

UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA
FACULTAD DE CIENCIAS



TESIS

**“SÍNTESIS DEL NANOCOMPUESTO DE
MAGNETITA/PLATA CON PROPIEDADES
ANTIBACTERIANAS FRENTE A LAS BACTERIAS
ENTEROBACTER AEROGENES Y *ENTEROCOCCUS
FAECALIS*”**

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO EN
CIENCIAS CON MENCIÓN EN QUÍMICA

ELABORADO POR:

KATHERINA CHANGANAQUI BARRIENTOS

ASESOR:

Dr. HUGO ARTURO ALARCÓN CAVERO

LIMA – PERÚ

2017

Dedicatoria:

A mis padres, gracias

por su amor.

*“La ciencia es bella y es por esa belleza que
debemos trabajar en ella, y quizás, algún día,
un descubrimiento científico como el radio,
puede llegar a beneficiar a toda la humanidad.”*

Marie Curie

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por iluminar mi camino y guiar mi entendimiento. Agradezco a mis estimados padres, ya que su continuo apoyo y comprensión, me motivan cada día.

Agradezco a mi estimado asesor Dr. Hugo Alarcón, por su motivación, consejos y apoyo durante la investigación.

Agradezco a la Mg. Sc. Débora Alvarado de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por su contribución con la evaluación de las propiedades antibacterianas del nanocompuesto estudiado, realizado en el Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología de la Facultad de Biología en la UNMSM.

Agradezco de manera especial al Dr. Gino Picasso por sus consejos y motivación para lograr culminar el trabajo de tesis.

Agradezco al Dr. Adolfo La Rosa por su apoyo en los análisis por espectroscopia Raman realizados en el Laboratorio de Electroquímica Aplicada de la Facultad de Ciencias de la UNI.

Agradezco a mis amigos del Grupo de Investigación de Materiales Avanzados (GISMA) de la Facultad de Ciencias de la UNI, por su apoyo y compañerismo.

Agradezco a todos los que confiaron en mí, y de alguna forma me apoyaron en el trabajo de tesis.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|---|-----|
| RESUMEN | XII |
| ABSTRACT | XIV |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| Justificación e importancia del trabajo | 3 |
| Hipótesis | 3 |
| OBJETIVOS | 5 |
| CAPITULO 1. MARCO TEÓRICO | |
| 1.1 Proceso sol-gel | 6 |
| 1.1.1 Precursores en el proceso sol-gel | 6 |
| 1.1.2 Modelo de carga parcial (MCP) | 7 |
| 1.1.2.1 Propiedades ácido-base de cationes en solución acuosa | 10 |
| 1.1.2.2 Hidrólisis | 13 |
| 1.1.2.3 Condensación y polimerización | 15 |
| 1.1.3 Partículas coloidales | 18 |
| 1.1.3.1 Teoría de Gibbs para la transformación de fase | 18 |
| 1.1.3.2 Modelo de LaMer-Nucleación homogénea | 20 |
| 1.1.3.3 Soles | 21 |
| 1.2. Nanopartículas de óxido de hierro | 23 |
| 1.2.1 Magnetita | 24 |
| 1.3 Nanopartículas de plata (NPs-Ag) | 25 |
| 1.4 Actividad antibacteriana de las NPs-Ag | 26 |
| 1.5 Microorganismos estudiados | 29 |
| 1.5.1 Clasificación de las bacterias con la técnica de análisis microbiológico de Tinción de Gram | 29 |
| 1.5.2 <i>Enterobacter aerogenes</i> | 30 |
| 1.5.3 <i>Enterococcus faecalis</i> | 31 |
| 1.5.4 Organismos indicadores en el agua | 31 |
| 1.6 Actividad antibacteriana: Conteo de colonia | 34 |
| CAPÍTULO 2. TÉCNICAS EXPERIMENTALES | |
| 2.1 Introducción | 32 |
| 2.2 Espectrofotometría UV-VIS | 37 |
| 2.2.1 Resonancia del plasmón de la superficie | 38 |

| | |
|---|----|
| 2.3 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) | 39 |
| 2.3.1 Instrumentación | 39 |
| 2.4 Espectroscopia Raman | 40 |
| 2.5 Espectroscopia Mössbauer | 42 |
| 2.6 Difracción de rayos X (DRX) | 45 |
| 2.7 Dispersión dinámica de luz | 47 |
| 2.8 Microscopia electrónica de barrido (SEM) | 49 |
| 2.8.1 Microanálisis EDX (Energía dispersiva de rayos X) en SEM | 51 |

CAPÍTULO 3. PARTE EXPERIMENTAL

| | |
|--|----|
| 3.1 Generalidades | 53 |
| 3.2 Reactivos y equipos | 53 |
| 3.3 Procedimiento experimental | 56 |
| 3.3.1 Síntesis de nanopartículas de magnetita Fe₃O₄ | 56 |
| 3.3.2 Síntesis de nanocompuesto de Fe₃O₄/Ag | 61 |
| 3.3.3 Prueba antibacteriana del nanocompuesto de Fe₃O₄/Ag | 65 |

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

| | |
|---|----|
| 4.1 Magnetita | 69 |
| 4.1.1 Aplicación del MCP a la hidrólisis de Fe | 69 |
| 4.1.2 Nucleación y crecimiento | 71 |
| 4.1.3 Transformación en fase sólida | 73 |
| 4.1.4 Doble capa eléctrica | 74 |
| 4.2 Caracterización de materiales | 74 |
| 4.2.1 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) | 74 |
| 4.2.1.1 Espectro IR de MNPs de Fe₃O₄ | 74 |
| 4.2.1.2 Espectro IR del nanocompuesto de Fe₃O₄/Ag | 76 |
| 4.2.2 Difracción de rayos X (DRX) | 78 |
| 4.2.2.1 DRX de MNPs de Fe₃O₄ | 78 |
| 4.2.2.2 DRX del nanocompuesto de Fe₃O₄/Ag | 79 |
| 4.2.3 Espectroscopia Mössbauer | 83 |
| 4.2.4 Espectroscopia Raman | 86 |
| 4.2.4.1 Espectro Raman de MNPs de Fe₃O₄ | 86 |
| 4.2.4.2 Espectro Raman del nanocompuesto de Fe₃O₄/Ag | 87 |
| 4.2.5 Dispersión de luz dinámica | 89 |
| 4.2.6 Microscopía electrónica de barrido (SEM) | 90 |
| 4.2.6.1 Imagen SEM de MNPs de Fe₃O₄ | 90 |
| 4.2.6.2 Imagen SEM del nanocompuesto de Fe₃O₄/Ag | 91 |
| 4.2.7 Energía dispersiva de rayos X (EDX) | 92 |
| 4.2.7.1 Espectro EDX de MNPs de Fe₃O₄ | 92 |

