM, Quantum Device PPMS Evercool II) por sus siglas en inglés, el cual permite identificar la tendencia de la muestra a conservar sus propiedades magnéticas e identificar su coercitividad ¹⁰⁴, es decir la intensidad del campo magnético que se debe aplicar al material o partícula para reducir su imantación hasta llegar a cero, después de haber sido magnetizado hasta la saturación el material o partículas. Se emplearon los servicios del LPCNO, INSA, Toulouse.

4.2.8 Espectrofotometría UV-Vis

La espectroscopía UV-Vis está basada en el proceso de absorción de la radiación ultravioleta-visible (radiación con longitud de onda comprendida entre los 160 y 780 nm) por una molécula, y depende de la estructura electrónica de las especies. La absorción de esta radiación causa la promoción de un electrón a un estado excitado, recordando que las moléculas tienen niveles de energía vibracional, y a su vez cada nivel vibracional tiene niveles rotacionales. Los electrones que se excitan al absorber radiación de esta frecuencia son los electrones de enlace de las moléculas, por lo que los picos de absorción se pueden correlacionar con los distintos tipos de enlace presentes en el compuesto. Debido a ello, la espectroscopía UV-Vis se utiliza para la identificación de los grupos funcionales presentes en una molécula¹⁰⁵. Por medio de esta técnica se pueden conocer las transiciones válidas y las diferencias de energías entre estados energéticos (ΔE) así como entre bandas de conducción (CB) y valencia (VB) de semiconductores. Por tal razón, esta técnica es una herramienta muy útil en la determinación del bandgap de materiales⁹.

4.2.9 Plasma de acoplamiento inductivo (ICP)

Este análisis se usa para analizar simultáneamente muchos elementos y en niveles tan bajos como 1-10 partes por billón o ppb. Funciona usando un plasma de argón en el que se inyecta una muestra líquida atomizada mediante un ataque ácido. La muestra se ioniza en el plasma y los iones emiten luz a diferentes longitudes de onda características que posteriormente se miden en el rango UV-Vis, la intensidad de la emisión es proporcional a la abundancia del elemento en solución y permite así determinar la concentración. En el ICP con espectrómetro de masas o ICP-MS, los iones producidos en el plasma de argón se inyectan en el espectrómetro de masas, separando así los iones en función de su relación de masa y carga¹⁰⁶. Generalmente se realizan dos análisis por muestra. Se emplearon los servicios del LCC, Université Paul Sabatier, Toulouse.

4.3 Estudios antibacteriales

La actividad antibacteriana de las NPs fue estudiada en cuatro cepas bacterianas, dos cepas Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*) y las dos cepas Gram negativas (*Escherichia coli* y *Salmonella typhi*), obtenidas del Cepario de la facultad de Química de la UNAM. Todas las cepas fueron conservadas en agar nutritivo. Posteriormente cada cepa fue resembrada en agares selectivos (EMB, SS y TECRA), de acuerdo a las guías microbiológicas 107. Asimismo para evaluar la toxicidad de los nanomateriales sintetizados Fe_3O_4 , ZnFe_2O_4 y dopados $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Ag}$, $\text{ZnFe}_2\text{O}_4\text{-Ag}$ en las diferentes cepas bacterianas, dichos nanomateriales fueron incubados en cada cepa de interés en los microplatos destinados para tal fin (herramienta estándar usada en investigación analítica), a 36°C durante 24h.

4.3.1 Determinación de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)

Para llevar a cabo el presente estudio, se procedió con la metodología descrita por *Lalitha et al.* 108 y *Aguilar* 109, tal como se presenta de manera esquemática a continuación:

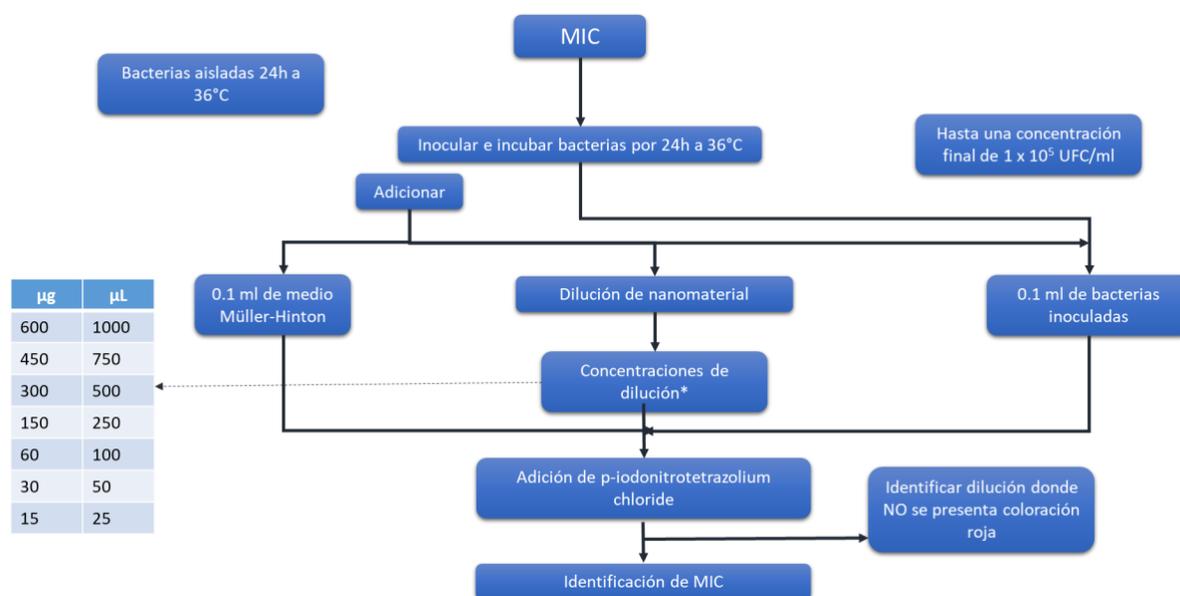


Figura 4-4. Metodología Concentración mínima inhibitoria.

Para la determinación de las concentraciones de material a implementar en los estudios de inhibición bacteriana se tuvo en cuenta lo reportado por *Tran et al.* 110 para diferentes morfologías y tamaños de nanopartículas de plata, así como los resultados obtenidos a lo largo de la investigación, estableciendo las siguientes concentraciones:

Tabla 4-3. Masas en relación a volumen de suspensión de nanomaterial a implementar

μg	200	100	50	20	15	10	5
μL	1000	750	500	250	100	50	25

Se incubó cada microplato con 0,1mL de dispersión de nanomaterial con la concentración establecida, 0,1 mL de caldo Müller-Hinton y 0,1mL de bacterias previamente inoculadas, con una concentración de (1×10^6 UFC/mL). Posteriormente se mantuvo el microplato en presencia de luz visible por 24 h a 36 °C. Para la determinación de crecimiento o inhibición bacteriana se emplearon 10.0 μL de una solución de 10mM de cloruro de *p*-iodonitrotetrazolium en cada microplato, como indicador de crecimiento celular. La coloración roja evidencia crecimiento celular de las bacterias de interés, mientras que un tono incoloro representa inhibición de crecimiento, permitiendo así determinar la concentración mínima inhibitoria a la cual ya no hay crecimiento celular debido a la actividad catalítica del nanomaterial sintetizado.

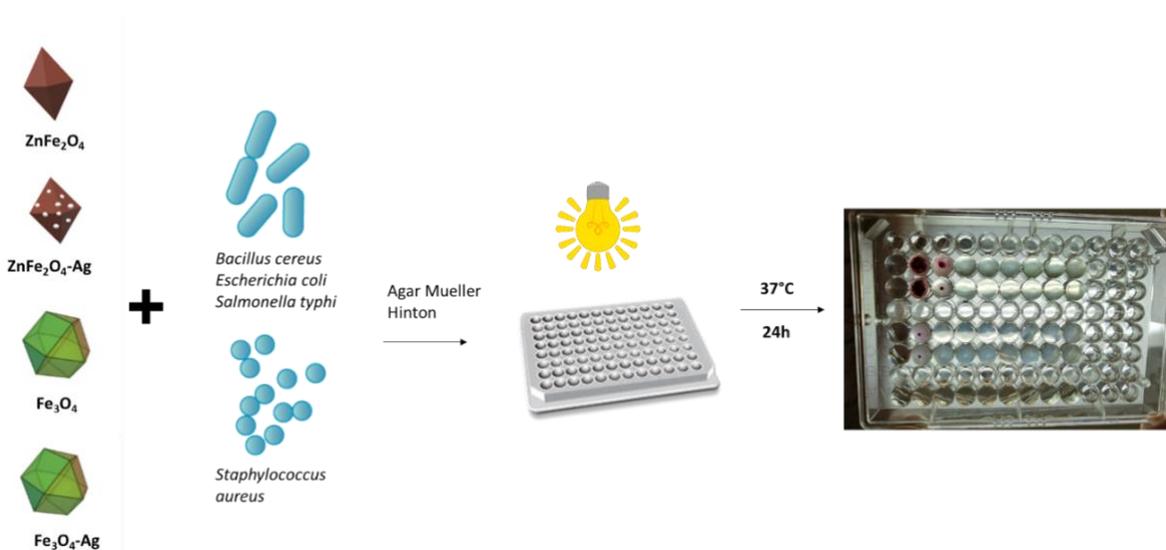


Figura 4-5. Ejemplo esquemático de Metodología para determinación de Concentración Mínima Inhibitoria

4.3.2 Efecto en las células bacterianas debido a la exposición a los nanomateriales de $ZnFe_2O_4$, $ZnFe_2O_4-Ag$, Fe_3O_4 and Fe_3O_4-Ag .

Para estudiar el ingreso del material a las células, se emplearon células eucariotas *Saccharomyces cerevisiae*, ya que son más grandes que las bacterias y su morfología permite identificar visualmente la distribución del material en la célula. Las células *Saccharomyces cerevisiae* fueron obtenidas de levadura comercial y cultivadas durante 24 horas a temperatura ambiente. 15 minutos antes de visualizarlas en el microscopio confocal, la levadura y la dilución del material se pusieron en contacto directo, con

relación 1 a 1, con base en los resultados obtenidos en la identificación de la concentración mínima inhibitoria para cada material, para este caso, adicionando las concentraciones de diluciones tal como se muestran a continuación:

Tabla 4-4. Concentraciones de dilución de nanomateriales empleadas en microscopía confocal

Material	Concentración de dilución de nanomaterial [$\mu\text{g} / \text{ml}$]
ZnFe₂O₄	10
ZnFe₂O₄-Ag	5
Fe₃O₄	50
Fe₃O₄-Ag	50

5 Capítulo: Resultados y discusión

5.1 Síntesis de nanopartículas

Tal como se describió previamente en la metodología experimental, se obtuvieron las NPs mediante un método de co-precipitación por la técnica de síntesis hidrotermal en un paso, obteniendo nano-octaedros de tamaño variable, los cuales debido a su forma angular causan daño a la membrana celular de las bacterias ⁶⁹. La composición de los metales presentes en los nanomateriales sin dopaje fue estimada por la técnica Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP, por sus siglas en inglés) identificando los resultados que se presentan a continuación:

Tabla 5-1. Porcentaje de metales presente en nanomateriales sintetizados y no dopados

Material	% Zn	% Fe	% total de metales
ZnFe ₂ O ₄	18.02	48.53	66.55
Fe ₃ O ₄	No aplica	72,64	72,64

5.2 Caracterización de nanomateriales sintetizados

A continuación, se presentan los resultados obtenidos para la caracterización de los nanomateriales sintetizados y dopados.

5.2.1 Difracción de rayos X (XRD)

5.2.1.1 Ferritas de zinc (ZnFe₂O₄)

Para evidenciar la fase cristalina del material obtenido de ferritas de zinc dopado a diferentes porcentajes de plata (relación peso a peso), se analizó la muestra mediante la técnica de caracterización de Rayos X en polvo, a 2θ entre 20° y 80° (Figura 4). Los resultados obtenidos fueron contrastados con la hoja de datos 0002576 de la AMCSD (American Mineralogist Crystal Structure Database) para franklinita (ferrita de zinc), identificando los picos de difracción en 2θ , así como los planos cristalográficos que se presentan en la Tabla 5-2. los resultados evidencian una estructura centrada en las caras (fcc, por sus siglas en inglés) con una espinela normal clásica (fd3m) ^{111, 112}, con los iones de Zn²⁺ ocupando las posiciones octaédricas y tetraédricas de enlace⁵⁷ y los iones de Fe²⁺ ocupando solo posiciones tetraédricas, como se evidencia en la Figura 4-1. Los parámetros de red encontrados para la malla cristalina fueron; $a = b = c = 8.3515 \text{ \AA}$ (a 25°C), coincidiendo los valores de los picos identificados y la fase cúbica, como se presenta en el esquema de la Figura 4-2.

Adicionalmente, es posible observar que, en los materiales dopados, el pico más alto se encuentra a $2\theta \approx 35,2^\circ$, lo cual se encuentra relacionado con el grado de cristalización del material. 99

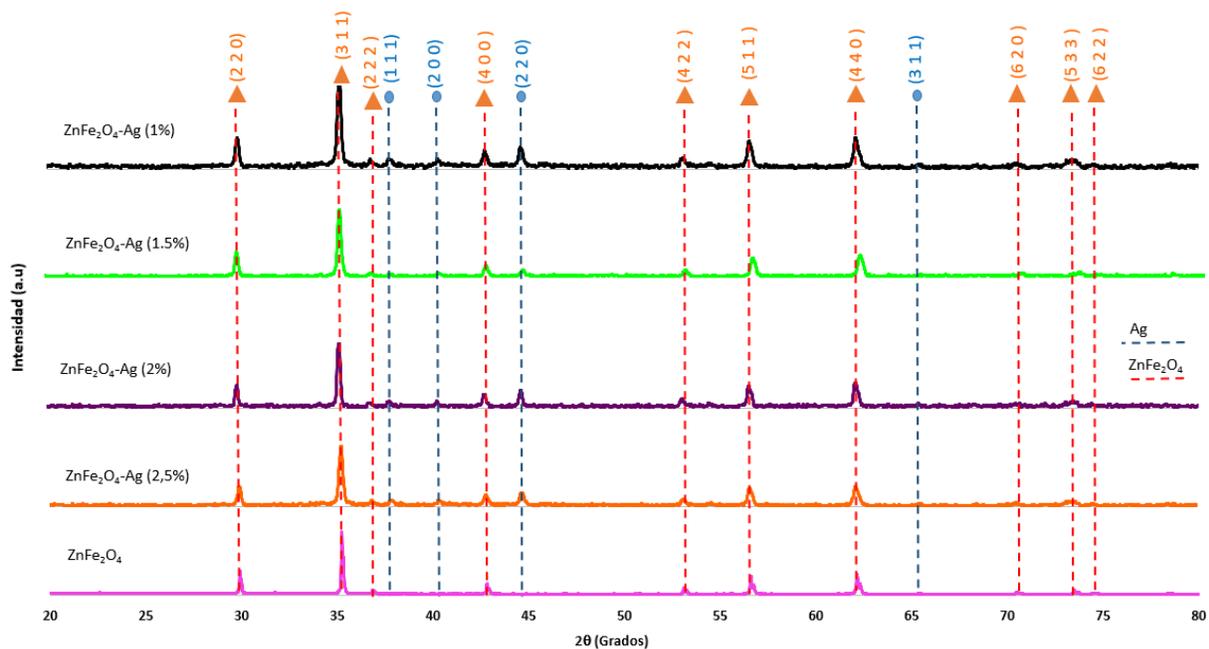


Figura 5-1. Patrón XRD de ferritas de zinc ($ZnFe_2O_4$ y $ZnFe_2O_4-Ag$).

Es importante mencionar que el desplazamiento de algunos de los picos (determinados cuantitativamente ($\Delta 2\theta^\circ$ y expresados en la Tabla 5-2) se deben a la influencia de Ag en la fase cristalina. Asimismo se confirma la presencia de plata a los diferentes dopajes con base en la hoja de datos 0011135 de la AMCSD, identificando los picos señalados en la Figura 4-1. Para la determinación del tamaño de nanopartículas se empleó el equipo XRD Bruker D8 Advance, presentando los resultados que se muestran en la Tabla 5-2. Puesto que la difracción es un proceso de interferencia entre los haces reflejados por sucesivos planos equidistantes, la anchura de los picos en esta técnica será inversamente proporcional al número de planos difractados coherentemente. Cuando los cristales de estudio son de tamaños micro o nanométricos, el haz se dispersará a diferentes direcciones debido al pequeño tamaño de los cristales en la muestra. 113

Asimismo es posible determinar matemáticamente el tamaño teórico de grano de las nanopartículas por medio de la ecuación de Scherrer-Debye. Este método correlaciona el tamaño de las partículas sub-micrométricas a través del ensanchamiento de cristal observado en los patrones XRD de los nanomateriales sintetizados.114

$$D = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta}$$

Ecuación 5-1. Scherrer- Debye

Donde:

D = Tamaño promedio de grano (nm)

K = factor de forma, en la mayoría de los casos se utiliza 0,9

λ = Longitud de onda de rayos X, en éste caso ($K\alpha$ del átomo de Cu) = 1,54Å

β = Ancho total del pico a analizar, a la mitad de su máxima intensidad (Full Width at Half Maximum, FWHM por sus siglas en inglés), definido en radianes

θ = Ángulo de Bragg, (ángulo de difracción)

Tabla 5-2. Picos de difracción en 2θ (grados) para materiales de ferrita de zinc dopados.