| | |
|--|-----|
| 4.2.7.2 Espectro EDX del nanocompuesto de Fe ₃ O ₄ /Ag | 93 |
| 4.2.8 Espectrofotometría UV-Visible | 94 |
| 4.3 Nanocompuesto de Fe ₃ O ₄ /Ag | 96 |
| 4.4 Actividad antibacteriana del nanocompuesto de Fe ₃ O ₄ /Ag | 100 |
| 4.4.1 Resultados para la prueba con <i>Enterobacter aerogenes</i> | 100 |
| 4.4.2 Resultados para la prueba con la bacteria <i>Enterococcus faecalis</i> | 104 |
| | |
| CONCLUSIONES | 107 |
| | |
| SUGERENCIAS | 109 |
| | |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 110 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| 1. Formación de acuo-complejos u oxo-complejos en función de la carga formal Z del catión y del pH de la solución | 14 |
| 2. Nucleación y crecimiento de una partícula esférica | 19 |
| 3. Variación de la velocidad de nucleación y crecimiento con la concentración del soluto | 20 |
| 4. Doble capa eléctrica alrededor de las partículas coloidales | 22 |
| 5. Interacciones estéricas entre partículas coloidales | 23 |
| 6. Estructura cristalina tipo espinela inversa de la magnetita Fe_3O_4 | 24 |
| 7. Representación esquemática de los mecanismos conocidos de acción antibacteriana de nanopartículas de plata y plata iónica liberada | 28 |
| 8. Pared celular de las bacterias Gram positivas y Gram negativas | 30 |
| 9. Dos métodos para realizar una determinación de células viables (conteo en placa) | 35 |
| 10. Procedimiento para la determinación de viables usando diluciones seriadas de la muestra | 36 |
| 11. Resonancia plasmónica | 38 |
| 12. Esquema de un espectrometro FT-IR con interferómetro Michelson | 40 |
| 13. Origen del espectro Raman | 41 |
| 14. Espectrómetro Raman | 42 |
| 15. El cambio isomérico y el espectro sin valor de $FeCl_3$ | 43 |
| 16. División cuadrupolo y uno de los pares del espectro de los nanotubos de carbono mezclado con hierro | 44 |
| 17. División magnética hiperfina y el espectro sexteto de hematita | 45 |
| 18. Derivación geométrica de la ley de Bragg | 47 |
| 19. Esquema del fundamento de dispersión de luz dinámica | 48 |
| 20. Modelo atómico de Bohr de un átomo de Na ($Z=11$) | 50 |
| 21. Esquema general de un SEM | 50 |
| 22. Diagrama de los niveles y transiciones de energía de un núcleo en un átomo | 51 |
| 23. Espectro EDX | 52 |
| 24. Densitómetro, para medir la densidad óptica de la suspensión bacteriana | 55 |
| 25. Cabina de flujo laminar clase II | 55 |
| 26. Cabina de flujo laminar clase I | 56 |
| 27. Estufa a $37^\circ C$ | 56 |
| 28. Diagrama de proceso para la síntesis de MNPs de Fe_3O_4 por el método de control electrostático de soles. | 57 |
| 29. Representación esquemática del montaje experimental para la síntesis de MNPs de magnetita. | 58 |

| | |
|--|----|
| 30. Variaciones en la coloración en la síntesis de MNPs de Fe₃O₄ por el método de control estérico de soles | 59 |
| 31. Dispersión de magnetita en el proceso de envejecimiento con burbujeo de N₂ | 60 |
| 32. Sol de nanopartículas de magnetita Fe₃O₄ | 60 |
| 33. Diagrama de proceso para la síntesis del nanocompuesto de Fe₃O₄/Ag | 61 |
| 34. Representación esquemática del montaje experimental para la síntesis del nanocompuesto de Fe₃O₄/Ag. | 62 |
| 35. Dispersión final del nanocompuesto de Fe₃O₄/Ag, pH final de 11.26 | 63 |
| 36. Nanocompuesto en dispersión de Fe₃O₄/Ag. | 63 |
| 37. Dispersión coloidal diluida del nanocompuesto de Fe₃O₄/Ag | 64 |
| 38. Proceso de separación del nanocompuesto en dispersión con un imán de neodimio para obtener la muestra sólida | 64 |
| 39. Diluciones para el control 1 con suspensión bacteriana (D.O:0.5 de la escala de Mac Farland), sin tratamiento y sin el nanocompuesto | 65 |
| 40. Siembra por diseminación de la dilución bacteriana sobre la superficie de la placa con agar. | 66 |
| 41. Diluciones para el control 2 con suspensión bacteriana (D.O:0.5 escala de MacFarland), con tratamiento y sin el nanocompuesto, para las bacterias <i>Enterobacter aerogenes</i> y <i>Enterococcus faecalis</i> | 66 |
| 42. Tratamiento del nanocompuesto Fe₃O₄/Ag con la suspensión bacteriana (D.O:0.5 Escala de MacFarland), con agitación por 1h a 37°C, para las bacterias <i>Enterobacter aerogenes</i> y <i>Enterococcus</i> | 67 |
| 43. Dispersión de la suspensión bacteriana con el nanocompuesto de Fe₃O₄/Ag. | 67 |
| 44. Separación del sobrenadante con un imán de neodimio | 68 |
| 45. Mecanismo de condensación por olación para el Fe | 71 |
| 46. Estructura del surfactante bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) | 72 |
| 47. Estructura del citrato de sodio | 72 |
| 48. Mecanismo de atracción del surfactante CTAB sobre la superficie de las partículas de magnetita | 74 |
| 49. Espectro IR de MNPs de Fe₃O₄ | 75 |
| 50. Espectro IR del nanocompuesto de Fe₃O₄/Ag | 76 |
| 51. Espectro IR comparativo de las MNPs de Fe₃O₄ | 77 |
| 52. Difractograma de las MNPs de Fe₃O₄ | 78 |
| 53. Difractograma del nanocompuesto de Fe₃O₄/Ag | 80 |
| 54. Difractograma comparativo de MNPs de Fe₃O₄ y nanocompuesto de Fe₃O₄/Ag | 81 |
| 55. Espectro Mössbauer de las MNPs de Fe₃O₄ | 84 |
| 56. Espectro Mössbauer del nanocompuesto de Fe₃O₄/Ag | 85 |
| 57. Espectro Raman de las MNPs de Fe₃O₄ | 87 |
| 58. Espectro Raman del nanocompuesto de Fe₃O₄/Ag | 87 |