Picos de difracción 2θ [°]									
Plano cristalino	1	2	$\Delta 2\theta$ *	3	$\Delta 2\theta$ *	4	$\Delta 2\theta$ *	5	$\Delta 2\theta$ *
2 2 0	29,90	29,93	0,027	29,91	0,008	29,90	0,007	29,92	0,012
3 1 1	35,22	35,25	0,026	35,23	0,009	35,23	0,003	35,23	0,006
2 2 2	36,86	36,88	0,011	36,86	0,006	37,20	0,331	36,89	0,027
4 0 0	42,80	42,83	0,031	42,84	0,039	42,79	0,003	42,84	0,038
4 2 2	53,10	53,14	0,038	53,13	0,029	53,11	0,011	53,14	0,043
5 1 1	56,58	56,62	0,042	56,62	0,037	56,61	0,033	56,62	0,043
4 4 0	62,14	62,17	0,034	62,19	0,051	62,17	0,034	62,16	0,019
6 2 0	70,48	70,50	0,015	70,52	0,034	70,55	0,067	70,48	0,005
5 3 3	73,49	73,48	0,010	73,53	0,042	73,51	0,020	73,39	0,096
6 2 2	74,47	74,57	0,097	74,54	0,073	74,46	0,008	74,52	0,053

1. ZnFe₂O₄

2. ZnFe₂O₄-Ag (1%)

3. ZnFe₂O₄-Ag (1,5%)

4. ZnFe₂O₄-Ag (2%)

5. ZnFe₂O₄-Ag (2,5%)

$\Delta 2\theta$ *, Se presenta para cada dopaje respecto a la posición de ZnFe₂O₄

Tabla 5-3. Tamaño de grano promedio para picos identificados en XRD, ferritas de zinc con y sin dopaje.

Posición pico 2θ (°) ZnFe ₂ O ₄ -Ag (1%)	Tamaño de grano (nm)	Posición pico 2θ (°) ZnFe ₂ O ₄ -Ag (1,5%)	Tamaño de grano (nm)	Posición pico 2θ (°) ZnFe ₂ O ₄ -Ag (2%)	Tamaño de grano (nm)	Posición pico 2θ (°) ZnFe ₂ O ₄ -Ag (2,5%)	Tamaño de grano (nm)
29,93	24,25	29,91	26,64	29,90	29,10	29,92	24,05
35,25	11,38	35,23	12,07	35,23	11,73	35,23	11,10
56,62	24,80	56,62	24,80	56,61	24,80	56,62	24,80
62,17	22,05	62,19	22,12	62,17	23,42	62,16	21,98
Promedio	20,62	Promedio	21,41	Promedio	22,26	Promedio	20,48

Los resultados obtenidos son coherentes con los tamaños obtenidos en TEM. Tal como se presenta en la siguiente sección.

Como se puede ver en las tablas presentadas anteriormente, en todos los nanomateriales dopados se evidencia la presencia de plata en la superficie de los mismos. Sin embargo para identificar el mejor dopaje y distribución del mismo en la superficie del material, se deben integrar estos análisis con las otras técnicas de caracterización y morfología tales como TEM, HRTEM y SEM; los cuales se describen en la sección 5.2. De acuerdo con estos análisis se puede determinar que el mejor dopaje se presentó al 2% de plata en relación peso/peso (%w/w), por lo que se empleará esta cantidad posteriormente para el dopaje de magnetitas.

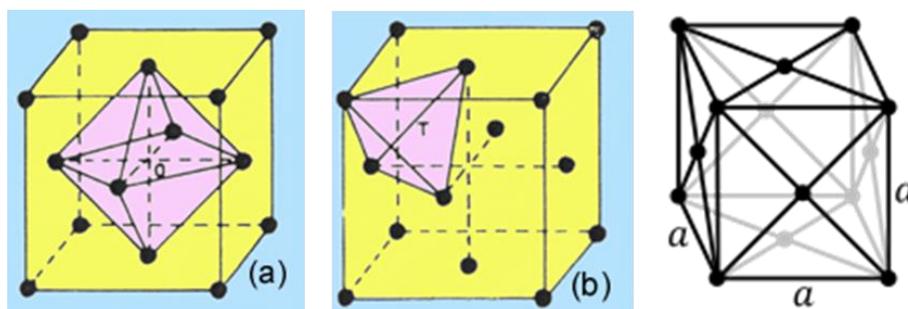


Figura 5-2. a) Posición enlace octaédrico Zn²⁺-(Zn-O), 32 puntos de enlace b) Posición enlace tetraédrico Fe-O y Zn²⁺, 64 puntos de enlace c) Estructura centrada en las caras

5.2.1.2 Magnetitas (Fe_3O_4)

A continuación se presentan los resultados obtenidos en la difracción de rayos X empleando la radiación $\text{CuK}\alpha$ en el rango angular (2θ) de 20° a 80° para el material de magnetitas dopadas con plata al 2% y sin dopaje. También se presenta tamaño medio de grano, determinado mediante la ecuación 1. Asimismo se identificaron los índices de Miller con base en la hoja de datos 0000945 de la AMCSD, los cuales se evidencian en la figura 4-3.

Figura 5-3. Patrón XRD de magnetitas (Fe_3O_4 y $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Ag}$).

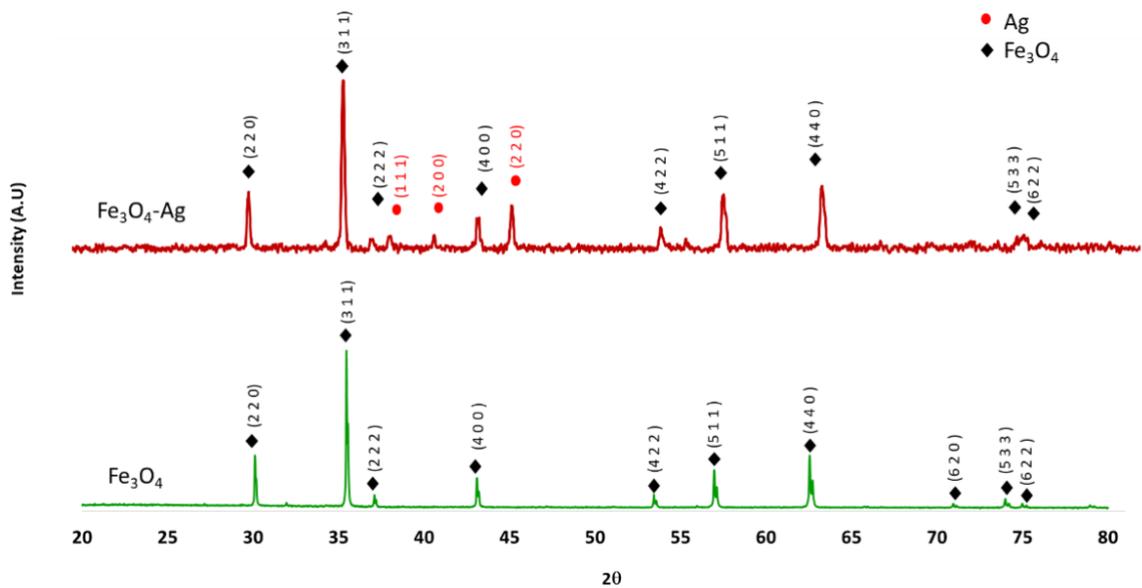


Tabla 5-4. Picos de difracción en 2θ (grados) para magnetita con y sin dopaje.

Plano cristalino	Fe_3O_4	$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Ag}$ (2%)	$\Delta 2\theta$ Fe_3O_4
2 2 0	30.10	30.00	0,10
3 1 1	35.46	35.40	0,06
2 2 2	37.08	36.99	0,09
4 0 0	43.09	43.06	0,03
4 2 2	53.44	53.21	0,23
5 1 1	56.96	56,92	0,04
4 4 0	62.53	62.38	0,15
5 3 3	73.98	73.70	0,28
6 2 2	75.19	75.12	0,07

Tabla 5-5. Tamaño de cristal promedio para picos identificados en XRD, magnetitas

Posición pico 2θ ($^{\circ}$) Fe_3O_4	Tamaño de grano (nm)
30.10	53.09
35.46	58.60
37.08	42.53
43.09	90.75
53.44	1.15
56.96	98.26
62.53	16.54
73.98	43.71
Promedio	50.57

5.2.2 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

5.2.2.1 Ferritas de zinc (ZnFe_2O_4)

Para identificar el mejor porcentaje de dopaje con plata en el nanomaterial de ferritas de Zinc (ZnFe_2O_4), se empleó esta técnica, usando un microscopio electrónico de barrido con electrones secundarios, identificando una clara morfología octaédrica en las partículas de ferritas de zinc. Además pudo observarse la nucleación de las nanopartículas de Ag en la superficie de las ZnFe_2O_4 (las cuales se evidencian en color más claro).

En la Figura 4-4 es posible observar la distribución de las nanopartículas de plata en la superficie del material sintetizado, de acuerdo con el porcentaje de dopaje. La figura 4-4 (a) muestra el dopaje al 1% (%w/w), denotando una distribución poco uniforme del dopaje, lo cual se atribuye a la baja cantidad relativa de NPs de Ag con respecto a las ferritas. La figura 4-4 (b) y (c) muestran la distribución de la plata para el dopaje al 1,5% y 2% respectivamente, exponiendo una distribución más amplia de las NPs de Ag sobre el material, alcanzando una distribución más homogénea en el caso del 2% de dopaje. Por último, la figura 4-4 (d), con dopaje al 2.5% no muestra nucleación de las nanopartículas de plata en la superficie del material, lo cual se asocia a una demora en el procedimiento experimental y liberación de H^+ de la solución de NaBH_4 .

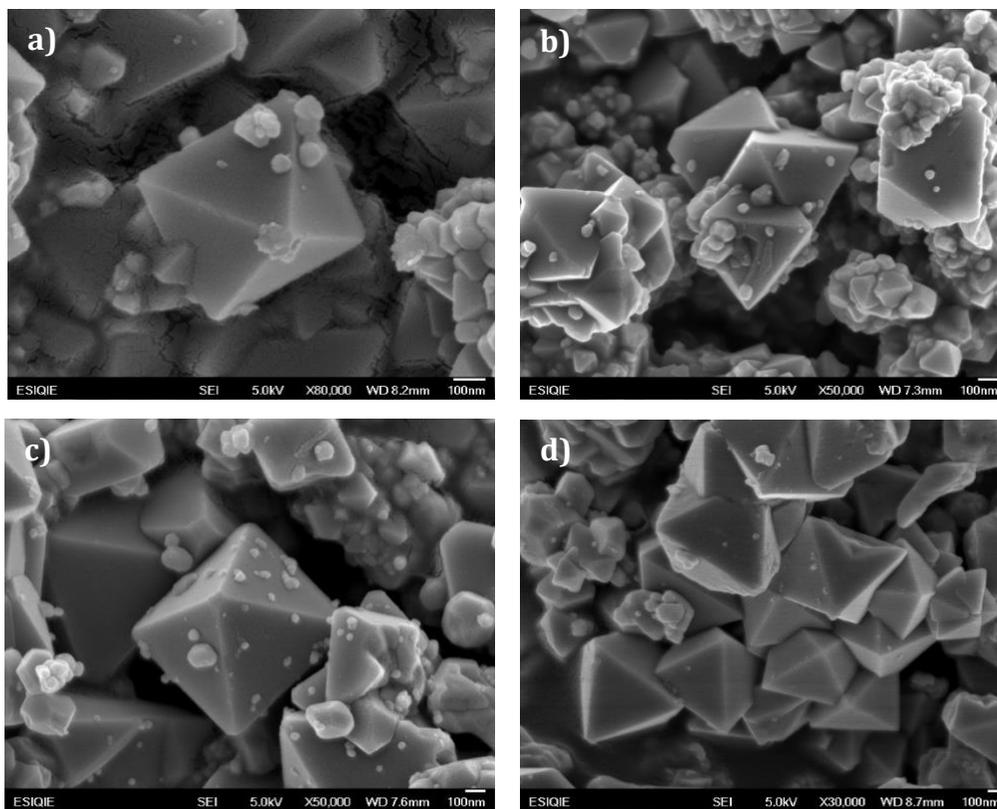


Figura 5-4. SEM ferritas de zinc a diferentes porcentajes de dopaje con plata y magnificaciones. Tomadas a 5.0 kV. a) 1% 80,000X. b) 1,5% 50,000X. c) 2% 50,000X y d) 2,5% 30,000X.

Para comprobar la distribución de las nanopartículas de plata a lo largo de todo el material, se empleó el SEM con electrones retrodispersados, permitiendo identificar la homogeneidad de la distribución de las NPs de Ag, tal como se muestra en la Figura 4-5. Con estos resultados, tal como se mencionó anteriormente, se confirma que no se presentó buena distribución de las nanopartículas de plata al 1%, 1,5% y 2,5%, (Figuras 4-5 (a), (b) y (d) respectivamente). Como se ha indicado previamente, la mejor dispersión de nanopartículas de Ag se presentó al 2% (c).

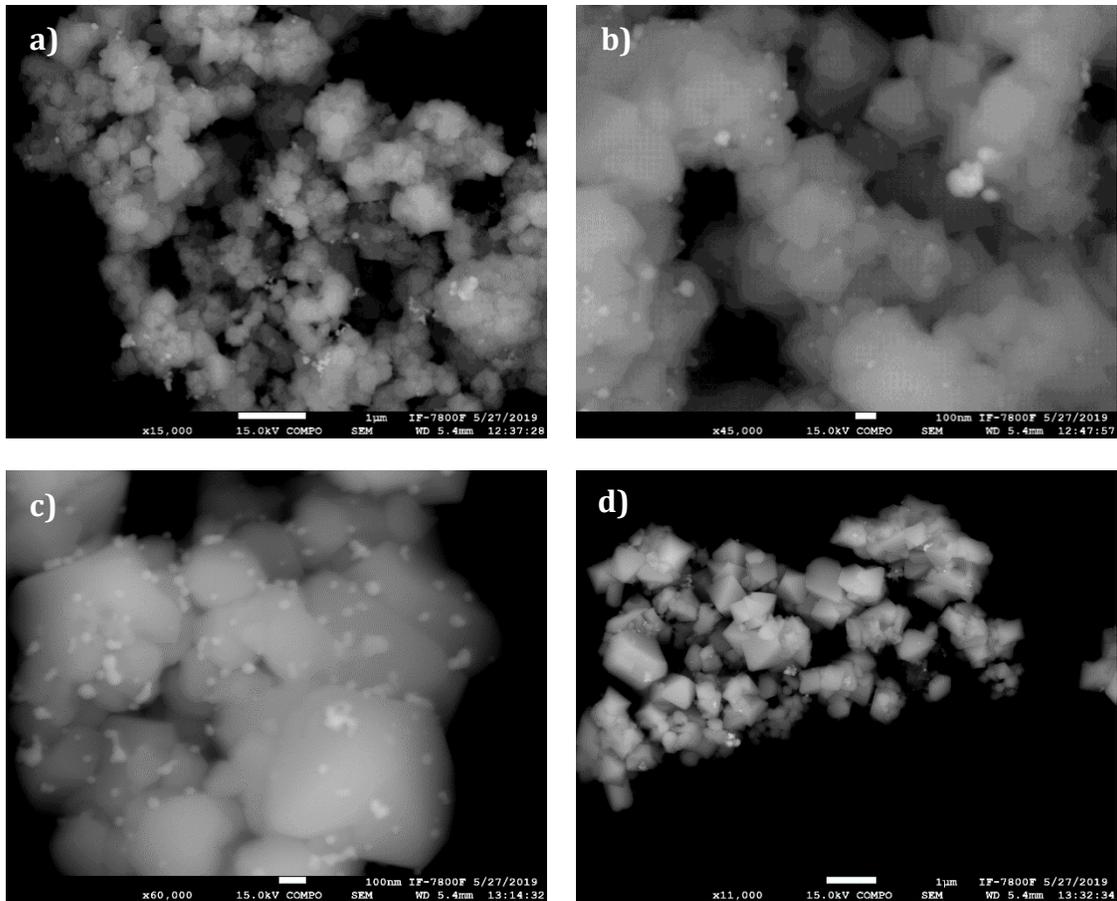


Figura 5-5. SEM con electrones retrodispersados. Ferritas de zinc a diferentes porcentajes de dopaje con plata y magnificaciones. Tomadas a 15.0 kV. a) 1% 15,000X, b) 1,5% 45,000X, c) 2% 60,000X y d) 2,5% 11,000X.

5.2.2.2 Magnetitas (Fe_3O_4)

Empleando el microscopio electrónico de barrido con electrones secundarios es posible identificar una estructura cuboctaédrica de algunas de las nanopartículas de Fe_3O_4 , tal como se muestra en la Figura 4-6. Identificando asimismo poca homogeneidad en el tamaño y morfología del material dopado y no dopado. Sin embargo, la efectividad del material se evalúa con los resultados de toxicidad obtenidos en el MIC, descritos en la sección 5.3.1.

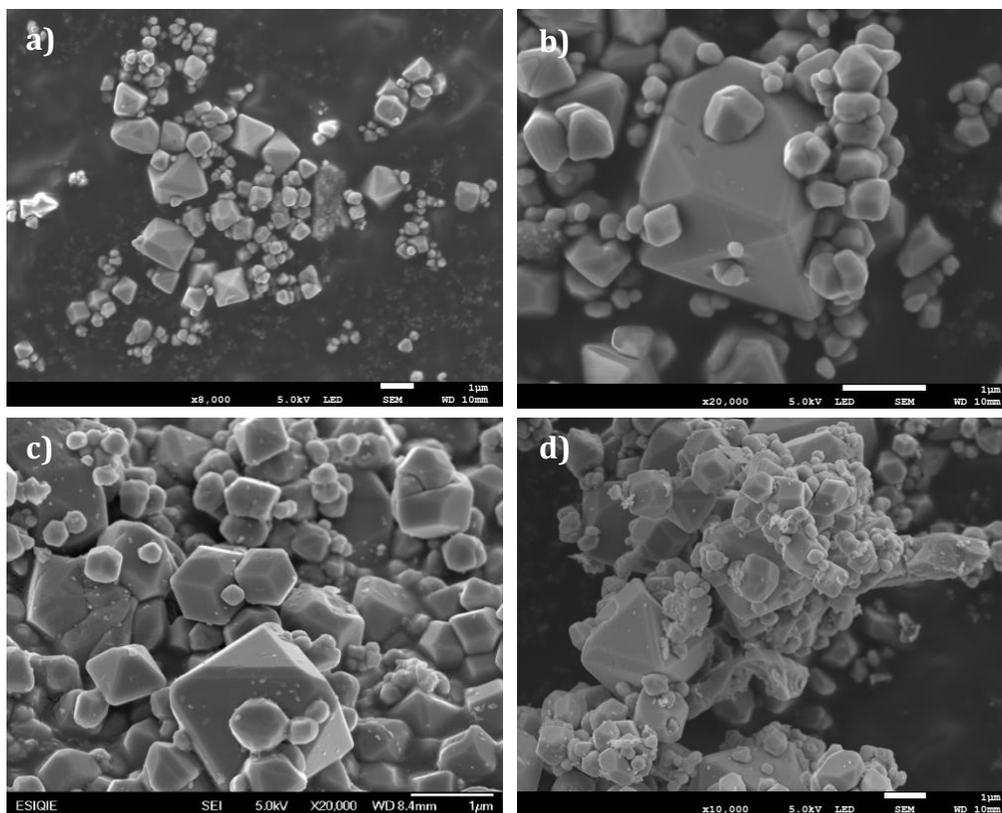


Figura 5-6. SEM con electrones secundarios. Magnetitas (Fe_3O_4) en diferentes magnificaciones a 5.0 kV. a) Morfología general sin dopaje 8,000X, b) Morfología cubo-octaédrica dopada con plata al 2% (w/w) 20,000X, c) Morfología cubo-octaédrica sin dopaje 20,000X, d) distribución morfológica general de NPs 10,000X.

5.2.3 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

5.2.3.1 Ferritas de zinc (ZnFe_2O_4)

Para comprobar los resultados obtenidos en SEM y mostrar la morfología de las nanopartículas se empleó la Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM, por sus siglas en inglés). Como se evidencia en la figura 4-7, es posible observar la cristalinidad de la estructura de las ZnFe_2O_4 NPs Figura 4-7 (a), en el cual se pueden observar bordes definidos y siendo consistente con los resultados obtenidos en la difracción de rayos X (XRD) y SEM. Asimismo, es posible observar la nucleación de las NPs de Ag en la superficie de las NPs de ZnFe_2O_4 , identificando la interfaz del material con las NPs de Ag (Figura 4-7 (b)), el cual es analizado a mayor profundidad con los resultados obtenidos en el análisis por Microscopía Electrónica de Barrido de Alta Resolución (HRTEM). El tamaño de las nanopartículas de plata oscila entre 16 y 25 nm, mientras que el nanomaterial de ferritas de zinc presenta un tamaño aproximado de unos 80 nm.

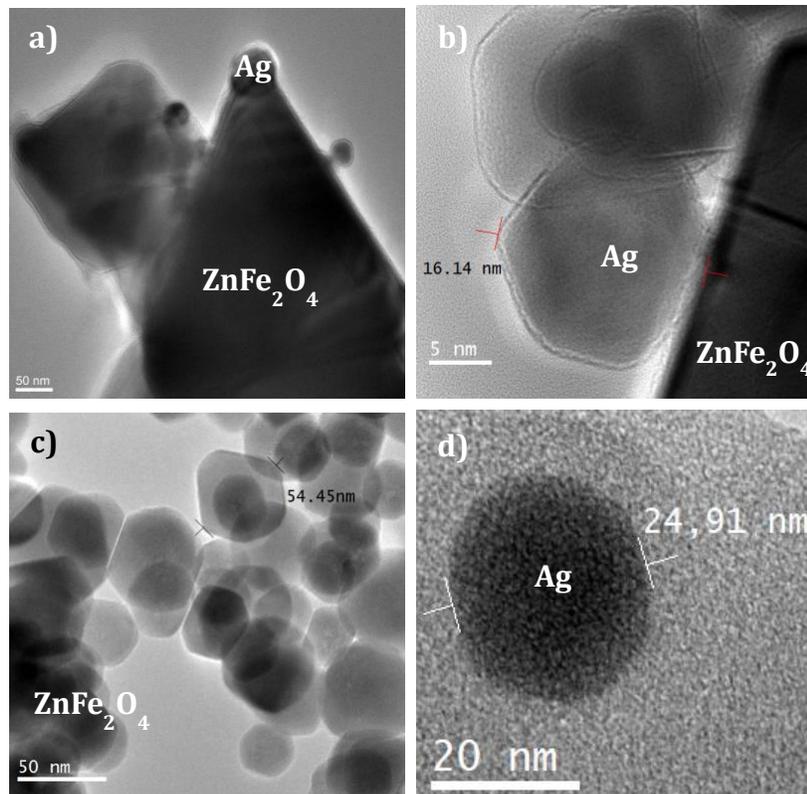


Figura 5-7. Imágenes TEM. a) NPs de Ferritas de zinc dopadas con Ag b) Interface NPs Ag - ZnFe₂O₄ c) NPs de Ferritas de zinc d) NPs de plata

Es muy importante evidenciar el dopaje del nanomaterial con plata, porque esto ayuda a mejorar las propiedades antibacteriales del mismo, lo cual se confirma con los resultados de la concentración mínima del material necesario para inhibir el crecimiento bacteriano (MIC), los cuales se discuten más adelante.

Para verificar los resultados de XRD, se realizó el análisis de las reflexiones observadas en la transformada rápida de Fourier obtenidas a partir de imágenes de HRTEM. Para la determinación de la distancia entre los átomos dispersados se empleó el software Digital Micrograph y con base en la ficha de magnetitas disponible en la American Mineralogist Crystal Structure Database, se asignaron los índices de Miller a cada distancia correspondiente, mostrándose que los picos encontrados son concordantes con los resultados de XRD.

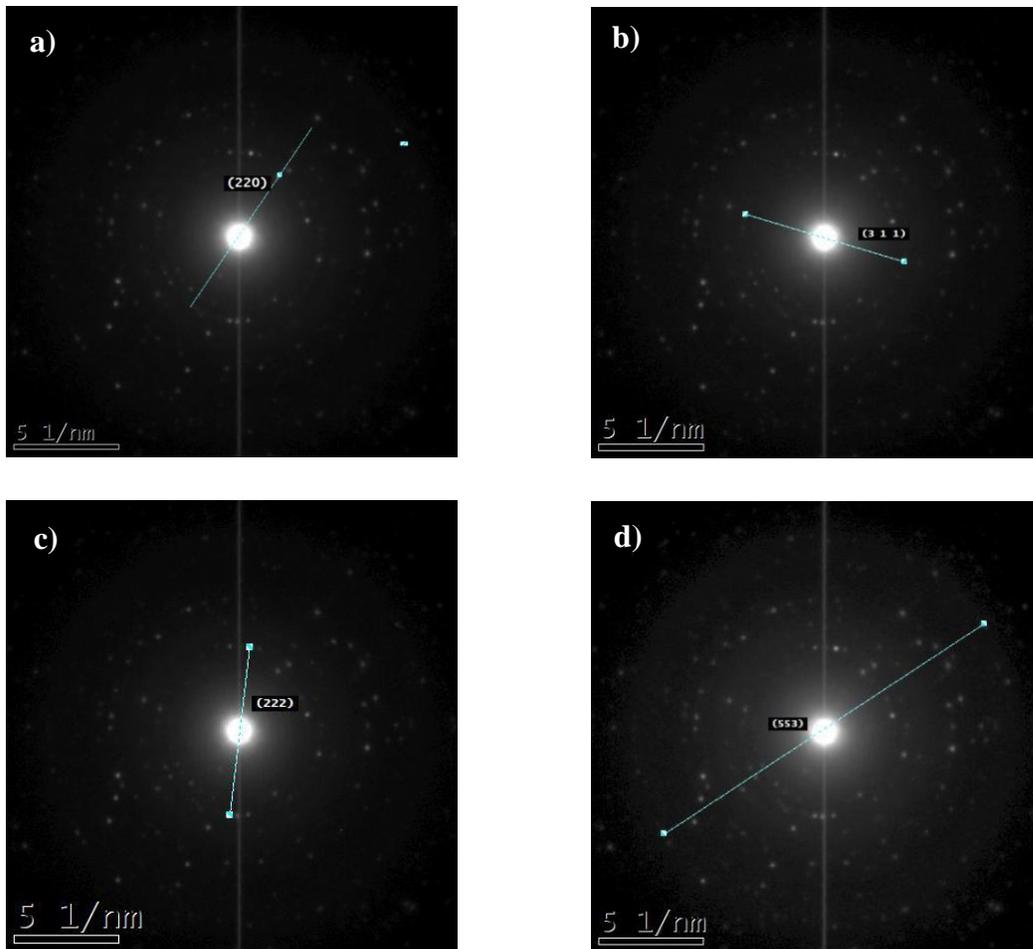


Figura 5-8. Cristalografía ferritas de zinc a diferentes posiciones de pico 2. a) 30,10 b) 35,46 c) 37,09 d) 89,70

5.2.3.2 Magnetitas (Fe_3O_4)

Asimismo para evidenciar y comprobar la morfología de las magnetitas observada en el SEM, se procedió a realizar el TEM, identificando una estructura cuboctaédrica con caras en (100) y $111]$ ¹¹⁵, tal como se muestra en la figura 4-9. Basado en previos estudios¹¹⁵ y teniendo en cuenta que se usó la misma síntesis hidrotérmal tanto para las magnetitas como para las ferritas, es posible pensar que la estructura obtenida se debe al lento crecimiento o nucleación de las partículas durante la reacción con la hidracina como mineralizador. La falta de tiempo de reacción da lugar a la formación de octaedros truncados.

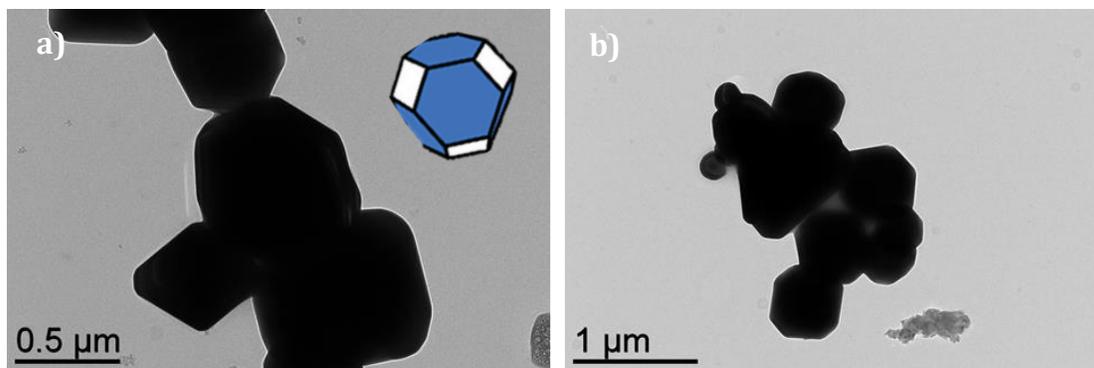


Figura 5-9. TEM Magnetita (Fe_3O_4). a) cuboctaedros con caras en 1 0 0 y 1 1 1. b) Aglomerado de nanopartículas.

5.2.4 Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM)

Para evidenciar los planos cristalográficos presentes en la estructura cristalina del material sintetizado de ferritas de zinc, se empleó el análisis de HRTEM, confirmando el alto grado de cristalinidad de las NPs. Asimismo, se observan los planos característicos de las ZnFe_2O_4 NPs: 222, 111, y 220, tal como se muestra en la siguiente figura 4-10, los cuales a su vez, concuerdan con los resultados obtenidos en la difracción de rayos X. La cristalinidad del nanomaterial se asocia a la mejora de las propiedades fotocatalíticas del mismo ^{116, 99}, es decir que se presumen buenas propiedades de toxicidad en las bacterias de interés. Del mismo modo, la nucleación y crecimiento de las nanopartículas de plata sobre la superficie de las ferritas de zinc se presenta en la cara (111), por lo que es posible observar en la interfaz ZnFe_2O_4 -Ag (d). Mientras que el tamaño aproximado de las nanopartículas de plata se acerca a los 6nm.

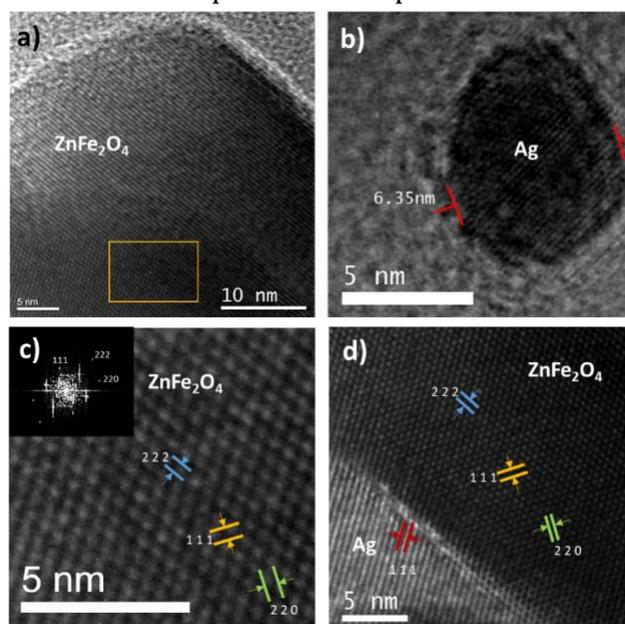


Figura 5-10. HRTEM a) NPs ZnFe_2O_4 , b) NPs de Ag, c) Índices de Miller ZnFe_2O_4 , d) Interfaz Ag- ZnFe_2O_4 con índices de Miller.

5.2.5 Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

5.2.5.1 Ferritas de zinc ($ZnFe_2O_4$)

Esta es una técnica de espectroscopia, en la cual los átomos interactúan con la radiación electromagnética, y la absorción de luz produce un cambio en los niveles cuánticos vibracionales característico de los enlaces químicos presentes. De este modo, se pueden identificar especies como Zn-O-Fe, (registrado entre los 4000 y 400 cm^{-1}), el enlace en posición octaédrica $Zn_{2++}(Zn-O)$ registrado a $\approx 480\text{ }cm^{-1}$ y el enlace en posición tetraédrica a $\approx 660\text{ }cm^{-1}$; lo cual es concordante con los resultados obtenidos en difracción de rayos X y SEM ^{117 116}. Por otro lado las señales a $\approx 1100\text{ }cm^{-1}$ y $1200\text{ }cm^{-1}$ indican la presencia de aniones sulfato provenientes de los precursores. Asimismo es posible observar señales típicas de plata en $2924\text{ }cm^{-1}$ y $2851\text{ }cm^{-1}$ ¹¹⁸ para el material de $ZnFe_2O_4$ -Ag (2,5%), indicando que las nanopartículas de plata no se nuclearon en la superficie del material, sino que están en la muestra pero no adheridas a las ferritas de zinc. Es posible observar que no se presenta dicha señal en los otros dopajes (1%, 1.5% y 2%), porque en estos casos las NPs de plata sí se encuentran adheridas en la superficie del material y la señal correspondiente a estas NPs no alcanza a ser detectada por el equipo.

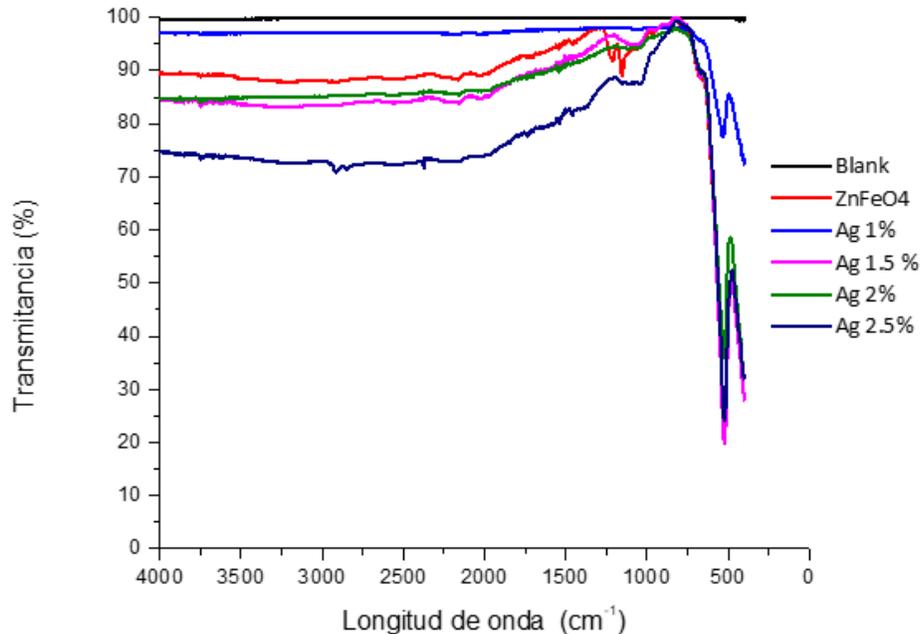


Figura 5-11. Patrón FTIR ferritas de zinc a diferentes porcentajes de dopaje.

5.2.6 UV-Vis

La radiación de luz visible tanto en las ferritas de zinc ($ZnFe_2O_4$) como en las magnetitas (Fe_3O_4), dopadas y no dopadas generan en los materiales semiconductores pares electrón-hueco debido a la movimiento de electrones desde la banda de valencia hasta la banda de conducción. Que a su vez reduce el oxígeno para generar radicales superóxido que en el medio acuoso en el que se encuentra el material, luego se encuentran con hidrones para producir finalmente H_2O_2 .

Para que se dé dicha liberación de pares electrón-hueco en los materiales, hay que considerar el bandgap de los materiales. Se identificó el bandgap de los materiales empleando el Gráfico de Tauc (Tauc permite identificar el Bandgap óptico en materiales semiconductores) y se asoció dicha energía en eV a la longitud de onda a la cual se presenta la absorbancia. La identificación del bandgap se obtiene a partir de la extrapolación de los datos presentados en el gráfico de $\alpha h\nu^2$ vs energía en eV.

Para la determinación de la energía se empleó la ecuación de Einstein-Planck, mientras que $\alpha h\nu^2$ se obtuvo a partir de la función de Kubelka-Munk, la cual permite identificar la absorbancia óptica de la muestra, a partir de su reflectancia.

Ecuación 5-2. Ecuación de Einstein - Planck

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} [J]$$

Donde

E = Energía del fotón en Jules

h = Constante de Planck en eV/s = 6.62608×10^{-34}

c = Velocidad de la luz en el vacío = 2.997925×10^8 m/s

λ = Longitud de onda en m

Ecuación 5-3. Función de Kubelka-Munk

$$\alpha = \frac{(1 - R)^2}{2R}$$

Donde

R es la reflectancia obtenida desde las mediciones de absorbancia a diferentes longitudes de onda en el equipo de UV-Vis para sólidos.

$$R = 10^{abs}$$

Abs es la absorbancia de la muestra

A continuación se muestran los gráficos de Tauc para las ferritas y magnetitas con el respectivo bandgap identificado.