| | |
|---|-----|
| 59. Espectro Raman comparativo de las MNPs de Fe₃O₄ y del nanocompuesto de Fe₃O₄/Ag | 88 |
| 60. DLS del nanocompuesto de Fe₃O₄/Ag. Estabilidad a diferentes tiempos | 89 |
| 61. Micrografía SEM de las MNPs de Fe₃O₄ | 90 |
| 62. Distribución de tamaños de partícula para las MNPs de Fe₃O₄ | 91 |
| 63. Micrografía SEM del nanocompuesto de Fe₃O₄/Ag | 91 |
| 64. Distribución de tamaños de partícula del nanocompuesto de Fe₃O₄/Ag | 92 |
| 65. Espectro de energía dispersiva EDX de las MNPs de Fe₃O₄ | 92 |
| 66. Espectro de energía dispersiva EDX del nanocompuesto Fe₃O₄/Ag | 93 |
| 67. Espectro UV-Visible comparativo | 95 |
| 68. Estructura del polímero polivinilpirrolidona (PVP) | 95 |
| 69. Representación esquemática de las etapas de reacción en la síntesis del nanocompuesto de Fe₃O₄/Ag. | 70 |
| 70. Placas después de la incubación a 37°C por 24 h para el control 1 de la bacteria <i>Enterobacter aerogenes</i> | 100 |
| 71. Placas después de la incubación a 37°C por 24 h para el control 2 de la bacteria <i>Enterobacter aerogenes</i> | 100 |
| 72. Placas después de la incubación a 37°C por 24 h de <i>Enterobacter aerogenes</i> tratada con nanocompuesto Fe₃O₄/Ag | 101 |
| 73. Placas después de la incubación a 37°C por 48 h para el control 1 de la bacteria <i>Enterococcus faecalis</i> | 103 |
| 74. Placas después de la incubación a 37°C por 48 h para el control 2 de la <i>Enterococcus faecalis</i> | 103 |
| 75. Placas después de la incubación a 37°C por 48 h de la bacteria <i>Enterococcus faecalis</i> tratada con nanocompuesto Fe₃O₄/Ag | 104 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|-----|
| 1. Electronegatividades χ^* en la escala de Alfred Rochow | 9 |
| 2. Detalles de NPs-Ag y sus mecanismos de acciones contra diferentes organismos | 29 |
| 3. Lista de reactivos usados en ambas síntesis | 54 |
| 4. Lista de reactivos usados en la prueba antibacteriana | 54 |
| 5. Grado de hidrólisis del Fe^{2+} según el pH teórico | 70 |
| 6. Bandas de absorción observadas en el espectro IR de las MNPs de Fe_3O_4 | 75 |
| 7. Bandas de absorción observadas en el espectro IR del nanocompuesto de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$ | 77 |
| 8. Ángulo y plano correspondiente del DRX de las MNPs de Fe_3O_4 | 79 |
| 9. Diámetro de la cristalita para la Fe_3O_4 | 79 |
| 10. Ángulo y plano correspondiente del DRX del nanocompuesto de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$ | 80 |
| 11. Diámetro de la cristalita para las MNPs Fe_3O_4 y Nps-Ag | 81 |
| 12. Parámetros hiperfinos de MNPs de Fe_3O_4 | 84 |
| 13. Parámetros hiperfinos del nanocompuesto de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$ | 85 |
| 14. Bandas de dispersión observadas en el espectro Raman de las MNPs de Fe_3O_4 | 86 |
| 15. Bandas de dispersión observadas en el espectro Raman del nanocompuesto de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$ | 88 |
| 16. Porcentaje en masa de los elementos presentes en las MNPs de Fe_3O_4 | 93 |
| 17. Porcentaje en masa y atómico de los elementos presentes en el nanocompuesto $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$ | 94 |
| 18. Resultados del conteo de colonias de <i>Enterobacter aerogenes</i> | 102 |
| 19. Resultados del conteo de colonia para el nanocompuesto de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$ con la bacteria <i>Enterobacter aerogenes</i> | 102 |
| 20. Resultados del conteo de colonias para la bacteria <i>Enterococcus faecalis</i> | 105 |
| 21. Resultados del conteo de colonia para el nanocompuesto de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$ con la bacteria <i>Enterococcus faecalis</i> | 105 |

GLOSARIO

| Abreviación | Significado |
|--|---|
| MNPs | Nanopartículas magnéticas |
| NPs | Nanopartículas |
| NPs-Ag | Nanopartículas de plata |
| Fe ₃ O ₄ | Magnetita |
| γ -Fe ₂ O ₃ | Maghemita |
| α -Fe ₂ O ₃ | Hematita |
| CTAB | Bromuro de cetiltrimetilamonio |
| PVP | Polivinilpirrolidona |
| MCP | Modelo de carga parcial |
| H | Grado de hidrólisis |
| χ^* | Electronegatividad según la escala de Alfred-Rochow |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| UFC | Unidades formadoras de colonia |
| FTIR | Infrarrojo con transformada de Fourier |
| DRX | Difracción de rayos X |
| DLS | Dispersión de luz dinámica |
| SEM | Microscopia electrónica de barrido |
| EDX | Energía dispersiva de rayos X |
| D.O | Densidad óptica |

RESUMEN

El presente trabajo consiste en la síntesis y caracterización del nanocompuesto magnético de magnetita/plata ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$) y la evaluación de sus propiedades antibacterianas frente a la bacteria Gram negativa *Enterobacter aerogenes* y la Gram positiva, *Enterococcus faecalis*.

Se prepararon las MNPs de magnetita por método sol-gel utilizando la sal de FeCl_2 como precursor, citrato de sodio $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ como estabilizante, nitrato de sodio NaNO_3 como agente oxidante y bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) como surfactante. Posteriormente, sobre la dispersión coloidal de magnetita se realizó la reducción química *in situ* de iones plata con glucosa y como dispersante a la polivinilpirrolidona (PVP) para obtener el nanocompuesto donde las NPs de plata se encuentran sobre las MNPs de Fe_3O_4 .

Se realizaron estudios morfológicos y espectroscópicos de las MNPs de magnetita y del nanocompuesto mediante las técnicas de caracterización de: espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia Raman, espectroscopia Mössbauer (MS), difracción de rayos X (DRX), espectroscopia UV-Visible, dispersión de luz dinámica (DLS), microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (EDS). Las MNPs de magnetita fueron esféricas con un tamaño medio de 7.75 nm y el nanocompuesto tiene un tamaño medio de 10.13 nm, según SEM.

El efecto antibacteriano se estudió utilizando un método estándar ASTM modificado para determinar la actividad antibacteriana de agentes antimicrobianos inmovilizados bajo condiciones de contacto dinámico y luego se realizó el conteo de colonias por diluciones seriadas frente a las cepas bacterianas Gram negativa

Enterobacter aerogenes y la Gram positiva, *Enterococcus faecalis*. Los resultados indicaron inhibición total del crecimiento bacteriano con el uso del nanocompuesto.

La bacteria *Enterobacter aerogenes* (coliformes totales) es un indicador según la Norma Técnica Nacional (NTN ITINTEC 214.003) y la bacteria *Enterococcus faecalis* es un indicador de contaminación fecal humana en aguas y genera una mayor incidencia de enfermedades gastrointestinales. La bacteria *Enterococcus faecalis* también es uno de los indicadores bacteriológicos más eficiente para evaluar la calidad de agua de mar, debido a que es muy resistente a las condiciones salinas de este medio y además, está relacionada directamente con gastroenteritis, enfermedades respiratorias, conjuntivitis y dermatitis, entre otras. Esta bacteria como parte de los Estrepcocos fecales es el mejor indicador de contaminación fecal en lugar de los coliformes. Por estos motivos, se estudió la actividad antimicrobiana del nanocompuesto frente a estas bacterias ya que en un futuro puede ser aplicado en tratamientos de aguas contaminadas.

Finalmente, los resultados encontrados demostraron las propiedades inhibitorias de crecimiento del nanocompuesto magnético de magnetita/plata ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$) sintetizado frente a las bacterias *Enterobacter aerogenes* y *Enterococcus faecalis* con una eficiencia del 100%.