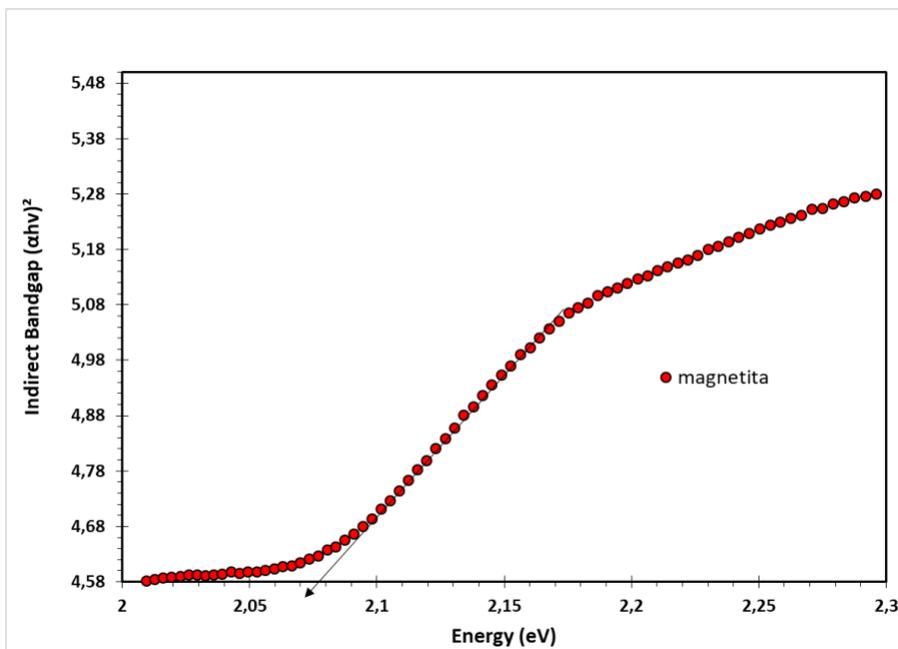


Figura 5-12. Gráfico de Tauc, magnetita. Bandgap 2,08 eV.

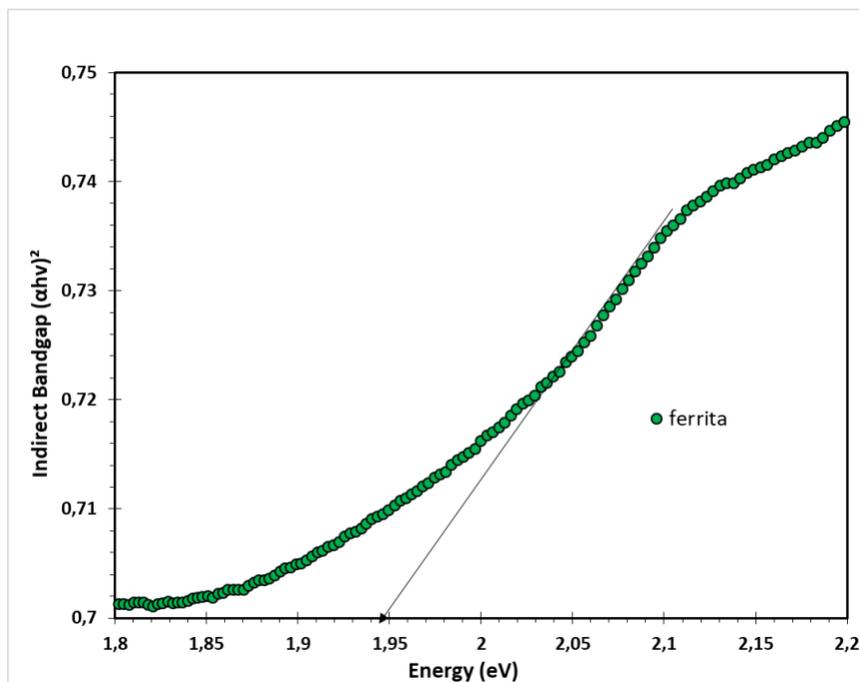


Figura 5-13. Gráfico de Tauc, ferritas de Zinc. Bandgap 1,95 eV.

A partir de la ecuación de Einstein-Planck es posible determinar la longitud de onda que corresponde a la energía presentada para cada material. Despejando lambda de la ecuación mencionada se tiene que:

$$\lambda = \frac{1240eV * nm}{Bandgap \text{ en } eV}$$

Es decir que para las ferritas de zinc se tiene una longitud de onda de 635.89 nm, mientras que para las magnetitas es de 596.15 nm.

Tabla 5-6. Bandgap de ferritas de zinc y magnetitas determinados a partir de datos experimentales.

Material semiconductor	Tamaño experimental [nm]	λ Determinado (UV - Vis) [nm]	Bandgap Determinado [eV]
Fe₃O₄	50.57	596.15	2.08
ZnFe₂O₄	20.62	635.89	1.95

Tabla 5-7. Bandgap de ferritas de zinc y magnetitas de valores reportados.

Material semiconductor	Tamaño reportado [nm]	λ Reportada (UV - Vis) [nm]	Bandgap Reportado [eV]
Fe₃O₄	40	470*	2.63*
ZnFe₂O₄	21	590**	2.09**

*Valores reportados en la literatura ¹¹⁹

**Valores reportados en la literatura ¹²⁰

Como se observa en la tabla anterior, la longitud de onda de los fotones necesaria para provocar la excitación de ambos nanomateriales semiconductores, 596.15 nm para las magnetitas y 635.89 nm para las ferritas de zinc, corresponde a la región visible del espectro electromagnético (390 a 750 nm) ⁷, lo que posibilita la aplicación de luz visible de forma directa en los materiales, para que éstos presenten actividad fotocatalítica. Asimismo estos valores son concordantes con resultados publicados previamente para tamaños similares en los NMs de interés.

Del mismo modo, es importante destacar las diferencias entre los valores de bandgap presentados en la tabla anterior para cada material. El bandgap de las ferritas de zinc es menor que el de las magnetitas, es decir que le es más fácil a los electrones de la capa de valencia (VB) de las ferritas pasar a la capa de conducción (CB), que a los electrones de las magnetitas. Si se recuerda que el bandgap depende del tamaño de grano de las nanopartículas debido al confinamiento cuántico, y que las NPs de ferritas de zinc son más pequeñas que las NPs de magnetitas, esto podría explicar las diferencias en los valores energéticos. Esto, se traduciría *a priori* en una mayor actividad para el caso de las ferritas de zinc, las cuales serían capaces de producir más especies reactivas de oxígeno tras irradiarse con luz visible. Esta hipótesis concuerda con los resultados obtenidos en la determinación de la concentración mínima inhibitoria.

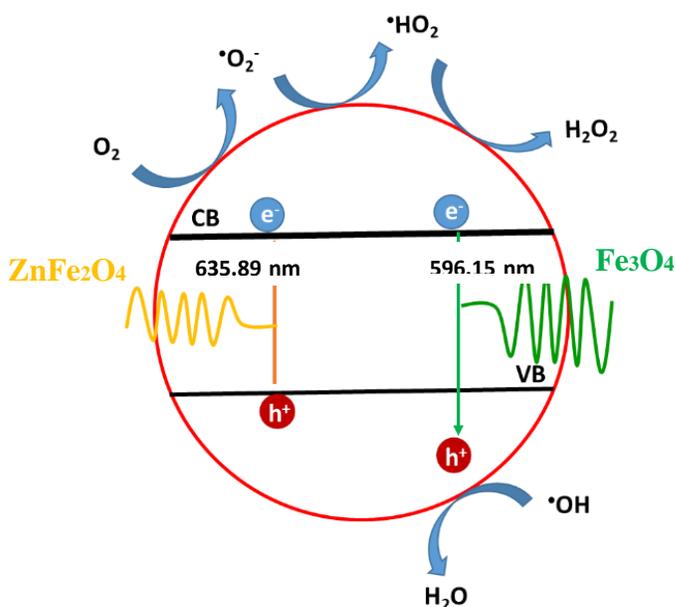


Figura 5-14. Esquema teórico de generación de ROS en nanomateriales, identificando su respectivo bandgap. Figura propia.

5.2.7 Fotoespectroscopía de rayos X (XPS)

Los nanomateriales fueron caracterizados por espectroscopía fotoeléctrica de rayos X con el objetivo de caracterizar su superficie, permitiendo identificar de manera cualitativa los elementos presentes en dicha superficie. Esta técnica se basa en la absorción de un Rayo X, que excita a los electrones de las capas internas y se emiten al exterior. La energía cinética de los electrones emitidos será menor cuanto mayor sea la energía necesaria para arrancarlos. Esta energía es característica del estado de oxidación del átomo, lo cual permite caracterizarlo. Se pudo identificar picos correspondientes al Zn, Fe, Ag, O y C para las ferritas de zinc dopadas con plata ($ZnFe_2O_4$ -Ag) y Fe, Ag y O para las magnetitas. En ambos casos se detectan algunos picos

menores correspondientes a impurezas como Na, C y N (Tabla 4-7), lo cual se asocia a la presencia de subproductos provenientes del dopaje con plata, a partir de la descomposición del AgNO_3 (como se describe en la metodología experimental). Asimismo es posible observar dos picos de especies de Zn, uno a 1022.08 eV para $\text{Zn}2p_{3/2}$ el cual corresponde al ion Zn^{2+} en las posiciones tetraédricas, y el otro pico a 1045.08 eV para $\text{Zn}2p_{1/2}$ el cual corresponde al ion Zn^{2+} ocupando las posiciones octaédricas ¹²¹. También se observan dos señales de los cationes de Fe en todos los materiales, uno a 712.08 eV para $\text{Fe}2p_{3/2}$ correspondiente al ion Fe^{2+} y el otro a 725.08 eV para $2p_{1/2}$ correspondiente al ion Fe^{3+} . La diferencia en energía entre ambos picos es de 13.0 eV lo cual es muy cercano a los valores reportados para sistemas análogos ⁹⁹. También, se identifican picos a 369.08 y 375.08 eV, correspondientes a $\text{Ag}3d_{5/2}$ y $\text{Ag}3d_{3/2}$ respectivamente, confirmando la presencia de plata en la superficie de los nanomateriales sintetizados ¹²².

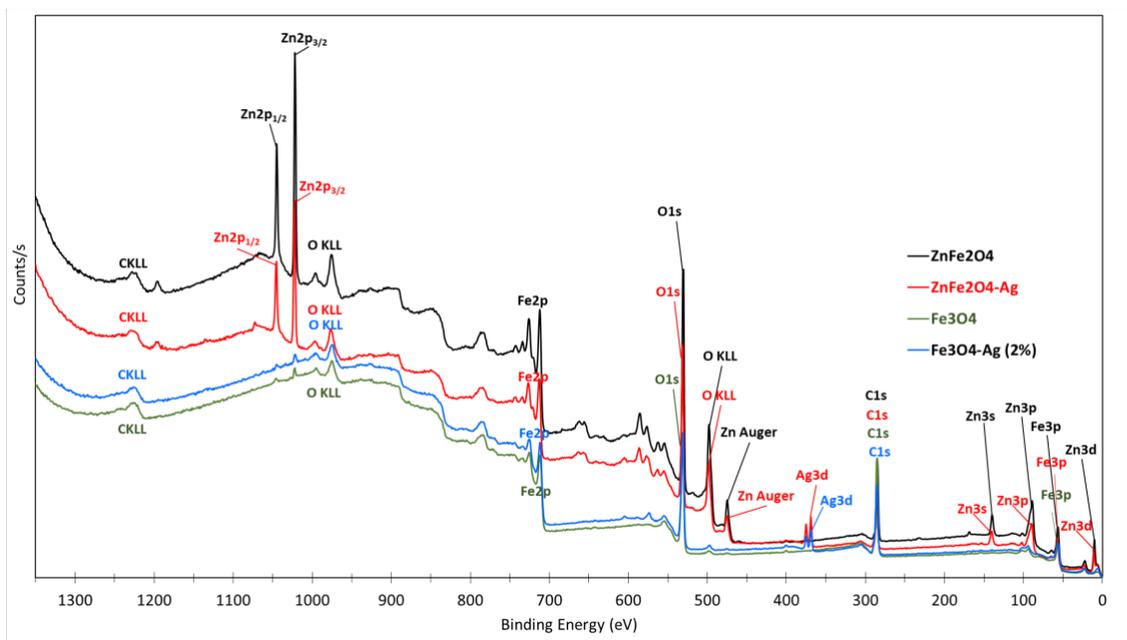


Figura 5-15. Patrón XPS Completo nanomateriales sintetizados y dopados

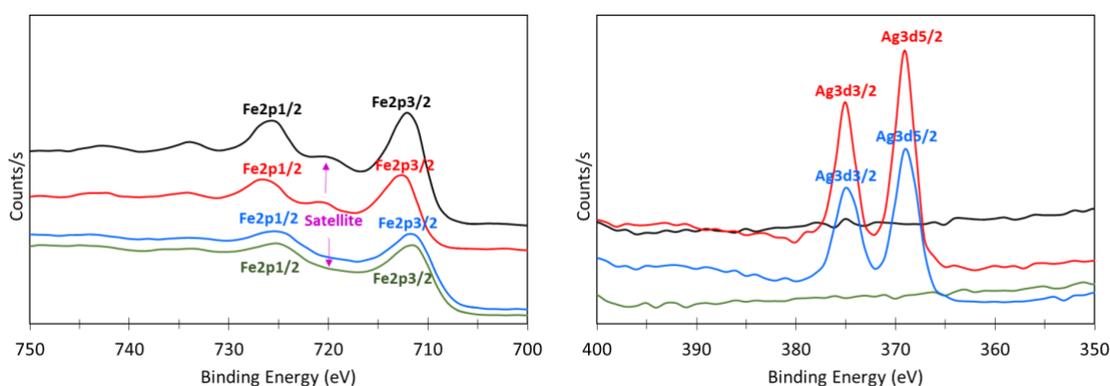


Figura 5-16. Zoom XPS Nanomateriales sintetizados y dopados

Del mismo modo, a continuación se presenta la composición de porcentaje en peso de la superficie de los nanomateriales:

Tabla 5-8. Composición elemental superficial de nanomateriales sintetizados determinada por XPS.

ZnFe ₂ O ₄		ZnFe ₂ O ₄ -Ag		Fe ₃ O ₄		Fe ₃ O ₄ -Ag	
Nombre	Peso (%)	Nombre	Peso (%)	Nombre	Peso (%)	Nombre	Peso (%)
Zn2p	30,7	O1s	25,8	C1s	43,6	C1s	34,5
O1s	30,6	Fe2p	23,9	O1s	30,9	O1s	32,6
C1s	18,5	Zn2p	23,7	Fe2p	18,8	Fe2p	21,6
Zn2p	17,4	C1s	19,5	Zn2p	3,3	Ag3d	6,1
S2p	2,5	Ag3d	5,3	Si2p	2,3	Zn2p	3,6

5.2.8 Magnetometría de Muestra Vibrante (VSM)

Para ver las propiedades magnéticas de los nanomateriales sintetizados, se realizaron ciclos de histéresis a un campo magnético de 3T a temperatura ambiente, empleando la magnetometría de muestra vibrante (VSM por sus siglas en inglés). Después, se realizó un proceso de enfriado hasta una temperatura estable de 5 °K en presencia de un campo magnético de 3T, a lo cual se le denomina field-cooling. Con los resultados se dilucida la presencia de un exchange bias debido al desplazamiento asimétrico de los ciclos a 5K respecto al origen de las coordenadas. Este comportamiento, característico de un acoplamiento entre un núcleo ferromagnético y un recubrimiento antiferromagnético, nos puede servir para determinar la presencia de impurezas en la muestra. Los resultados muestran que los nanomateriales sintetizados tanto dopados como no dopados presentan ciclos ferromagnéticos, ya que se observa un campo coercitivo. Como es posible observar en la siguientes gráficas para las magnetitas se presenta un ligero “exchange bias”, lo cual se puede deber a la presencia de trazas residuales de hematita (α -Fe₂O₃)¹²³. Adicionalmente para el mismo gráfico se observa un valor de magnetización de 131 emu/g a 3T, lo cual es consistente con los valores reportados en la literatura para nanoestructuras de magnetitas oxidadas similares¹²⁴. En el caso de las ferritas de zinc el valor de magnetización es de 37 emu/g, el cual baja a 19 emu/g al introducir la plata, tal como se muestra en la figura a continuación.

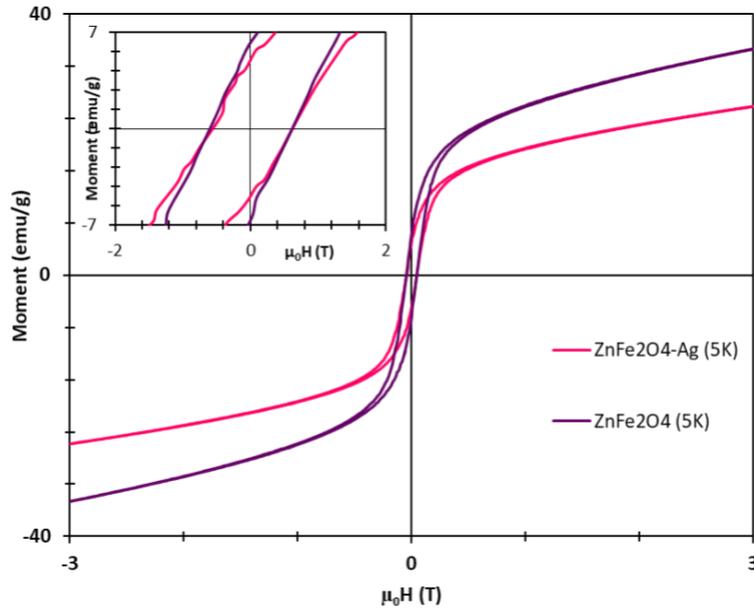


Figura 5-17. VSM Ferritas de Zinc a temperatura ambiente, dopadas con plata al 2% (w/w) y sin dopaje

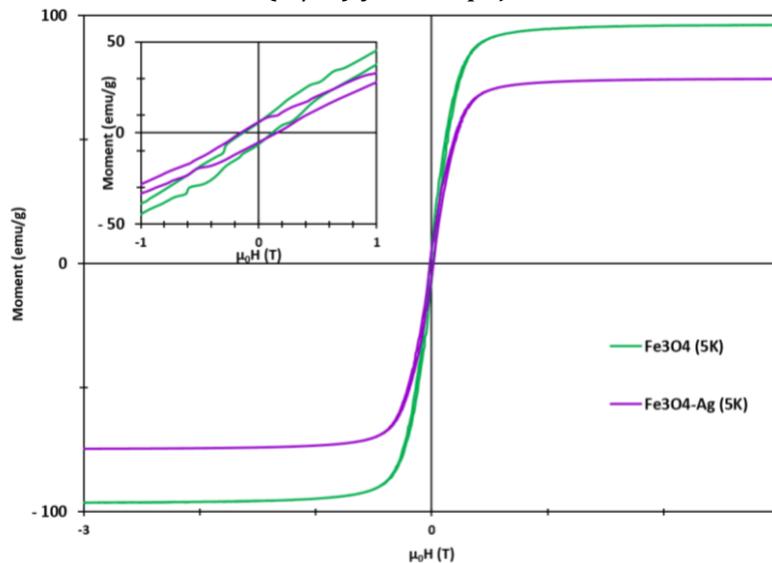


Figura 5-18. VSM Magnetitas a temperatura ambiente, dopadas con plata al 2% (w/w) y sin dopaje

En la estructura de las magnetitas las posiciones de los enlaces tetraédricos y octaédricos contribuyen a momentos magnéticos desiguales y anti paralelos. Lo que origina el comportamiento ferromagnético cuando el material se encuentra $< 585^{\circ}\text{C}$ (T° de Curie). Es decir que, los momentos magnéticos de los espines de los cationes trivalentes Fe^{3+} se anulan entre sí y no contribuyen a la magnetización del material, mientras que los cationes divalentes Fe^{2+} tienen sus momentos magnéticos y alineados en la misma dirección, haciendo entonces que toda la magnetización del NM se deba a estos últimos cationes⁶⁵.

5.3 Efecto de nanomateriales en microorganismos de interés.

Teniendo en cuenta todas las caracterizaciones hechas previamente a los nanomateriales sintetizados, se procede a evaluar los mejores nanomateriales sintetizados y dopados, en actividad catalítica bajo presencia de luz visible durante 24h (tal como se describe en la metodología experimental del presente documento). Identificando las concentraciones a las cuales se presenta toxicidad en cada microorganismo de interés y para cada nanomaterial (MIC). Por otro lado, se evidencia el ingreso de los nanomateriales a células eucariotas mediante microscopía confocal a partir del contacto directo entre los nanomateriales y la levadura durante 15 min, tal como se describe en la presente sección.

El presente esquema muestra de manera gráfica, la acción antibacterial de los nanomateriales sobre los microorganismos de interés.

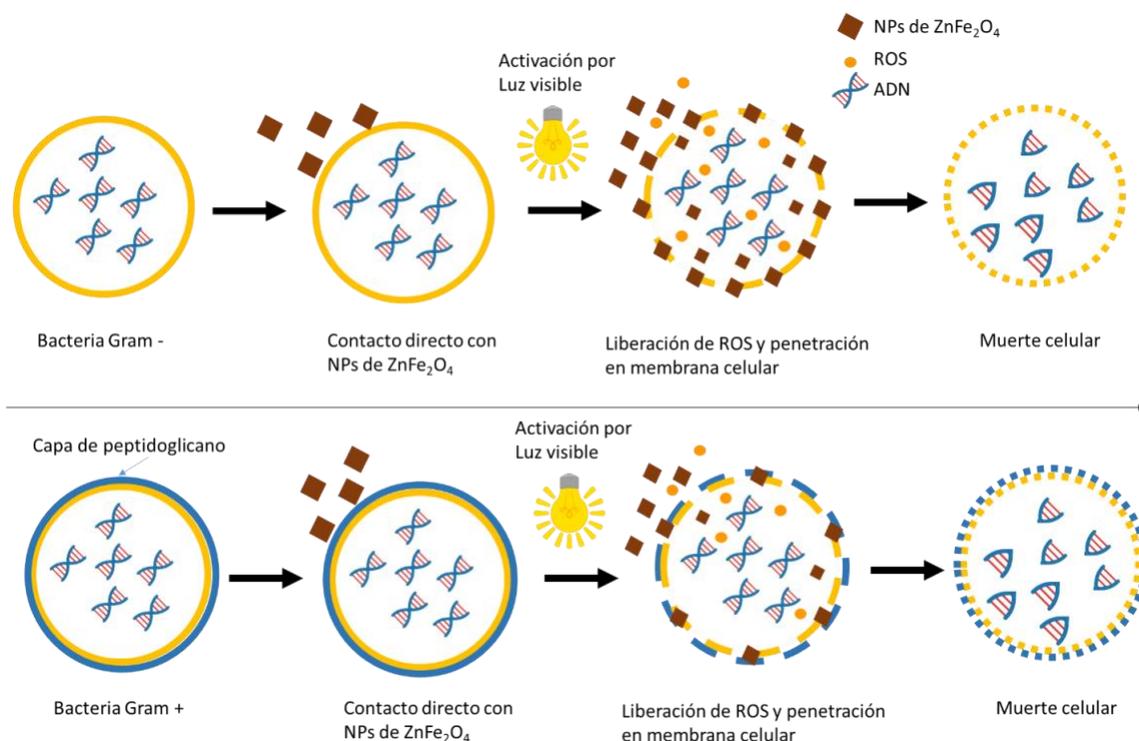


Figura 5-19. Esquema representativo de acción antibacteriana de nanomateriales sobre bacterias Gram + y Gram -. Elaboración propia.

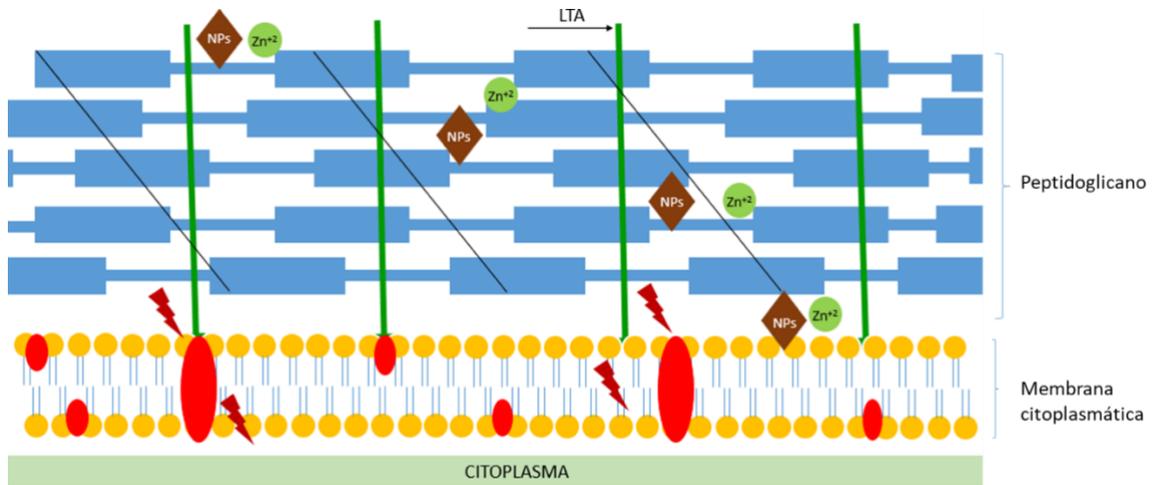


Figura 5-20. Pared celular de Bacteria Gram negativa. Elaboración propia

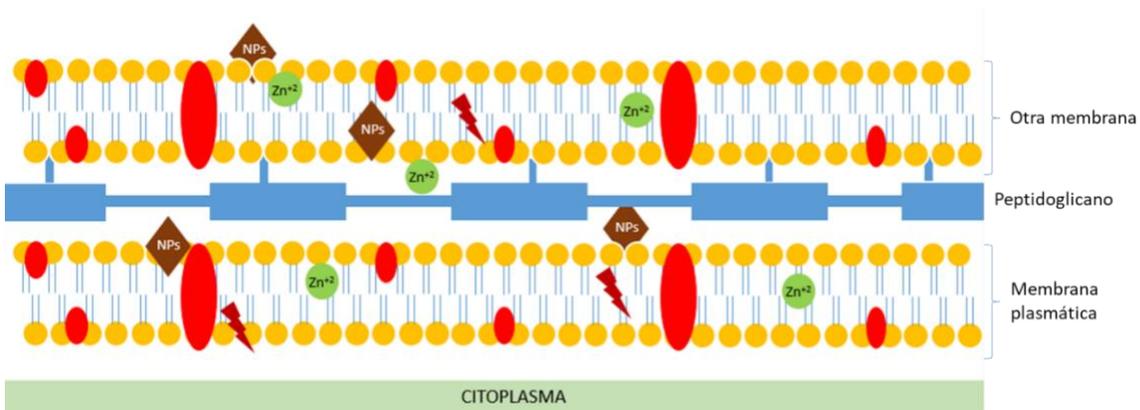


Figura 5-21. Pared celular de bacteria Gram positiva. Elaboración propia

5.3.1 Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)

Para la determinación de la concentración mínima a la cual los materiales resultan tóxicos a los microorganismos de interés, se procedió con la metodología descrita en la Figura 4-4, empleando los dos nanomateriales sintetizados y dopados al 2% con plata ($ZnFe_2O_4$, $ZnFe_2O_4-Ag$, Fe_3O_4 y Fe_3O_4-Ag). Estos materiales se aplicaron a las cepas bacterianas de interés previamente aisladas. Como indicador de crecimiento celular se usó la solución 10mM de INT (p-iodonitrotetrazolium chloride). La coloración roja indica crecimiento bacteriano, mientras que una muestra incolora indica inhibición de crecimiento de los microorganismos incubados. Se realizó triplicado de ensayo para cada material y bacteria.

A continuación se presentan los resultados obtenidos mediante la técnica estandarizada a lo largo de la investigación, para cada material y microorganismos de interés:

5.3.1.1 Ferritas de zinc ($ZnFe_2O_4$)

Tabla 5-9. MIC Ferritas de Zinc.

Gram	Cepa	Control	0	5	10	15	20	50	100	200	500
-	<i>Escherichia coli</i>	-	+	+	+	-	-				
VACIO DE CONTROL											
+	<i>Bacillus cereus</i>	-	+	+	+	+	-				
VACIO DE CONTROL											
-	<i>Salmonella typhi</i>	-	+	+	+	+	-				
VACIO DE CONTROL											
+	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	+	+	+	-				

Como se muestra en la tabla anterior a partir de una concentración de nanomaterial de ferritas de zinc de 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se tiene inhibición del crecimiento bacteriano para el microorganismo patógeno *Escherichia coli*, mientras que para que tenga lugar la inhibición de crecimiento celular de los microorganismos *Bacillus cereus*, *Salmonella Typhi* y *Staphylococcus aureus* la concentración del material necesaria es de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

5.3.1.2 Ferritas de zinc dopadas con Ag ($ZnFe_2O_4\text{-Ag}$) al 2% (w/w)

Tabla 5-10. MIC Ferritas de Zinc dopadas con Plata

Gram	Cepa	Control	0	5	10	15	20	50	100	200	500
-	<i>Escherichia coli</i>	-	+	+	-	-	-				
VACIO DE CONTROL											
+	<i>Bacillus cereus</i>	-	+	+	+	-	-				
VACIO DE CONTROL											
-	<i>Salmonella typhi</i>	-	+	+	-	-	-				
VACIO DE CONTROL											
+	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	+	+	-	-				

En la tabla anterior es posible evidenciar que la concentración necesaria para la inhibición del crecimiento celular para las enterobacterias Gram - *Escherichia coli* y *Salmonella Typhi* es de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que para inhibir el crecimiento celular de los microorganismos Gram+ *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*, fue necesaria una concentración del material dopado de 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La concentración de material necesario para la inhibición de crecimiento celular fue menor, respecto al nanomaterial de ferritas de zinc. Por tanto, se puede considerar como hipótesis un incremento del efecto antibacteriano de los nanomateriales dopados con plata en los microorganismos de interés.

5.3.1.3 Magnetitas (Fe₃O₄)

Tabla 5-11. MIC Magnetitas

Gram	Cepa	Control	0	5	10	15	20	50	100	200	500
-	<i>Escherichia coli</i>	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
VACIO DE CONTROL											
+	<i>Bacillus cereus</i>	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
VACIO DE CONTROL											
-	<i>Salmonella typhi</i>	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
VACIO DE CONTROL											
+	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-

A diferencia de las Tablas 5-10 y 5-9, la tabla anterior presenta los resultados obtenidos para las magnetitas sin dopaje, mostrando incremento en la concentración necesaria para la inhibición del crecimiento celular. Para la enterobacteria Gram - *Escherichia coli*, se presenta dicha inhibición a la concentración de 50µg/ml, mientras que para *Salmonella typhi* se presenta a los 20µg/ml. Por otro lado, para las bacterias Gram + *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*, la concentración a la cual se observa la inhibición de crecimiento celular se da a los 100µg/ml.

5.3.1.4 Magnetitas dopadas con Ag (Fe₃O₄-Ag) al 2% (w/w)

Tabla 5-12. MIC Magnetitas dopadas con plata

Gram	Cepa	Control	0	5	10	15	20	50	100	200	500
-	<i>Escherichia coli</i>	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
VACIO DE CONTROL											
+	<i>Bacillus cereus</i>	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
VACIO DE CONTROL											
-	<i>Salmonella typhi</i>	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
VACIO DE CONTROL											
+	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-

La tabla anterior presenta los resultados obtenidos para las magnetitas dopadas, observando que se mantiene casi constante la concentración necesaria para la inhibición del crecimiento celular en relación con el nanomaterial de magnetitas sin dopaje con plata. Para las enterobacterias Gram - *Escherichia coli* y *Salmonella typhi* se presenta dicha inhibición a la concentración de 50µg/ml. Por otro lado, para las bacterias Gram + *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*, la concentración a la cual se observa la inhibición de crecimiento celular se da a los 100µg/ml.

5.3.1.5 Compilados de todos los nanomateriales

A continuación se presentan los resultados gráficos y tabulados de todos los nanomateriales sintetizados y evaluados en el MIC para las cuatro bacterias de interés.

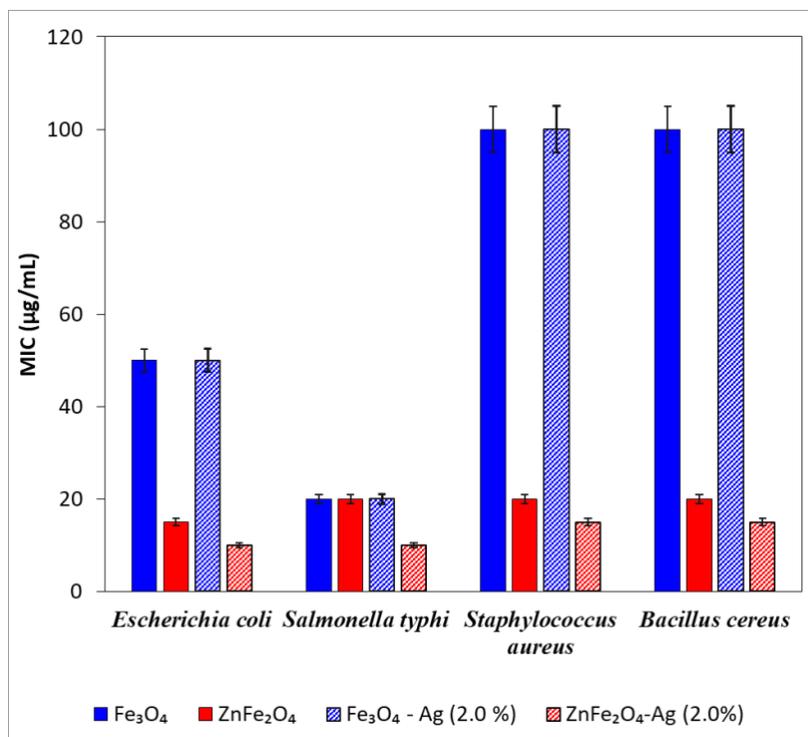


Figura 5-22. Resultados MIC en bacterias de interés por nanomateriales sintetizados.

Tabla 5-13. Concentración mínima inhibitoria de nanomaterial [µM] a cada cepa bacteriana.

NMs/ Cepa	Gram positivas		Gram negativas	
	<i>Bacillus Cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhi</i>
ZnFe ₂ O ₄	82.96	82.96	62.22	82.96
Fe ₃ O ₄	414.82	414.82	207.41	82.96
ZnFe ₂ O ₄ -Ag	62.22	62.22	41.48	41.48
Fe ₃ O ₄ - Ag	414.82	414.82	207.41	82.96

Como se evidencia en los resultados anteriores, las bacterias Gram negativas (*E. coli* y *S. typhi*) son más sensibles a los nanomateriales dopados y no dopados, es decir, que se requiere menos material para que se presente el efecto de inhibición bacteriana, lo cual con base en revisión bibliográfica, se debe a un alto contenido de cardiolipinas cargadas negativamente presentes en la membrana celular ¹²⁵. Por otro lado, las bacterias Gram + (*S. aureus* y *B. cereus*) son más resistentes a la acción de los nanomateriales debido al grosor de la capa de peptidoglicano entre 20 y 80 nm ^{125 126}, identificando entonces la capa de peptidoglicano como factor diferenciador y determinante en la concentración de material requerido para que se presente inhibición de crecimiento celular en las bacterias requeridas.