ABSTRACT

The present work consists in the synthesis and characterization of the magnetic nanocomposite of magnetite/silver ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$) and the evaluation of its antibacterial properties against Gram-negative bacteria *Enterobacter aerogenes* and Gram-positive, *Enterococcus faecalis*.

The magnetite MNPs were prepared by sol-gel method using the salt FeCl_2 as a precursor, sodium citrate $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ as a stabilizer, sodium nitrate NaNO_3 as an oxidizing agent and cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) as a surfactant. Subsequently on the colloidal dispersion of magnetite, *in-situ* chemical reduction of silver ions with glucose and polyvinylpyrrolidone (PVP) as a dispersive agent was carried out to obtain the nanocomposite where the silver NPs are on the Fe_3O_4 MNPs.

Morphological and spectroscopic studies of nanoparticles of magnetite and nanocomposite were carried out using the following techniques of characterization of: Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), Raman spectroscopy, Mössbauer spectroscopy (MS), X-ray diffraction (XRD), dynamic light scattering (DLS), scanning electron microscopy (SEM) and energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS). The size of the magnetite MNPs were in general spherical, with a diameter of 7.75 nm and 10.13 nm for the nanocomposite, according to scanning electron microscopy (SEM) measurement.

The antibacterial effect was studied using a modified standard ASTM method to determine the antibacterial activity of immobilized antimicrobial agents under dynamic contact conditions and then the colonies were counted by serial dilutions against the Gram negative *Enterobacter aerogenes* and Gram positive, *Enterococcus faecalis* bacterial strains. The results indicated total inhibition of bacterial growth with the use of the nanocomposite.

The bacteria *Enterobacter aerogenes* (total coliforms) is an indicator according to the National Technical Norm (NTN ITINTEC 214.003) and the bacterium *Enterococcus faecalis* is an indicator of human faecal contamination in waters and generates a higher incidence of gastrointestinal diseases. The bacterium *Enterococcus faecalis* is also one of the most efficient bacteriological indicators to evaluate the quality of sea water, because it is very resistant to saline conditions of this medium and is directly related to gastroenteritis, respiratory diseases, conjunctivitis and dermatitis, among other. This bacteria as part of faecal Streptococci is better indicator of fecal contamination than the coliforms. For these reasons, the antimicrobial activity of the nanocomposite against these bacterias will study in the future it could be apply in contaminated water treatments.

Finally, the results indicate that the magnetic nanocomposite of magnetite/silver ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$) synthesized can be potentially used in microbiological water disinfection.

INTRODUCCIÓN

Los nanomateriales tienen un amplio rango de aplicaciones, como en biotecnología en separadores y sensores de alta sensibilidad [1]. La confluencia de la nanotecnología y la biología puede abordar varios problemas relacionados a la salud y la medicina [2].

Las nanopartículas magnéticas (MNPs) se utilizan como agentes de contraste para imagen de resonancia magnética (IRM) [3,4], en hipertemia para tratamientos de tumores [3,4], impresión de tintas magnéticas [3], en biomedicina como en la administración dirigida de fármacos (*drug delivery*) [1,3] y en remediación ambiental.

Para aplicaciones de tratamientos de aguas y en biomedicina, las MNPs deben ser bien dispersables en su medio, químicamente estables, biocompatibles y poseer sitios activos en su superficie [5]. La superficie de las nanopartículas magnéticas se puede modificar con polímeros de cadena larga para proporcionar repulsión estérica [4] o con moléculas cargadas para proporcionar repulsión electrostática [6] entre las nanopartículas.

Entre los nanomateriales con actividad antibacteriana, se encuentran el óxido de zinc, óxido de cobre, oro, hierro, dióxido de titanio, magnesio, alginato y plata. La plata es el más prometedor, debido a sus propiedades inherentes tales como, alta estabilidad térmica, durabilidad, buena actividad antibacteriana, poca toxicidad a las células, versatilidad (variedad de microorganismos), y actividad a largo plazo [2, 4, 7].

Existen posibles mecanismos de la actividad antibacteriana de las nanopartículas de Ag que incluyen: (1) ataque directo y daño a la membrana celular, (2) generación de cepas reactivas de oxígeno (ROS), (3) interrupción de la producción de la adenosina trifosfato (ATP) y (4) cese de la replicación del ADN [8]. El mecanismo (1) sugiere que los iones de plata interactúan con los grupos sulfhidrilo o grupos tiol (-SH), en las membranas de bacterias, causando la interrupción de su permeabilidad y lo que conduce a la muerte celular microbiana [4].

Las nanopartículas de plata usadas en tratamiento de aguas pueden tener algunos riesgos potenciales debido a que estas son demasiado pequeñas para ser eliminadas por filtración o centrifugación y la alta concentración de nanopartículas de plata residual son tóxicas en el agua [9]. El nivel máximo de contaminación para la plata en el agua potable es 100 ppb [10] y el límite de exposición ocupacional de las diversas formas de plata es 0,01mg / m³ [11], los cuales se establecieron con el fin de evitar la acumulación de plata en el cuerpo humano. Cabe resaltar, que muchos investigadores confirman la relación de las nanopartículas de plata con la argiria y toxicidad clínica de las células de mamíferos y otros organismos acuáticos [12]. Por lo tanto, es recomendable separar estas nanopartículas después del tratamiento e inhibición de las bacterias. Un inconveniente de este tipo puede ser resuelto con el uso de nanopartículas de plata sobre nanopartículas magnéticas (MNPs), de modo que puedan separarse utilizando un campo magnético externo. Esto sería beneficioso en una situación donde la filtración no es una opción sencilla. [13].

En la literatura, se describen algunos métodos de síntesis de nanopartículas de óxido de hierro/plata. Bao et al. [14] informó un método para la preparación de nanopartículas heterodiméricas de Ag -Fe₃O₄ que eran sintetizados por la reducción de Ag en presencia de nanopartículas de magnetita. Se han reportado otras rutas de síntesis para nanocompuestos Ag-Fe₃O₄ o Fe₃O₄-Ag [4, 15-23]. Li y Liu [24] presenta un método para fabricación de partículas de Ag/ γ -Fe₂O₃ con un diámetro en el rango de 200 y 300 nm, mientras que Chen et.al. [25] reportó una síntesis de nanoestructuras magnéticas SiO₂ /Fe₃O₄ /Ag con un tamaño de alrededor de 200 nm. Ivashchenko et al. [26] sintetizan nanocompuestos de magnetita/plata/antibiótico para terapia antimicrobiana. Amarjargal et.al. [27] sintetizan nanocompuestos Ag/Fe₃O₄ por síntesis hidrotermal. Existen otros trabajos como la preparación de nanopartículas *core-shell* de óxido de hierro/plata con aplicaciones antibacterianas [28-30]. Sin embargo, la agregación de estas nanopartículas debido a las fuerzas de atracción electrostática y magnética es una limitación importante en el proceso de síntesis y, particularmente, cuando se aplica en la práctica [1,31]. Para superar estos problemas, las nanopartículas se pueden dispersar con polímeros que proporciona buena estabilización y buena dispersabilidad en el medio como los surfactantes bromuro cetiltrimetilamonio (CTAB) [32] y polivinilpirrolidona (PVP) [21, 33-34].