Fue posible evidenciar que los cuatro nanomateriales sintetizados presentan efecto de inhibición de crecimiento celular sobre las cuatro cepas bacterianas de interés. Sin embargo el efecto de inhibición de crecimiento celular en dichas cepas se presentó a concentraciones más bajas para el nanomaterial de ferritas de zinc dopadas con plata ($ZnFe_2O_4-Ag$), siguiéndolo el material de ferritas de zinc sin dopaje ($ZnFe_2O_4$), posteriormente el material de magnetitas dopado con plata (Fe_3O_4-Ag) y finalmente el material de magnetitas sin dopaje. Del mismo modo, se determinó que para el material de ferritas de zinc dopadas con plata se requieren entre 1.3 y 2 veces la concentración de material para las bacterias Gram + en relación a las bacterias Gram -. En el caso de las magnetitas dopadas con plata se requieren entre 2 y 5 veces la concentración de material de ferritas de zinc dopadas con plata, para que se presente el efecto de inhibición bacteriana en las cepas Gram +. Por lo tanto, el orden de resultados en orden de efecto de inhibición es $ZnFe_2O_4-Ag > ZnFe_2O_4 > Fe_3O_4-Ag > Fe_3O_4$.

Estos resultados muestran que la plata refuerza la actividad antibacteriana de los nanomateriales, ya que las nanopartículas de plata producen iones Ag^+ los cuales interactúan con los grupos tiol de las proteínas ¹²⁷. Esto, también incrementa el estrés oxidativo en las bacterias e interrumpe la reducción celular del O_2 ^{128 129}, generando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), las cuales contribuyen a la muerte celular.

Varios estudios previos han mostrado que la forma de interacción entre las nanopartículas y las bacterias se presenta de dos formas, ya sea, por la ubicación o posicionamiento de las nanopartículas en la superficie de la célula o en el citoplasma; en segundo lugar por la generación de ROS ¹³⁰ los cuales causan daño al ADN de las células ¹³¹ por la inactivación de sus proteínas o intercalando las bases de purina y pirimidina ^{132 127}. Por lo tanto, ya que las nanopartículas de $ZnFe_2O_4-Ag$ en presencia de luz visible producen pares de electrón-hueco que en medio acuoso (en el cual se encuentra la célula) produce especies reactivas de oxígeno tales como H_2O_2 , OH , O_2^- ,

HO₂ las cuales generan estrés oxidativo en la célula causando su muerte. Sin embargo, vale la pena mencionar que los radicales hidroxilo y superóxidos se encuentran negativamente marcados y no pueden penetrar la membrana celular, mientras que el H₂O₂ sí puede. ⁸⁴

5.4 Microscopia confocal

Para ver el ingreso de los nanomateriales en una estructura celular, se emplearon levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, poniendo en contacto directamente los NMs sintetizados y las levaduras previamente incubadas (durante 24h a temperatura ambiente), en relación 1 a 1, tal como se describe en la etapa experimental del presente documento. La Figura 4-21 evidencia la estructura esférica de las levaduras; el color azul representa el material de ferritas de Zinc (a) a 405 nm, también se evidencian las células de levadura y su estructura esférica (b), y es posible ver la transposición del material de ferritas de zinc dopado con plata al 2% (w/w) dentro de la estructura celular (c). Esta imagen permite ver que el material ingresa a la célula mediante el proceso de endocitosis y es homogéneamente distribuido dentro de la misma, de acuerdo con resultados previamente reportados para otros materiales ^{133 134}. Se presenta el mismo mecanismo de ingreso a las células de *Saccharomyces cerevisiae* para el nanomaterial de magnetita dopado con plata al 2% (w/w), Figura 4-21 (d).

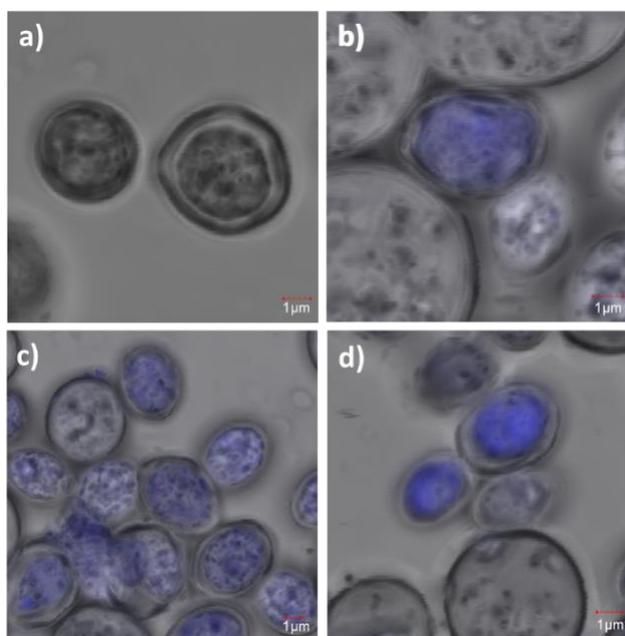


Figura 5-23. Microscopía confocal obtenida a una longitud de onda de 405 nm, con escala a 1 μm en cada imagen. *Saccharomyces cerevisiae* para diferentes nanomateriales. a) NPs Ferrita de Zinc b) Célula de *Saccharomyces cerevisiae* con Magnetita c) NPs Ferritas de Zinc dentro de estructura celular *Saccharomyces cerevisiae* d) NPs de Magnetita dentro de *Saccharomyces cerevisiae*.

6 Capítulo: Conclusiones y perspectivas

6.1 Conclusiones

1. La síntesis de nanopartículas de ferritas de zinc y magnetitas mediante técnica hidrotermal permitió obtener octaedros definidos para las NPs de ZnFe_2O_4 , con estructura cristalina centrada en las caras (fcc); y octaedros truncados para las NPs de Fe_3O_4 .
2. El dopaje con plata a diferentes porcentajes en relación peso/peso (w/w) (1%, 1.5%, 2% y 2.5%) en las NPs de ferritas de zinc, permitió identificar que el mejor dopaje, debido a la distribución uniforme de las NPs de Ag en la superficie de las NPs de ZnFe_2O_4 , fue al 2%. Con estos resultados, se procedió a dopar las NPs de Fe_3O_4 a este porcentaje.
3. La caracterización física y química de los nanomateriales dopados y sin dopar, mediante las técnicas XRD, TEM, SEM, HRTEM, XPS, VSM, ICP, permitió identificar diferentes características fisicoquímicas asociadas a la morfología, estructura, distribución y dopaje de las nanopartículas. Todo ello permitió relacionar las propiedades fisicoquímicas de las NPs con el efecto de desinfección sobre los microorganismos de interés.
4. La evaluación de la actividad antibacteriana en las cuatro cepas bacterianas de interés de los nanomateriales sintetizados ZnFe_2O_4 y Fe_3O_4 sin dopar, y dopados con plata al 2% (w/w) $\text{ZnFe}_2\text{O}_4\text{-Ag}$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Ag}$, se llevó a cabo mediante la técnica de concentración mínima inhibitoria (MIC). Esto permitió generar la correlación entre la concentración de los nanomateriales y la morfología de las bacterias. Identificándose que las bacterias Gram negativas: *Escherichia coli* y *Salmonella Typhi*, son más sensibles a la acción de los nanomateriales que las bacterias Gram positivas *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*.
5. El uso de células eucariotas para visualizar el ingreso de las NPs sintetizadas a nivel celular, permitió mostrar que todas las NPs sintetizadas y dopadas ingresan a la célula y están dispersas por todo el citoplasma celular, sin presentarse acumulación en ninguna unidad funcional de la célula. Esto permite, generar estrés oxidativo en todo el interior celular causando su muerte.
6. Debido a la actividad fotocatalítica antibacteriana bajo luz visible artificial que presentaron las NPs sintetizadas y dopadas en las cepas de interés, es posible

aceptar la hipótesis de emplear focos convencionales para la inhibición de crecimiento bacteriano en agua contaminada con estos patógenos.

7. A partir del desarrollo de esta investigación, es posible decir que el mejor efecto de inhibición de crecimiento celular se presenta con el nanomaterial de ferritas de zinc dopado al 2% de plata (w/w) para las bacterias Gram negativas, mientras aunque también se presenta efecto de inhibición de crecimiento celular con el mismo material para las bacterias Gram positivas, se requiere una mayor concentración. Asimismo, aunque las magnetitas presentan efecto de inhibición de crecimiento para las bacterias de interés, se requiere entre dos y cinco veces una concentración más elevada de nanomaterial (en relación con $\text{ZnFe}_2\text{O}_4\text{-Ag}$). Por tanto, se recomienda emplear $\text{ZnFe}_2\text{O}_4\text{-Ag}$.
8. Finalmente es importante evidenciar que emplear los nanomateriales como métodos de desinfección en pequeña escala, es una alternativa efectiva a los métodos de desinfección convencionales. Los nanomateriales mostraron inhibición de crecimiento celular en los microorganismos patógenos de interés a partir de su activación por luz visible, y también presentaron comportamiento magnético para su posible recuperación por campos magnéticos externos. Sin embargo hay que tener en cuenta que el presente estudio se realizó a escala laboratorio, y que la aplicación de los nanomateriales a gran escala, se encuentra en desarrollo, bajo las condiciones de tecnología y economía actuales. Por otro lado, no se descarta su posible aplicación a gran escala en unos años, debido a la mejora de métodos de síntesis de nanopartículas.

6.2 Perspectivas

1. Para mejorar la producción de ROS, se podría agregar H_2O_2 al medio en el que se encuentran las bacterias, identificando la concentración a la cual se puede presentar un sistema de oxidación tipo fenton y con esto la posibilidad de no solo tener acción de inhibición de crecimiento celular por la acción de la luz en la superficie de los nanomateriales sino también por la oxidación del Fe^{3+} sin presencia de luz.
2. Teniendo en cuenta que se ha reportado que algunas ferritas (MnFe_2O_4 , CuFe_2O_4 , CoFe_2O_4 y Fe_3O_4) pueden ser efectivas en procesos de fotocatalisis en sistemas tipo fenton en un pH neutro a básico ⁶⁴, se recomienda realizar un análisis de dependencia de pH del medio de catálisis, bajo la presencia de ferritas y H_2O_2 en el proceso de inhibición bacteriana para cepas de interés.

3. La técnica VSM permitió identificar que las NPs empleadas en la evaluación de actividad antibacteriana, presentan propiedades magnéticas que permiten su recuperación. Sin embargo, es necesario continuar la investigación para evaluar el efecto de las mismas sobre las bacterias de interés cuando se reúsen.

7 Referencias

1. Bryan A, Youngster I, McAdam AJ. Shiga Toxin Producing Escherichia coli. *Clin Lab Med.* 2015 Jun;35(2):247-72.
2. Comisión Nacional del Agua, C. N. d., Estadísticas del Agua en México Edición 2017. SEMARNAT, Ed. 2017.
3. (a) Andersen, E. S.; Dong, M.; Nielsen, M. M.; Jahn, K.; Subramani, R.; Mamdouh, W.; Golas, M. M.; Sander, B.; Stark, H.; Oliveira, C. L. P.; Pedersen, J. S.; Birkedal, V.; Besenbacher, F.; Gothelf, K. V.; Kjems, J., Self-assembly of a nanoscale DNA box with a controllable lid. *Nature* **2009**, 459 (7243), 73-U75; (b) Howard, K. A.; Kjems, J., Polycation-based nanoparticle delivery for improved RNA interference therapeutics. *Expert Opinion on Biological Therapy* **2007**, 7 (12), 1811-1822.
4. (a) Vallet-Regi, M.; Ramila, A.; del Real, R. P.; Perez-Pariente, J., A new property of MCM-41: Drug delivery system. *Chem. Mater.* **2001**, 13 (2), 308-311; (b) Vallet-Regi, M.; Balas, F.; Arcos, D., Mesoporous materials for drug delivery. *Angewandte Chemie-International Edition* **2007**, 46 (40), 7548-7558.
5. (a) Geszke-Moritz, M.; Piotrowska, H.; Murias, M.; Balan, L.; Moritz, M.; Lulek, J.; Schneider, R., Thioglycerol-capped Mn-doped ZnS quantum dot bioconjugates as efficient two-photon fluorescent nano-probes for bioimaging. *Journal of Materials Chemistry B* **2013**, 1 (5), 698-706; (b) Geszke, M.; Murias, M.; Balan, L.; Medjandi, G.; Korczynski, J.; Moritz, M.; Lulek, J.; Schneider, R., Folic acid-conjugated core/shell ZnS:Mn/ZnS quantum dots as targeted probes for two photon fluorescence imaging of cancer cells. *Acta Biomaterialia* **2011**, 7 (3), 1327-1338.
6. Behera, A.; Kandi, D.; Majhi, S. M.; Martha, S.; Parida, K., Facile synthesis of ZnFe₂O₄ photocatalysts for decolourization of organic dyes under solar irradiation. *Beilstein J Nanotechnol* **2018**, 9 (1), 436-446.
7. Fontal, B.; Suárez, T.; Reyes, M., El espectro electromagnético y sus aplicaciones. *Escuela de La Ingeniería* **2005**, 1, 24.
8. (a) Jiang, W.; Mashayekhi, H.; Xing, B., Bacterial toxicity comparison between nano- and micro-scaled oxide particles. *Environ. Pollut.* **2009**, 157 (5), 1619-1625; (b) Liu, Y.; He, L.; Mustapha, A.; Li, H.; Hu, Z. Q.; Lin, M., Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against Escherichia coli O157:H7. *Journal of Applied Microbiology* **2009**, 107 (4), 1193-1201.
9. AGUILAR, C. A. H. Aplicación De Nano Materiales De TiO₂ Modificado Con Magnetita Y Dopado Con Au O Ag Para La Oxidación Fotoquímica De Contaminantes Aromáticos. Universidad Nacional Autónoma De México, 2015.

10. Khan, M. H.; Unnikrishnan, S.; Ramalingam, K., Bactericidal potential of silver-tolerant bacteria derived silver nanoparticles against multi drug resistant ESKAPE pathogens. *Biocatalysis and agricultural biotechnology* **2019**, *18*, 100939.
11. PNUMA, Las Aguas Residuales Municipales Como Fuentes Terrestres De Contaminación De La Zona Marino-Costera En La Región De América Latina Y El Caribe. **2001**, 30.
12. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996. 1996.
13. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Norma Oficial Mexicana NOM-003-SEMARNAT-1997. **1997**.
14. Organización Mundial de la Salud, Water sanitation hygiene, 7. Aspectos microbiológicos. 2018.
15. Ríos-Tobón, S.; Agudelo-Cadavid, R. M.; Gutiérrez-Builes, L. A., Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública* **2017**, *35* (2), 236-247.
16. Pérez Portuondo, I., Bacillus cereus y su papel en las intoxicaciones alimentarias. *Rev Cubana Salud Pública* **2012**, *38* (1), 98-108.
17. Vargas Flores, T.; Villazante Condori, L. G., Clasificación de los Microorganismos. *Revista de Actualización Clínica Investiga* **2014**, *44*, 2309.
18. Pérez, M.; Mota, M., Morfología y estructura bacteriana. *Revista en internet* **2000**, *3* (2), 23-42.
19. University, R., Creative Commons. In *Biology*, CNX Author: 2019.
20. Fox, A., Estrutura do peptidoglicano de E. coli. coli, E. d. p. d. E., Ed. MEMBRANA CELULAR, ESPOROS E BIOSÍNTESE MACROMOLECULAR, 2015.
21. Lowy, F. D., Staphylococcus aureus infections. *New England journal of medicine* **1998**, *339* (8), 520-532.
22. Liu, G. Y.; Essex, A.; Buchanan, J. T.; Datta, V.; Hoffman, H. M.; Bastian, J. F.; Fierer, J.; Nizet, V., Staphylococcus aureus golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *Journal of Experimental Medicine* **2005**, *202* (2), 209-215.
23. Clark, M., Food Poisoning Outbreaks and Litigation: Surveillance and Analysis. In *Food Poison Journal* 2019; Vol. 2019.
24. PRESSE, I. S. D., Infections nosocomiales : la bactérie Bacillus cereus peut aussi en être la cause. *Inserm la science pour la santé* 2018.

25. Buttiaux, R.; GAUDIER, B.; LE, L. M.; LE, S. M.; NICOLLE, P., Epidemiologic research on gastroenteritis due to *Escherichia coli* in a hospital in northern France. *Archives des maladies de l'appareil digestif et des maladies de la nutrition* **1956**, 45 (10), 225-247.
26. Cler, U., Health, *E. coli*. 2002.
27. Clark, M., Food Poison Journal. 2015.
28. SEMARNAT, Compendio de estadísticas ambientales 2008.
29. Comisión Nacional del Agua, Manual de Agua Potable, Alcantarillado y Saneamiento. Operación y Mantenimiento de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales Municipales: Lodos Activados 2016.
30. Comisión Nacional del Agua, *Manual de Agua Potable, Alcantarillado y Saneamiento. Diseño de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales Municipales: Reactores Anaerobios de Flujo Ascendente*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales: 2016; Vol. 28.
31. Ellis, K., Water disinfection: a review with some consideration of the requirements of the third world. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **1991**, 20 (5-6), 341-407.
32. Doménech, J., Ozono frente a cloro: desinfección y desinfectantes del agua para consumo humano. *Offarm: farmacia y sociedad* **2004**, 23 (5), 120-126.
33. Sobotka, J., The efficiency of water treatment and disinfection by means of ultraviolet radiation. *Water Science and Technology* **1993**, 27 (3-4), 343-346.
34. Gehrke, I.; Geiser, A.; Somborn-Schulz, A., Innovations in nanotechnology for water treatment. *Nanotechnology, science and applications* **2015**, 8, 1.
35. Qu, X.; Alvarez, P. J.; Li, Q., Applications of nanotechnology in water and wastewater treatment. *Water research* **2013**, 47 (12), 3931-3946.
36. Lu, C.; Chiu, H.; Bai, H., Comparisons of adsorbent cost for the removal of zinc (II) from aqueous solution by carbon nanotubes and activated carbon. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2007**, 7 (4-5), 1647-1652.
37. Deliyanni, E. A.; Bakoyannakis, D. N.; Zouboulis, A. I.; Matis, K. A., Sorption of As(V) ions by akaganeite-type nanocrystals. *Chemosphere* **2003**, 50 (1), 155-163.
38. Yaqoob, A. A.; Parveen, T.; Umar, K.; Mohamad Ibrahim, M. N., Role of nanomaterials in the treatment of wastewater: a review. *Water* **2020**, 12 (2), 495.

39. Li, Q. L.; Mahendra, S.; Lyon, D. Y.; Brunet, L.; Liga, M. V.; Li, D.; Alvarez, P. J. J., Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications. *Water Research* **2008**, *42* (18), 4591-4602.
40. Agency, U. S. E. P., Technical Fact Sheet - Nanomaterials 2017.
41. Jeevanandam, J.; Barhoum, A.; Chan, Y. S.; Dufresne, A.; Danquah, M. K., Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein J Nanotechnol* **2018**, *9*, 1050-1074.
42. Kumar, N.; Kumbhat, S., Essentials in nanoscience and nanotechnology. **2016**.
43. (INSHT), I. N. d. S. e. H. e. e. T., *Seguridad y salud en el trabajo con nanomateriales*. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT): 2015.
44. Edvinsson, T., Optical quantum confinement and photocatalytic properties in two-, one- and zero-dimensional nanostructures. *Royal Society open science* **2018**, *5* (9), 180387.
45. Chassaing, P.-M. Quelques illustrations du rôle de la surface dans des nanoparticules de ZnO. Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier, 2009.
46. Yan, R.; Sun, X.; Wang, X.; Peng, Q.; Li, Y., Crystal structures, anisotropic growth, and optical properties: controlled synthesis of lanthanide orthophosphate one-dimensional nanomaterials. *Chemistry—A European Journal* **2005**, *11* (7), 2183-2195.
47. Gruber, B., The relationship between reduced cells in a general Bravais lattice. *Acta Crystallographica Section A: Crystal Physics, Diffraction, Theoretical and General Crystallography* **1973**, *29* (4), 433-440.
48. Wyckoff, R. W., Crystal structures, 1: New York, Fluorite structure. *New York, Interscience Publishers* **1963**, 239-444.
49. Wolf, D., Structure-energy correlation for grain boundaries in FCC metals—I. Boundaries on the (111) and (100) planes. *Acta metallurgica* **1989**, *37* (7), 1983-1993.
50. Pearton, S.; Abernathy, C.; Overberg, M.; Thaler, G.; Norton, D.; Theodoropoulou, N.; Hebard, A.; Park, Y.; Ren, F.; Kim, J., Wide band gap ferromagnetic semiconductors and oxides. *Journal of Applied Physics* **2003**, *93* (1), 1-13.
51. Olleros, J. C. Aplicación de la fotocatalisis solar a la degradación de contaminantes orgánicos en fase acuosa con catalizadores nanoestructurados de TiO₂. Universidad Autónoma de Madrid, 2013.
52. Wu, W.; Jiang, C.; Roy, V. A., Recent progress in magnetic iron oxide-semiconductor composite nanomaterials as promising photocatalysts. *Nanoscale* **2015**, *7* (1), 38-58.

53. Vinu, R.; Madras, G., Environmental remediation by photocatalysis. *Journal of the Indian Institute of Science* **2012**, *90* (2), 189-230.
54. Koprivanac, N.; Kušić, H., *Hazardous organic pollutants in colored wastewaters*. Nova Science Publishers, Inc.: 2009.
55. Aguirre, G. E. M.; PAUKER, C. F. S., Estudio de la degradación fotocatalítica de colorantes azoicos con el uso de dióxido de titanio (TiO₂) y óxido de zinc (ZnO) inmovilizados en soportes poliméricos. **2016**.
56. Carvajal, J. F. M.; Miranda, E. A. C.; Gil, S. V.; García, A. M. M.; Baena, Ó. J. R., Síntesis y caracterización de la Espinela FeCr₂O₄. *Producción+ Limpia* **2015**, *10* (1).
57. Sripriya, R.; Vigneaswari, B.; Raj, V. A., Comparative Studies of Magneto-Optical and Photocatalytic Properties of Magnetically Recyclable Spinel ZnFe₂O₄ Nanostructures by Combustion Methods. *International Journal of Nanoscience* **2019**, *18* (02), 1850020.
58. García, M. R. Síntesis y caracterización de nanopartículas magnéticas de ferrita de zinc para tratamientos combinados en biomedicina universidad autónoma de madrid, 2018.
59. Goya, G.; Rechenberg, H.; Chen, M.; Yelon, W., Magnetic irreversibility in ultrafine ZnFe₂O₄ particles. *Journal of Applied Physics* **2000**, *87* (11), 8005-8007.
60. Atif, M.; Hasanain, S.; Nadeem, M., Magnetization of sol-gel prepared zinc ferrite nanoparticles: effects of inversion and particle size. *Solid State Communications* **2006**, *138* (8), 416-421.
61. Lu, A. H.; Salabas, E. e. L.; Schüth, F., Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46* (8), 1222-1244.
62. García, M. R. síntesis y caracterización de nanopartículas magnéticas de ferrita de zinc para tratamientos combinados en biomedicina. universidad autónoma de madrid, 2018.
63. Mandal, S.; Natarajan, S.; Tamilselvi, A.; Mayadevi, S., 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* **2016**, *4* (3), 2706-2712.
64. Casbeer, E.; Sharma, V. K.; Li, X.-Z., Synthesis and photocatalytic activity of ferrites under visible light: a review. *Separation and Purification Technology* **2012**, *87*, 1-14.

65. Noval, V. E.; Ochoa Puentes, C.; Carriazo, J. G., Magnetita (Fe₃O₄): Una estructura inorgánica con múltiples aplicaciones en catálisis heterogénea. *Revista Colombiana de Química* **2017**, *46* (1), 42-59.
66. Xie, Y.; He, Y.; Irwin, P. L.; Jin, T.; Shi, X., Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Zinc Oxide Nanoparticles against *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology* **2011**, *77* (7), 2325-2331.
67. Dimapilis, E. A. S.; Hsu, C.-S.; Mendoza, R. M. O.; Lu, M.-C., Zinc oxide nanoparticles for water disinfection. *Sustainable Environment Research* **2018**, *28* (2), 47-56.
68. Reddy, K. M.; Feris, K.; Bell, J.; Wingett, D. G.; Hanley, C.; Punnoose, A., Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems. *Applied physics letters* **2007**, *90* (21), 213902.
69. Sirelkhatim, A.; Mahmud, S.; Seeni, A.; Kaus, N. H. M.; Ann, L. C.; Bakhori, S. K. M.; Hasan, H.; Mohamad, D., Review on zinc oxide nanoparticles: antibacterial activity and toxicity mechanism. *Nano-Micro Letters* **2015**, *7* (3), 219-242.
70. Baker, C.; Pradhan, A.; Pakstis, L.; Pochan, D. J.; Shah, S. I., Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol* **2005**, *5* (2), 244-9.
71. Padmavathy, N.; Vijayaraghavan, R., Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles-an antimicrobial study. *Science and technology of advanced materials* **2008**, *9* (3), 035004.
72. Tayel, A. A.; El-Tras, W. F.; Moussa, S.; El-Baz, A. F.; Mahrous, H.; Salem, M. F.; Brimer, L., ANTIBACTERIAL ACTION OF ZINC OXIDE NANOPARTICLES AGAINST FOODBORNE PATHOGENS. *Journal of Food Safety* **2011**, *31* (2), 211-218.
73. Heinlaan, M.; Ivask, A.; Blinova, I.; Dubourguier, H.-C.; Kahru, A., Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere* **2008**, *71* (7), 1308-1316.
74. Abdal Dayem, A.; Hossain, M. K.; Lee, S. B.; Kim, K.; Saha, S. K.; Yang, G.-M.; Choi, H. Y.; Cho, S.-G., The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Biological Activities of Metallic Nanoparticles. *Int J Mol Sci* **2017**, *18* (1), 120.
75. Huang, Y.-W.; Wu, C.-h.; Aronstam, R. S., Toxicity of transition metal oxide nanoparticles: recent insights from in vitro studies. *Materials* **2010**, *3* (10), 4842-4859.
76. Wilson, M. R.; Lightbody, J. H.; Donaldson, K.; Sales, J.; Stone, V., Interactions between ultrafine particles and transition metals in vivo and in vitro. *Toxicology and applied pharmacology* **2002**, *184* (3), 172-179.

77. Sioutas, C.; Delfino, R. J.; Singh, M., Exposure assessment for atmospheric ultrafine particles (UFPs) and implications in epidemiologic research. *Environmental health perspectives* **2005**, *113* (8), 947-955.
78. Donaldson, K.; Tran, C. L., Inflammation caused by particles and fibers. *Inhalation toxicology* **2002**, *14* (1), 5-27.
79. Oberdörster, G.; Maynard, A.; Donaldson, K.; Castranova, V.; Fitzpatrick, J.; Ausman, K.; Carter, J.; Karn, B.; Kreyling, W.; Lai, D., Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Particle and fibre toxicology* **2005**, *2* (1), 8.
80. Roduner, E., Size matters: why nanomaterials are different. *Chemical Society Reviews* **2006**, *35* (7), 583-592.
81. Yin, J.-J.; Liu, J.; Ehrenshaft, M.; Roberts, J. E.; Fu, P. P.; Mason, R. P.; Zhao, B., Phototoxicity of nano titanium dioxides in HaCaT keratinocytes—generation of reactive oxygen species and cell damage. *Toxicology and applied pharmacology* **2012**, *263* (1), 81-88.
82. Sharma, P.; Jha, A. B.; Dubey, R. S.; Pessarakli, M., Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of botany* **2012**, *2012*.
83. Xie, Y.; He, Y.; Irwin, P. L.; Jin, T.; Shi, X., Antibacterial activity and mechanism of action of zinc oxide nanoparticles against *Campylobacter jejuni*. *Applied and environmental microbiology* **2011**, *77* (7), 2325-2331.
84. Padmavathy, N.; Vijayaraghavan, R., Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles—an antimicrobial study. *Science and technology of advanced materials* **2008**, *9* (3), 035004.
85. Kim, J.; Lee, C. W.; Choi, W., Platinized WO₃ as an environmental photocatalyst that generates OH radicals under visible light. *Environmental science & technology* **2010**, *44* (17), 6849-6854.
86. Stewart, S.; Figueroa, S.; Sturla, M.; Scorzelli, R.; Garcia, F.; Requejo, F., Magnetic ZnFe₂O₄ nanoferrites studied by X-ray magnetic circular dichroism and Mössbauer spectroscopy. *Physica B: Condensed Matter* **2007**, *389* (1), 155-158.
87. Hou, Y.; Li, X.; Zhao, Q.; Quan, X.; Chen, G., Electrochemically assisted photocatalytic degradation of 4-chlorophenol by ZnFe₂O₄- modified TiO₂ nanotube array electrode under visible light irradiation. *Environmental science & technology* **2010**, *44* (13), 5098-5103.

88. Su, M.; He, C.; Sharma, V. K.; Asi, M. A.; Xia, D.; Li, X.-z.; Deng, H.; Xiong, Y., Mesoporous zinc ferrite: synthesis, characterization, and photocatalytic activity with H₂O₂/visible light. *Journal of hazardous materials* **2012**, *211*, 95-103.
89. Li, W.; Wang, Y.; Irini, A., Effect of pH and H₂O₂ dosage on catechol oxidation in nano-Fe₃O₄ catalyzing UV-Fenton and identification of reactive oxygen species. *Chemical Engineering Journal* **2014**, *244*, 1-8.
90. Dong, Y.; Zhu, H.; Shen, Y.; Zhang, W.; Zhang, L., Antibacterial activity of silver nanoparticles of different particle size against *Vibrio Natriegens*. *PloS one* **2019**, *14* (9).
91. Yang, H.; Ren, Y.-y.; Wang, T.; Wang, C., Preparation and antibacterial activities of Ag/Ag⁺/Ag₃⁺ nanoparticle composites made by pomegranate (*Punica granatum*) rind extract. *Results in physics* **2016**, *6*, 299-304.
92. Qing, Y. a.; Cheng, L.; Li, R.; Liu, G.; Zhang, Y.; Tang, X.; Wang, J.; Liu, H.; Qin, Y., Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies. *International journal of nanomedicine* **2018**, *13*, 3311-3327.
93. Wiley, B.; Sun, Y.; Mayers, B.; Xia, Y., Shape-controlled synthesis of metal nanostructures: the case of silver. *Chemistry–A European Journal* **2005**, *11* (2), 454-463.
94. Merga, G.; Wilson, R.; Lynn, G.; Milosavljevic, B. H.; Meisel, D., Redox catalysis on “naked” silver nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C* **2007**, *111* (33), 12220-12226.
95. Iravani, S.; Korbekandi, H.; Mirmohammadi, S. V.; Zolfaghari, B., Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Res Pharm Sci* **2014**, *9* (6), 385-406.
96. Unesco, Informe Mundial sobre el desarrollo de los recursos hídricos de las Naciones Unidas 2017: Las aguas residuales: el recurso desaprovechado, cifras y datos.
97. Li, J.; Wu, Q.; Wu, J., Synthesis of Nanoparticles via Solvothermal and Hydrothermal Methods. In *Handbook of Nanoparticles*, Aliofkhazraei, M., Ed. Springer International Publishing: Cham, 2015; pp 1-28.
98. López, A. R. Estudio de la síntesis y caracterización de nanopartículas de magnetita por métodos electroquímicos. Cidetew, 2012.
99. Aguilar, C. A. H.; Ramírez-Alejandre, A. A.; Pandiyan, T.; Arenas-Alatorre, J. A.; Reyes, I. A.; Corea, M., Crystal Phase Induced Band Gap Energy Enhancing Photocatalytic Properties of Zn-Fe₂O₄/Au NPs: Experimental and Theoretical studies. *Catalysis Science & Technology* **2019**.

100. Cho, G.-R.; Kim, D.-H.; Lee, D.-H., Facile Approach to Fabrication of Hollow ZnO Nanoparticles. *Composites Research* **2018**, *31* (3), 94-98.
101. Melo, F. M.; Almeida, S. d. N.; Uezu, N. S.; Ospina Ramirez, C. A.; dos Santos, A. D.; Toma, H. E., Extraction of Dysprosium Ions with DTPA Functionalized Superparamagnetic Nanoparticles Probed by Energy Dispersive X-ray Fluorescence and TEM/High-Angle Annular Dark Field Imaging. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2018**, *18* (6), 4155-4159.
102. Mahapatra, A. S.; Mitra, A.; Mallick, A.; Chakrabarti, P. K., XRD, HRTEM, magnetic, dielectric and enhanced microwave reflection loss of GaFeO₃ nanoparticles encapsulated in multi-walled carbon nanotubes. *Ceramics International* **2016**, *42* (3), 3826-3835.
103. (a) Hota, G.; Idage, S. B.; Khilar, K. C., Characterization of nano-sized CdS-Ag₂S core-shell nanoparticles using XPS technique. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2007**, *293* (1), 5-12; (b) Lynch, J., *Analyse physico-chimique des catalyseurs industriels: manuel pratique de caractérisation*. Editions Technip: 2001.
104. Zhang, H.; Zhu, G., One-step hydrothermal synthesis of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles immobilized on polyamide fabric. *Applied Surface Science* **2012**, *258* (11), 4952-4959.
105. Yu, J.; Xiang, Q.; Zhou, M., Preparation, characterization and visible-light-driven photocatalytic activity of Fe-doped titania nanorods and first-principles study for electronic structures. *Applied Catalysis B: Environmental* **2009**, *90* (3-4), 595-602.
106. Thomas, R., *Practical guide to ICP-MS: a tutorial for beginners*. CRC press: 2013.
107. Carroll, K. C.; Pfaller, M. A.; Landry, M. L.; McAdam, A. J.; Patel, R.; Richter, S. S.; Warnock, D. W., *Manual of Clinical Microbiology, Twelfth Edition*. American Society of Microbiology: 2019.
108. Lalitha, M., Manual on antimicrobial susceptibility testing. *Performance standards for antimicrobial testing: Twelfth Informational Supplement* **2004**, *56238*, 454-456.
109. Aguilar, C.; Jiménez, A.; Silva, A.; Kaur, N.; Thangarasu, P.; Ramos, J.; Singh, N., Organic-inorganic hybrid nanoparticles for bacterial inhibition: synthesis and characterization of doped and undoped ONPs with Ag/Au NPs. *Molecules* **2015**, *20* (4), 6002-6021.
110. Tran, Q. H.; Le, A.-T., Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology* **2013**, *4* (3), 033001.

111. Nakashima, S.; Fujita, K.; Tanaka, K.; Hirao, K.; Yamamoto, T.; Tanaka, I., First-principles XANES simulations of spinel zinc ferrite with a disordered cation distribution. *Physical Review B* **2007**, *75* (17), 174443.
112. Annamraju, K. V., Chapter 3 - Growth and Optical Properties of GaN. In *Semiconductors and Semimetals*, Willardson, R.; Nalwa, H. S., Eds. Elsevier: 2001; Vol. 73, pp 63-150.
113. Aguilar, C. Aplicación de nano materiales de tio₂ modificado con magnetita y dopado con au o ag para la oxidación fotoquímica de contaminantes aromáticos. investigación unam, méxico, d. f., 2015.
114. Horváth, J., Lattice-parameter measurements of PbHPO₄ single crystals by the ratio method. *Journal of applied crystallography* **1983**, *16* (6), 623-628.
115. Ding, C.; Zeng, Y.; Li, R.; Zhang, Y.; Zhao, L., Temperature-and time-tuned morphological evolution of polyhedral magnetite nanocrystals and their facet-dependent high-rate performance for lithium-ion batteries. *Journal of Alloys and Compounds* **2016**, *676*, 347-355.
116. Tong, G.; Du, F.; Wu, W.; Wu, R.; Liu, F.; Liang, Y., Enhanced reactive oxygen species (ROS) yields and antibacterial activity of spongy ZnO/ZnFe₂O₄ hybrid micro-hexahedra selectively synthesized through a versatile glucose-engineered co-precipitation/annealing process. *Journal of Materials Chemistry B* **2013**, *1* (20), 2647-2657.
117. Sertkol, M.; Köseoğlu, Y.; Baykal, A.; Kavas, H.; Bozkurt, A.; Toprak, M. S., Microwave synthesis and characterization of Zn-doped nickel ferrite nanoparticles. *Journal of Alloys and Compounds* **2009**, *486* (1-2), 325-329.
118. Jyoti, K.; Baunthiyal, M.; Singh, A., Characterization of silver nanoparticles synthesized using *Urtica dioica* Linn. leaves and their synergistic effects with antibiotics. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* **2016**, *9* (3), 217-227.
119. Bui, T. Q.; Ton, S. N.-C.; Duong, A. T.; Tran, H. T., Size-dependent magnetic responsiveness of magnetite nanoparticles synthesised by co-precipitation and solvothermal methods. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices* **2018**, *3* (1), 107-112.
120. Borade, R. M.; Somvanshi, S. B.; Kale, S. B.; Pawar, R. P.; Jadhav, K., Spinel zinc ferrite nanoparticles: an active nanocatalyst for microwave irradiated solvent free synthesis of chalcones. *Materials Research Express* **2020**, *7* (1), 016116.
121. Bera, S.; Prince, A.; Velmurugan, S.; Raghavan, P.; Gopalan, R.; Panneerselvam, G.; Narasimhan, S., Formation of zinc ferrite by solid-state reaction and its characterization by XRD and XPS. *Journal of materials science* **2001**, *36* (22), 5379-5384.