En el presente trabajo de tesis, se reporta el procedimiento de síntesis para el nanocompuesto $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$ con propiedades antibacterianas sobre *Enterobacter aerogenes* y *Enterococcus faecalis*. Este procedimiento implica la preparación de las nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) y luego sobre la dispersión coloidal de las MNPs se procede a la reducción química in situ de los iones plata con glucosa como agente reductor y PVP como dispersante para la formación del nanocompuesto $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$.

Justificación e importancia del trabajo

El crecimiento de bacterias no deseadas resulta un problema en el almacenamiento de alimentos, salud, productos textiles, fibras, recubrimientos, pinturas y aguas [7]. El desarrollo de nuevas alternativas para eliminar o inhibir el crecimiento de las bacterias alienta a encontrar en la nanotecnología una plataforma para encontrar materiales con propiedades antibacterianas.

La falta de acceso a agua limpia y potable es un problema a nivel mundial, la Organización Mundial de la Salud estima al menos 846 mil muertes al año debido al consumo de agua contaminada con bacterias (OMS, 2016) [35]. Estos problemas afectan también al Perú en su mayoría a zonas en provincia, que aún está en proceso de mejorar la infraestructura en tratamiento de agua a gran escala; así como obtener alternativas durante los desastres naturales que acontecen al país, cuando los suministros de agua potable son difíciles de obtener, debido a la contaminación y daños en la infraestructura. Muchos métodos y agentes tanto físicos como químicos son ampliamente utilizados en el caso de tratamiento de aguas residuales con halógenos como cloro y bromo, que son ampliamente utilizados como agentes antimicrobianos, pero el uso directo en forma pura como bactericida tiene muchos problemas debido a su alta toxicidad. En el ámbito de la purificación del agua, la nanotecnología ofrece la posibilidad de una eliminación eficaz de contaminantes y microorganismos.

Las nanopartículas de óxido de hierro como la magnetita representan uno de los candidatos más adecuados para la preparación de nanopartículas magnéticas debido a su aplicación magnética (por ejemplo, superparamagnetismo) y propiedades bioquímicas (por ejemplo, no toxicidad, biocompatibilidad, biodegradabilidad) y bajo precio [3].

Las nanopartículas de plata representan otra rama importante de interés en nanotecnología; las cuales exhiben notables propiedades ópticas, catalíticas y en especial antimicrobianas.

El propósito del trabajo es el uso combinado de las propiedades antibacterianas y magnéticas del nanocompuesto de NPs-Ag sobre MNPs. Las nanopartículas de plata tienen propiedades antibacterianas e inhibitorias aplicables en tratamientos de agua, mientras que las nanopartículas de magnetita pueden facilitar el transporte del agente antimicrobiano y su posterior proceso de separación debido a sus propiedades magnéticas evitando procesos donde la filtración no es sencilla.

Se realizó las pruebas antimicrobianas contra las bacterias *Enterobacter aerogenes* y *Enterococcus faecalis* ya que son microorganismos indicadores de contaminación en los cuerpos de agua. La bacteria *Enterobacter aerogenes* (coliforme) está considerada como un microorganismo indicador según la Norma Técnica Nacional (NTN ITINTEC 214.003). La bacteria *Enterococcus faecalis* es un subgrupo de los *Streptococcus* fecales y es considerado como otro indicador de contaminación fecal [36]. Un alto riesgo de contaminación representa que el agua potable contenga material fecal. Por este motivo se estudió ambas bacterias, para que en un futuro el trabajo de tesis pueda ser aplicable en la desinfección microbiológica de aguas contaminadas.

Hipótesis

Las nanopartículas de plata soportadas sobre las nanopartículas magnéticas de magnetita sintetizadas por método sol-gel muestran actividad antimicrobiana y propiedades magnéticas para que puedan ser removidas. En este trabajo se comprobará el poder antimicrobiano del nanocompuesto frente a las bacterias poco estudiadas como las Gram negativa *Enterobacter aerogenes* y Gram positiva *Enterococcus faecalis*, las cuales son organismos indicadores de contaminación fecal en aguas para consumo humano y aguas de mar.

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES:

- Desarrollar un método de síntesis para el nanocompuesto de magnetita/plata ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$) y evaluar la actividad antibacteriana frente a las bacterias Gram negativa *Enterobacter aerogenes* y Gram positiva *Enterococcus faecalis*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Sintetizar y caracterizar nanopartículas de magnetita por método sol gel.
- Sintetizar y caracterizar nanocompuesto de magnetita/plata ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$), a partir de la reducción química de los iones plata sobre las nanopartículas de magnetita.
- Determinar la eficiencia antibacteriana del nanocompuesto $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$ frente a la bacteria Gram negativa *Enterobacter aerogenes* y la bacteria Gram positiva *Enterococcus faecalis* usando un método estándar ASTM modificado.

Capítulo 1

MARCO TEÓRICO

1.1 Proceso sol-gel

El proceso sol gel puede definirse como la producción de óxidos inorgánicos a partir de dispersiones coloidales o de alcóxidos metálicos [37]; apropiada para la preparación de vidrios, cerámicos, nanopartículas, etc. [37-39]. Los soles y geles constituyen la etapa transitoria entre la formación de especies en solución y la precipitación de un sólido; también pueden ser los productos finales que se desean obtener.

El proceso sol gel comprende una serie de técnicas y rutas para sintetizar los materiales que se desean y que dependen básicamente del compuesto de partida y del producto sintetizado. El proceso sol-gel busca obtener partículas monodispersas, controlando los aspectos que corresponden a la formación de centros de nucleación, el crecimiento que estos experimentan y la influencia del tipo de catión en el sólido final obtenido [40].

En el proceso sol-gel se logra el control de la pureza de los reactivos, el grado de homogeneidad de la mezcla de precursores, y de la microestructura (uniformidad y distribución de tamaños de partículas) [37].

La comparación más resaltante con otros métodos, es su bajo costo de producción, sin embargo toma buena cantidad de tiempo sintetizar un material; entre 2 a 3 horas por cada etapa, sin tener en cuenta los procesos de purificación y secado [37].

1.1.1 Precursores en el proceso sol-gel [37]

El precursor es la solución que contiene al catión M presente en el sol o gel obtenido al final del proceso. Sus reacciones químicas son complejas e involucran una competencia entre la hidrólisis, la nucleación, el crecimiento y la formación de una fase sólida

(reacciones responsables de la dispersión controlada de las partículas coloidales en un sol o su aglomeración en un gel). Los precursores se pueden clasificar en sales metálicas y alcóxidos. Las sales metálicas se representan por M_mX_n , donde M es el metal, X el anión, m y n los coeficientes estequiométricos.

1.1.2 Modelo de carga parcial (MCP) [38,39]

El Modelo de la Carga Parcial (MCP), fue desarrollado por Henry y Livage [38,39], involucran las reacciones por las que pasan los precursores en el proceso sol gel. Se enfoca en las propiedades ácido/base de acuocomplejos (polarización del agua de coordinación), reactividad de complejos en reacciones nucleofílicas (polaridad de unión) y la predicción de reacciones (distribución de densidad electrónica en los compuestos químicos dada por la carga parcial sobre los distintos átomos individuales). El modelo se basa en:

i) Electronegatividad y dureza

Según el principio de SANDERSON: “En cada sistema de átomos en un estado de no equilibrio, debe haber un flujo de densidad electrónica desde las regiones de elevado potencial a las regiones de bajo potencial, hasta que se alcance un equilibrio en la densidad electrónica”. Lo que involucra que la electronegatividad es un potencial químico electrónico similar al potencial químico termodinámico.

Considerando la definición de la dureza de un átomo según Pearson:

$$\eta_a = (1/2)(\partial\mu/\partial N)_v \quad (1.1)$$

La dureza refleja la resistencia del potencial químico de los electrones a un cambio en el número de electrones alrededor del átomo; relacionándola directamente con el tamaño del átomo, debido a que E es proporcional a q^2/r .

$$\eta_a = \Delta\mu/\Delta N \quad (1.2)$$

$$\mu_e = \mu_e^\circ - \eta_a \Delta N = -\chi_a \quad (1.3)$$

Donde μ_e° refleja el estado estándar del átomo. El término $\eta_a \Delta N$ refleja la desviación del estado estándar debido a la variación en la carga ΔN . A medida que un sistema se confina en un espacio su dureza aumenta y su polarizabilidad disminuye.

La definición de **Alfred-Rochow** toma en cuenta el tamaño y la forma del átomo, basándose en las interacciones electrostáticas entre electrones y núcleos Z_{ef}/r^2 ; siendo Z_{ef} la carga nuclear efectiva y r el radio covalente.

ii) Electronegatividad y carga

Considerando una combinación de átomos neutros; los términos absolutos χ_a y η_a del átomo libre son sometidos a una perturbación $\Delta\chi$ y $\Delta\eta$ debido al cambio de tamaño y forma del átomo producido por efectos covalentes. El potencial electrónico local en cada átomo neutro es $(\chi_{ai} + \Delta\chi)$.

Debido a la transferencia de electrones por la formación del enlace, las cargas parciales en los átomos crean un potencial electrostático adicional al potencial electrónico local, que consiste de un término $(\eta_{ai} + \Delta\eta)\delta_i$ resultado del cambio en la carga δ_i en el átomo i , y un término $\sum(\delta_j/R_{ij})$ debido a las cargas vecinas δ_j de los átomos j a las distancias R_{ij} . La electronegatividad de la combinación de átomos resultante:

$$\chi_i = \chi_{ai} + \Delta\chi + (\eta_{ai} + \Delta\eta)\delta_i + \sum_{j \neq i} \frac{\delta_j}{R_{ij}} \quad (1.4)$$

Esta expresión requiere del conocimiento de las perturbaciones a las cuales están sujetas la electronegatividad y la dureza. Ya que $\Delta\chi$ y $\Delta\eta$ son desconocidas, podemos escribir:

$$\chi^* = \chi_a + \Delta\chi \quad (1.5)$$

$$\eta^* = \eta_a + \Delta\eta \quad (1.6)$$

La dureza y la electronegatividad están relacionadas, ya que η es proporcional al recíproco de la distancia, escogiendo la escala Alfred-Rochow ($\chi \propto Z_{ef}/r^2$), se obtiene la siguiente expresión:

$$\eta^* = k[\chi^*]^{1/2} \quad k: \text{constante} \quad (1.7)$$

Tabla 1. Electronegatividades χ^* en la escala de Alfred Rochow. [36].

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| H 2.10 | | | | | | | | | | | | | | | | | He 3.20 |
| Li 0.97 | Be 1.57 | | | | | | | | | | | B 2.02 | C 2.50 | N 3.07 | O 3.50 | F 4.10 | Ne 5.10 |
| Na 1.01 | Mg 1.29 | | | | | | | | | | | Al 1.47 | Si 1.74 | P 2.11 | S 2.48 | Cl 2.83 | Ar 5.10 |
| K 0.91 | Ca 1.04 | Sc 1.23 | Ti 1.32 | V 1.56 | Cr 1.59 | Mn 1.63 | Fe 1.72 | Co 1.75 | Ni 1.80 | Cu 1.75 | Zn 1.66 | Ga 1.82 | Ge 2.00 | As 2.20 | Se 2.50 | Br 2.69 | Kr 3.10 |
| Rb 0.89 | Sr 0.99 | Y 1.19 | Zr 1.29 | Nb 1.45 | Mo 1.56 | Tc 1.67 | Ru 1.78 | Rh 1.84 | Pd 1.85 | Ag 1.68 | Cd 1.60 | In 1.49 | Sn 1.89 | Sb 1.98 | Te 2.15 | I 2.33 | Xe 2.60 |
| Cs 0.87 | Ba 0.89 | * | Hf 1.36 | Ta 1.50 | W 1.59 | Re 1.88 | Os 1.99 | Ir 2.05 | Pt 2.00 | Au 2.02 | Hg 1.80 | Tl 1.60 | Pb 1.92 | Bi 2.03 | Po 2.12 | At 2.28 | Rn 2.30 |
| Fr 0.86 | Ra 0.95 | ** | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | * | La 1.18 | Ce 1.17 | Pr 1.18 | Nd 1.19 | Pm 1.20 | Sm 1.20 | Eu 1.13 | Gd 1.27 | Tb 1.24 | Dy 1.26 | Ho 1.28 | Er 1.30 | Tm 1.30 | Yb 1.24 | Lu 1.36 |
| | | ** | Ac 1.12 | Th 1.24 | Pa 1.22 | U 1.24 | Np 1.22 | Pu 1.24 | Am 1.25 | Cm 1.20 | Bk 1.20 | Cf 1.20 | Es 1.20 | Fm 1.20 | Md 1.20 | No 1.20 | Lw 1.20 |

iii) Cálculo de la electronegatividad promedio

En una primera aproximación, la perturbación inducida en un átomo i debida a los átomos vecinos es mucho menor que la perturbación producida por la carga δ_i en el átomo i . La electronegatividad del átomo i se puede escribir como:

$$\chi_i = \chi_i^* + \eta_i^* \delta_i \quad (1.8)$$

$$\text{Donde: } \eta_i^* = k[\chi_i^*]^{1/2} \quad (1.9)$$

La constante k calculada en función a las cargas del NaF [$\delta_{\text{Na}} - \delta_{\text{F}} = 0.75$] fue propuesta por Sanderson, usando la escala Alfred Rochow (Tabla 1), $k=1.36$. En el equilibrio, para la combinación, el principio de igualdad de electronegatividad indica:

$$\chi_i = \chi \quad (1.10)$$

$$\chi_i^* + \eta_i^* \delta_i = \chi \quad (1.11)$$

De donde se obtiene:

$$\delta_i = \frac{\chi - \chi_i^*}{\eta_i^*} \quad (1.12)$$

La conservación de las cargas impone:

$$\sum_i \delta_i = z \quad (1.13)$$

Se obtiene:

$$\chi = \frac{\sum_i \sqrt{\chi_i^*} + 1.36z}{\sum_i \frac{1}{\sqrt{\chi_i^*}}} \quad (1.14)$$

iv) Relación pH- electronegatividad

A escala macroscópica, el potencial químico de un protón en solución es:

$$\mu_H = \mu_H^\circ + RT \ln a_H = \mu_H^\circ - 0.06 pH \quad (1.15)$$

Donde a_H es la actividad del protón, y $RT \ln a_H = 0.06 \log a_H$ a 298K.