122. Wang, P. W.; Jiang, Y.; Hsu, J.-C.; Chen, Y.-Y.; Lin, Y.-H.; Chen, H.-L., Thermal effect on structure of silver in ion-exchanged soda-lime glasses and aluminum-doped zinc oxide films. *Advances in Materials Science and Engineering* **2011**, 2011.
123. Cortie, D. L.; Lin, K.-W.; Shueh, C.; Hsu, H.-F.; Wang, X.; James, M.; Fritzsche, H.; Brück, S.; Klose, F., Exchange bias in a nanocrystalline hematite/permalloy thin film investigated with polarized neutron reflectometry. *Physical Review B* **2012**, 86 (5), 054408.
124. Jotania, R. B.; Mahmood, S. H., *Magnetic Oxides and Composites*. Materials Research Forum LLC: 2018.
125. Rana, S.; Kalaichelvan, P., Antibacterial activities of metal nanoparticles. *Antibacterial Activities of Metal Nanoparticles* **2011**, 11 (02), 21-23.
126. Mehrotra, R. S., *Principles of Microbiology*. McGraw-Hill Education (India) Pvt Limited: 2009.
127. Jiménez, A. B. P.; Aguilar, C. A. H.; Ramos, J. M. V.; Thangarasu, P., Synergistic antibacterial activity of nanohybrid materials ZnO–Ag and ZnO–Au: synthesis, characterization, and comparative analysis of undoped and doped ZnO nanoparticles. *Australian Journal of Chemistry* **2015**, 68 (2), 288-297.
128. Yun'an Qing, L. C.; Li, R.; Liu, G.; Zhang, Y.; Tang, X.; Wang, J.; Liu, H.; Qin, Y., Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies. *International journal of nanomedicine* **2018**, 13, 3311.
129. Long, Y.-M.; Hu, L.-G.; Yan, X.-T.; Zhao, X.-C.; Zhou, Q.-F.; Cai, Y.; Jiang, G.-B., Surface ligand controls silver ion release of nanosilver and its antibacterial activity against Escherichia coli. *International journal of nanomedicine* **2017**, 12, 3193.
130. Raghupathi, K. R.; Koodali, R. T.; Manna, A. C., Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles. *Langmuir* **2011**, 27 (7), 4020-4028.
131. Storz, G.; Imlay, J. A., Oxidative stress. *Current Opinion in Microbiology* **1999**, 2 (2), 188-194.
132. Klueh, U.; Wagner, V.; Kelly, S.; Johnson, A.; Bryers, J., Efficacy of silver-coated fabric to prevent bacterial colonization and subsequent device-based biofilm formation. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials* **2000**, 53 (6), 621-631.
133. Mehta, V. N.; Jha, S.; Kailasa, S. K., One-pot green synthesis of carbon dots by using Saccharum officinarum juice for fluorescent imaging of bacteria (Escherichia coli) and

yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cells. *Materials Science and Engineering: C* **2014**, *38*, 20-27.

134. Hsu, P.-C.; Chang, H.-T., Synthesis of high-quality carbon nanodots from hydrophilic compounds: role of functional groups. *Chemical communications* **2012**, *48* (33), 3984-3986.

135. Database, A. M. C. S., Crystal structure database. 2020.

136. Cervera, S. S., *Prácticas de microbiología*. España, 1997; p 125.

8 ANEXOS

8.1 Datos de referencia de difracción de rayos X

A continuación se presentan los datos que se tomaron como referencia para el análisis de XRD de cada muestra. Reportados por la American Mineralogist Crystal Structure Database.

- Hoja 0002576, base de datos - ferritas de zinc 135

```
CELL PARAMETERS:  8.4418  8.4418  8.4418  90.000  90.000  90.000
SPACE GROUP: Fd3m
X-RAY WAVELENGTH:  1.541838
Cell Volume:      601.596
Density (g/cm3):  5.318
MAX. ABS. INTENSITY / VOLUME**2:  104.3202217
RIR: 6.387
```

RIR based on corundum from Acta Crystallographica A38 (1982) 733-739

2-THETA	INTENSITY	D-SPACING	H	K	L	Multiplicity
18.20	4.60	4.8739	1	1	1	8
29.94	36.06	2.9846	2	2	0	12
35.26	100.00	2.5453	3	1	1	24
36.88	7.28	2.4369	2	2	2	8
42.85	13.29	2.1105	4	0	0	6
53.15	12.59	1.7232	4	2	2	24
56.66	28.77	1.6246	5	1	1	24
56.66	5.68	1.6246	3	3	3	8
62.21	39.84	1.4923	4	4	0	12
70.56	4.68	1.3348	6	2	0	24
73.57	9.20	1.2874	5	3	3	24
74.57	3.46	1.2726	6	2	2	24
78.50	1.41	1.2185	4	4	4	8
86.22	5.79	1.1281	6	4	2	48
89.09	6.21	1.0990	5	5	3	24
89.09	8.25	1.0990	7	3	1	48

```
=====
XPOW Copyright 1993 Bob Downs, Ranjini Swaminathan and Kurt Bartelmehs
For reference, see Downs et al. (1993) American Mineralogist 78, 1104-1107.
```

- Hoja 000024945 , base de datos – Magnetitas 135

CELL PARAMETERS: 8.3958 8.3958 8.3958 90.000 90.000 90.000
 SPACE GROUP: Fd3m
 X-RAY WAVELENGTH: 1.541838
 Cell Volume: 591.815
 Density (g/cm3): 5.196
 MAX. ABS. INTENSITY / VOLUME**2: 92.49576045
 RIR: 5.796

RIR based on corundum from Acta Crystallographica A38 (1982) 733-739

2-THETA	INTENSITY	D-SPACING	H	K	L	Multiplicity
18.30	7.93	4.8473	1	1	1	8
30.11	28.10	2.9684	2	2	0	12
35.46	100.00	2.5314	3	1	1	24
37.09	8.27	2.4237	2	2	2	8
43.10	20.13	2.0989	4	0	0	6
53.47	9.59	1.7138	4	2	2	24
57.00	24.94	1.6158	5	1	1	24
57.00	6.40	1.6158	3	3	3	8
62.59	41.80	1.4842	4	4	0	12
71.00	3.54	1.3275	6	2	0	24
74.04	8.82	1.2803	5	3	3	24
75.05	3.94	1.2657	6	2	2	24
79.01	2.64	1.2118	4	4	4	8
86.81	3.92	1.1219	6	4	2	48
89.71	8.92	1.0930	7	3	1	48
89.71	5.54	1.0930	5	5	3	24

=====

XPOW Copyright 1993 Bob Downs, Ranjini Swaminathan and Kurt Bartelmehs
 reference, see Downs et al. (1993) American Mineralogist 78, 1104-1107.

- Hoja 0011135, base de datos - Plata 135

CELL PARAMETERS: 4.0862 4.0862 4.0862 90.000 90.000 90.000
 SPACE GROUP: Fm3m
 X-RAY WAVELENGTH: 1.541838
 Cell Volume: 68.227
 Density (g/cm3): 10.500
 MAX. ABS. INTENSITY / VOLUME**2: 564.9916129
 RIR: 17.521

RIR based on corundum from Acta Crystallographica A38 (1982) 733-739

2-THETA	INTENSITY	D-SPACING	H	K	L	Multiplicity
38.15	100.00	2.3592	1	1	1	8
44.34	46.77	2.0431	2	0	0	6
64.50	25.61	1.4447	2	2	0	12
77.47	27.18	1.2320	3	1	1	24
81.62	7.69	1.1796	2	2	2	8

=====

XPOW Copyright 1993 Bob Downs, Ranjini Swaminathan and Kurt Bartelmehs
 reference, see Downs et al. (1993) American Mineralogist 78, 1104-1107.

8.2 MANUAL DE SIEMBRA BACTERIANA

Para el manejo de las cepas bacterianas se siguió el procedimiento establecido de prácticas de microbiología para el manejo de muestras y toma de inóculo, el cual se describe a continuación ¹³⁶:

1. Esterilizar el objeto con el que se va a tomar el inóculo. Si se va a utilizar un asa o un hilo de platino, la esterilización se lleva a cabo por calentamiento en la llama de un mechero Bunsen hasta que el asa o el hilo se ponen al rojo vivo.
2. Esperar un tiempo corto hasta que el asa o el hilo se enfríen.
3. Retirar el tapón del tubo en el que se encuentra el microorganismo y flamear ligeramente la boca del tubo.
4. Introducir el asa o hilo estéril y frío en el tubo y tomar una pequeña porción del cultivo, tocando ligeramente la superficie del medio de cultivo.
5. Transferir el inóculo a otro medio de cultivo (flameando las bocas de los tubos, y trabajando en la proximidad de la llama)
6. Volver a flamear ligeramente la boca del tubo.
7. Volver a esterilizar el asa o el hilo antes de dejarlo sobre la mesa de trabajo.

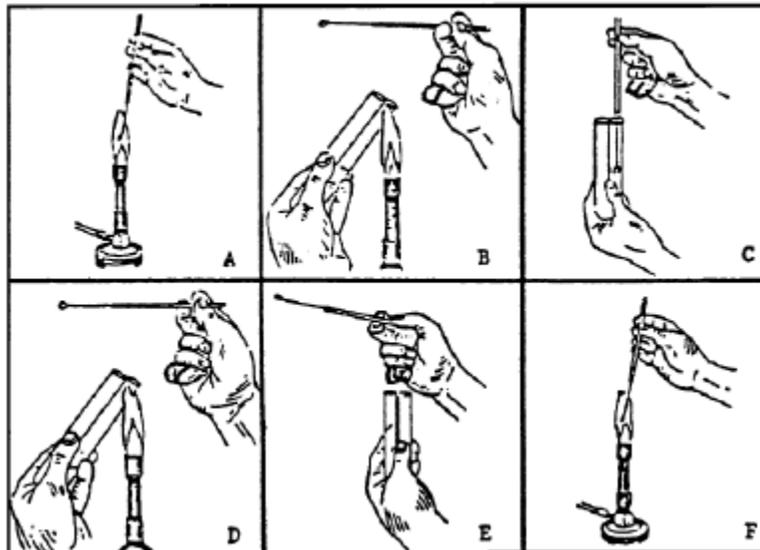


Figura 8-1. Demostración gráfica del manejo y toma de inóculo ¹³⁶

8.3 Tinción de Gram

Se realizó tinción de Gram en las cepas bacterianas, para identificar la morfología y distinción de bacterias Gram positivas y Gram negativas (Figura 7-4), siguiendo el procedimiento que se menciona a continuación ¹³⁶:

1. Con un asa de siembra tomar una colonia y extenderla en un porta objetos con el fin de preparar un frotis bacteriano, fijar la preparación
2. Teñir con cristal violeta durante 30 segundos.
3. Retirar el exceso de colorante
4. Añadir lugol, esperar un minuto
5. Decolorar con etanol al 95%, 20 segundos.
6. Lavar con agua.
7. Añadir el colorante de contraste, safranina, esperar 1 minuto.
8. Lavar con agua.
9. Observar al microscopio (x40, x100).

A continuación se presenta la descripción gráfica para la preparación de un frotis bacteriano para tinción.

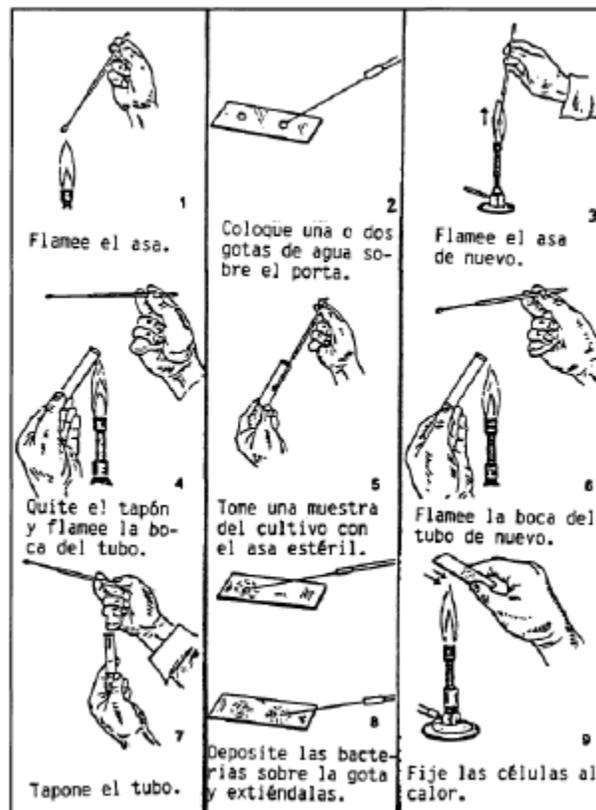


Figura 8-2. Demostración gráfica preparación de frotis bacteriano para tinción ¹³⁶

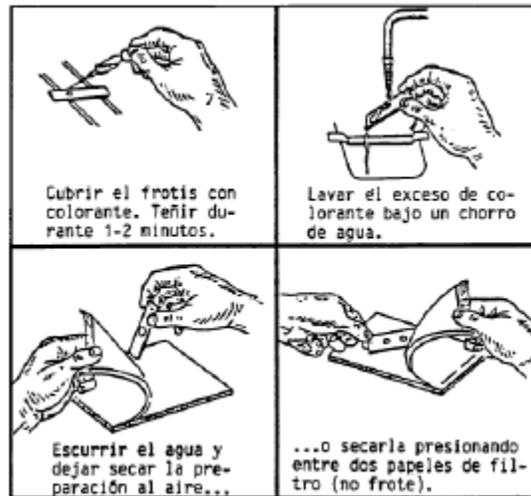


Figura 8-3. Demostraci3n gr3fica de metodolog3a para tinci3n simple 136

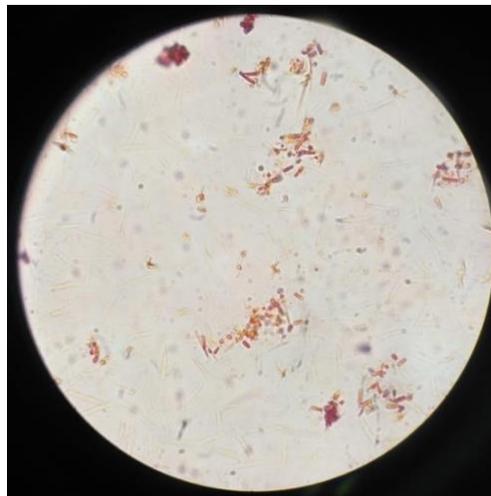


Figura 8-4. Demostraci3n gr3fica de metodolog3a para tinci3n simple. Figura propia

8.4 PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO

Para la propagaci3n de las cepas de inter3s, fue necesario emplear medios de cultivo selectivos, los cuales solo crecen las bacterias afines a cada medio, inhibiendo el crecimiento de otras microorganismos. Estos medios de cultivo, de manera comercial se encuentran liofilizados y es necesario rehidratarlos, de acuerdo a las concentraciones e instrucciones establecidas por el fabricante para cada caso.

En estos casos la preparación del medio de cultivo se reduce sencillamente a pesar la cantidad deseada del mismo y disolverla en agua destilada siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para llevar a cabo la preparación, se siguió el procedimiento que se menciona a continuación ¹³⁶:

1. Emplear agua destilada para la preparación del agar de acuerdo a las condiciones del fabricante.
2. Fundir y homogenizar el agar en el microondas y esterilizar.
3. Verter el agar en las cajas de Petri en un ambiente aséptico, es decir cerca a la llama del mechero Bunsen.
4. Dejar enfriar en ambiente aséptico con las cajas cerradas.
5. Conservar el medio a 4°C

8.5 OBTENCIÓN Y MANTENIMIENTO DE CULTIVOS PUROS

Para procurar los cultivos puros de las cepas previamente sembradas, se emplea este método, el cual se trata del agotamiento continuo y progresivo del inóculo en medios sólidos. Con esto se obtienen un número reducido de bacterias distribuidas individualmente a lo largo de la superficie del medio en la caja de Petri, originándose colonias individuales que constituyen un cultivo puro (cada una) ¹³⁶.

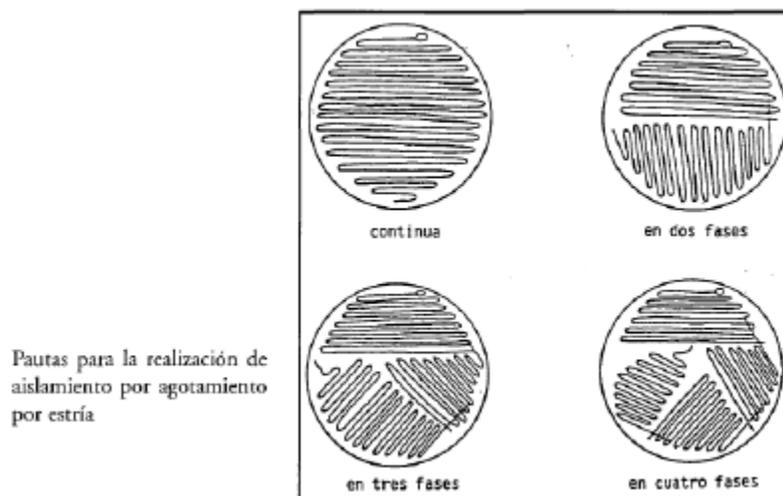


Figura 8-5. Demostración gráfica de metodología para tinción simple ¹³⁶