A nivel microscópico, considerando que la electronegatividad representa el potencial químico de los electrones, $\chi = -\mu_e$, podemos escribir:

$$\mu_H = -k\chi_H \quad (1.16)$$

$$\mu_H^\circ = -k\chi[H_9O_4]^+ \quad (1.17)$$

Donde se ha elegido a $[H_9O_4]^+$ como estado de referencia (pH=0) para el protón solvatado, por lo tanto:

$$\chi_H = \chi[H_9O_4]^+ - \frac{0.06}{k} pH = \chi_s \quad \text{con} \quad \chi[H_9O_4]^+ = 2.621 \quad (1.18)$$

Debemos asumir que la dilución del protón en solución aumenta su deslocalización a través de un gran número de moléculas de agua. Por tanto, a pH = 7, la concentración del protón se vuelve muy pequeña, con lo cual podemos considerar a la especie $[H^+, (H_2O)_n]$ en el cual n es muy grande. El valor de k, que relaciona la escala de pH con la de la electronegatividad, se obtiene considerando que a pH =7, $\chi_s = \chi[H_2O]=2.491$.

$$\chi_s = 2.621 - 0.02pH \quad (1.19)$$

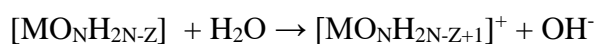
1.1.2.1 Propiedades ácido-base de cationes en solución acuosa

Si se considera un elemento M^{Z+} que puede existir de la forma molecular MO_NH_{2N-Z} , esta puede tener dos comportamientos extremos en agua:

Puede actuar como un ácido fuerte:



Puede actuar como una base fuerte:





Antes de tratar estos 2 comportamientos, se aplica el PCM al agua para calcular las cargas parciales de los átomos de oxígeno y de hidrógeno presentes, así como la electronegatividad del agua.

A pH=7 podemos considerar que solo hay moléculas de agua en el líquido; aplicando la ecuación 1.14 para el H₂O:

$$\chi_{\text{H}_2\text{O}} = \frac{2\sqrt{\chi_H^*} + \sqrt{\chi_O^*}}{\frac{2}{\sqrt{\chi_H^*}} + \frac{1}{\sqrt{\chi_O^*}}} = 2.491 \quad (1.20)$$

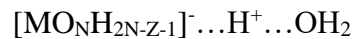
Aplicando en la ecuación 1.12, se tiene:

$$\delta_H = \frac{2.49 - 2.10}{1.36\sqrt{2.10}} = +0.2 \quad (1.21)$$

$$\delta_O = \frac{2.49 - 3.50}{1.36\sqrt{3.50}} = -0.4 \quad (1.22)$$

a) Comportamiento ácido:

Se lleva a cabo por el intercambio de un protón entre la forma molecular del compuesto y el solvente. Se debe considerar el siguiente estado de transición:



Si la carga en el oxígeno del agua $\delta(\text{O}_{\text{H}_2\text{O}})$ es más negativa que la del oxígeno en la forma básica del complejo metálico $\delta(\text{O}_{\text{p}^-})$, $\delta(\text{O}_{\text{p}^-}) > \delta(\text{O}_{\text{H}_2\text{O}})$, es decir, si la electronegatividad promedio de la forma básica es tal que $\chi_{\text{p}^-} > \chi_{\text{H}_2\text{O}}$, el protón tenderá a ser solvatado por el agua. Si por el contrario, $\delta(\text{O}_{\text{p}^-}) < \delta(\text{O}_{\text{H}_2\text{O}})$, es decir, $\chi_{\text{p}^-} < \chi_{\text{H}_2\text{O}}$, el protón permanecerá en la esfera de coordinación del catión y el complejo no tendrá propiedades ácidas. El punto crítico para estas dos situaciones es:

$$\chi_{\text{p}^-} = \chi_{\text{H}_2\text{O}} = 2.49 \quad (1.23)$$

El balance de carga para el complejo $[\text{MO}_N\text{H}_{2N-Z-1}]^-$ resulta:

$$\delta(\text{M}) + N \cdot \delta(\text{O}) + (2N-Z-1) \cdot \delta(\text{H}) = -1 \quad (1.24)$$

Reemplazando $\delta(\text{H}) = +0.2$ y $\delta(\text{O}) = -0.4$ en la ecuación 1.26; y considerando $\chi_{\text{H}_2\text{O}} = 2.49$, se obtiene:

$$\delta(M) = \frac{2.49 - \chi_M^*}{1.36\sqrt{\chi_M^*}} \quad (1.25)$$

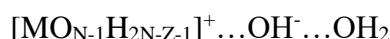
Reemplazando las ecuaciones, considerando la variable $\sqrt{\chi_M^*}$ se puede calcular la electronegatividad crítica, $\chi_{A,z}$ que indica el límite del comportamiento ácido de la forma neutra del catión de carga formal z:

$$\sqrt{\chi_{A,z}} = -0.136(z - 4) + \sqrt{[0.136(z - 4)]^2 + 2.49} \quad (1.26)$$

Para un catión dado, si $\chi_M^* > \chi_{A,z}$, entonces $\text{MO}_N\text{H}_{2N-Z}$ es un ácido fuerte.

b) Comportamiento básico:

Se lleva a cabo por el intercambio de un ion OH^- entre la especie molecular y la solución:



Si la carga en el H de la forma ácida del complejo es menor que la del H del agua, $\delta(\text{H}_{p^+}) > \delta(\text{H}_{\text{H}_2\text{O}})$, es decir, si $\chi_{p^+} < \chi_{\text{H}_2\text{O}}$, el ion OH^- será solvatado por el agua. Si por el contrario, $\delta(\text{H}_{p^+}) < \delta(\text{H}_{\text{H}_2\text{O}})$, o $\chi_{p^+} > \chi_{\text{H}_2\text{O}}$, el ion OH^- estará más estable en el complejo, por lo que el complejo no exhibirá propiedades básicas. El punto crítico para estas dos situaciones es:

$$\chi_{p^+} = \chi_{\text{H}_2\text{O}} = 2.49 \quad (1.27)$$

El balance de carga para el complejo $[\text{MO}_{N-1}\text{H}_{2N-Z-1}]^+$ es:

$$\delta(M) + (N-1) \cdot \delta(\text{O}) + (2N-Z-1) \cdot \delta(\text{H}) = +1 \quad (1.28)$$

Considerando $\chi_{B,z}$ como la electronegatividad crítica para el comportamiento básico de la forma neutra del catión de carga formal z:

$$\sqrt{\chi_{B,z}} = -0.136(z + 4) + \sqrt{[0.136(z + 4)]^2 + 2.49} \quad (1.29)$$

Si $\chi_M^* < \chi_{B,z}$, entonces $\text{MO}_N\text{H}_{2N-Z}$ es una base fuerte.

1.1.2.2 Hidrólisis

La hidrólisis es la desprotonación de un catión metálico solvatado por una o más de las moléculas de agua que rodean al metal M en la primera capa de solvatación, transformando al ligando acuo que está enlazado al metal en un ligando hidroxilo, si sólo un protón se pierde, o en un ligando oxo, si es que los dos protones se pierden.

a) Formación de ligandos hidroxilo:

Formados cuando el metal solvatado actúa como un ácido y cuando el agua puede actuar como una base de Lewis.



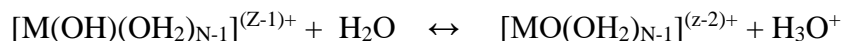
K_{11} es la constante de equilibrio de la primera reacción de desprotonación de un complejo, que comprende solo a un átomo metálico. Para h pérdidas de protón consecutivas, se obtiene:



El complejo $[\text{M}(\text{OH}_2)_N]^{Z+}$ es la forma más ácida entre los acuo-hidroxilo complejos; y $[\text{M}(\text{OH})_h(\text{OH}_2)_{N-h}]^{(Z-h)+}$ es la forma más básica de estos complejos.

b) Formación de ligandos oxo:

Un ligando oxo es un anión O^{2-} enlazado al metal M dentro del complejo. Este ligando se forma por la desprotonación de un ligando hidroxilo:



El producto obtenido, $[\text{MO}(\text{OH}_2)_{N-1}]^{(Z-2)+}$, es un acuo-oxo complejo.

Mediante el MCP, la electronegatividad de un complejo se calcula a partir de su carga formal y la electronegatividad de Alfred Rochow de cada átomo en el complejo.

La electronegatividad de un acuo-hidroxilo complejo $[\text{M}(\text{OH})_h(\text{H}_2\text{O})_{N-h}]^{(Z-h)+}$ en el equilibrio, es igual a la de la solución:

$$\chi([\text{M}(\text{OH})_h(\text{H}_2\text{O})_{N-h}]^{(Z-h)+}) = \chi(\text{complejo}) = \chi(\text{C}) = \chi(\text{s}) = \chi(\text{H}_2\text{O}) \quad (1.30)$$

Igualando la ecuación 1.14 y la ecuación 1.19, se tiene:

$$\chi(C) = \frac{\sqrt{\chi_M^*} + N\sqrt{\chi_O^*} + (2N - h)\sqrt{\chi_M^*} + 1,36(Z - h)}{\frac{1}{\sqrt{\chi_M^*}} + \frac{N}{\sqrt{\chi_O^*}} + \frac{2N - h}{\sqrt{\chi_H^*}}} = 2.621 - 0.02pH \quad (1.31)$$

Reordenando y empleando la tabla 1, se obtiene:

$$h = \left(\frac{1}{1 + 0.014pH} \right) \left(1.36z - N(0.236 - 0.038pH) - \frac{2.621 - 0.02pH - \chi_M^*}{\sqrt{\chi_M^*}} \right) \quad (1.32)$$

$$\text{a } pH = 0 \quad \rightarrow \quad h = 1.36z - 0.24N - \frac{2.621 - \chi_M^*}{\sqrt{\chi_M^*}} \quad (1.33)$$

$$\text{a } pH = 14 \quad \rightarrow \quad h = 1.14z + 0.25N - \frac{0.836(2.341 - \chi_M^*)}{\sqrt{\chi_M^*}} \quad (1.34)$$

Por lo tanto, con la ecuación se puede calcular el número (h) de ligandos hidroxilo que presenta un acuo-hidroxilo complejo para un determinado metal a un pH dado.

El modelo de la carga parcial, sienta las bases teóricas para predecir los dominios en los cuales predominan los acuo-complejos puros o los oxo-complejos puros, en función de la carga parcial del metal y del pH.

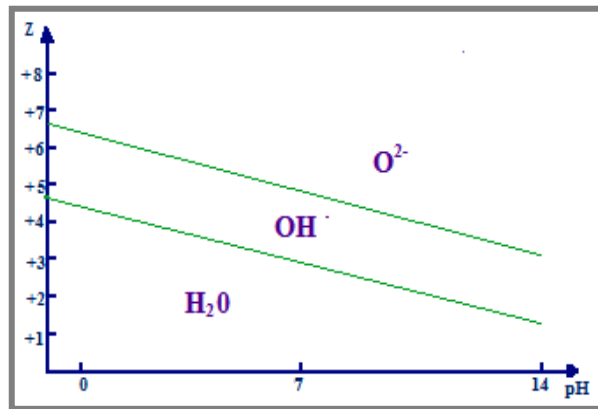


Figura 1. Formación de acuo-complejos u oxo-complejos en función de la carga formal Z del catión y del pH de la solución [38].

Los cationes de carga formal $z \leq 4$, forman acuo-hidroxilo complejos en medio ácido o neutro. En medio alcalino existen hidroxocomplejos. Cationes de carga formal $z > 4$ forman oxo-hidroxilo complejos. Elementos con cationes con carga formal muy baja

($z=1$) forman óxidos muy básicos y acuocomplejos puros. Cationes con carga formal muy alta ($z=6$) forman óxidos muy ácidos y oxoaniones puros.

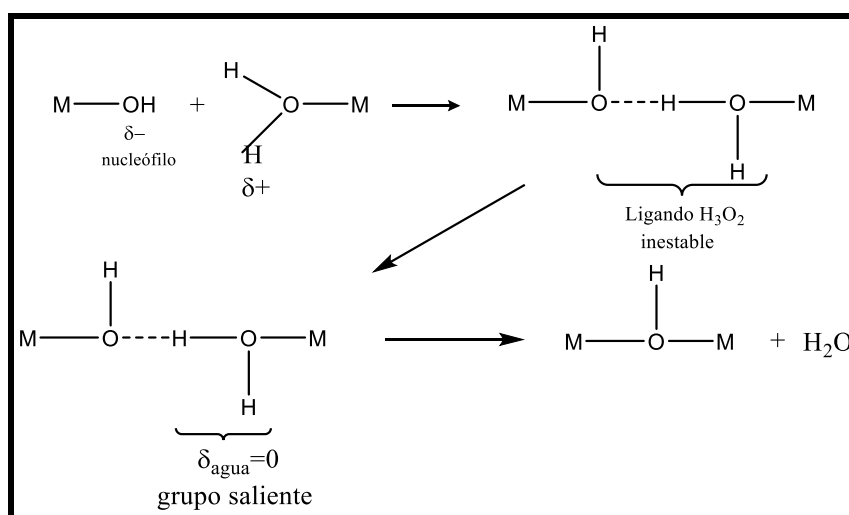
1.1.2.3 Condensación y polimerización

La condensación puede ocurrir cuando dos complejos mononucleares reaccionan entre sí dando como resultado un complejo con dos centros metálicos. La reacción continúa, mientras existan al menos un ligando hidroxilo (OH^-) unido al M del complejo y originar polímeros más grandes. Hay dos tipos de mecanismos de unión de los centros metálicos:

a) Condensación por olación:

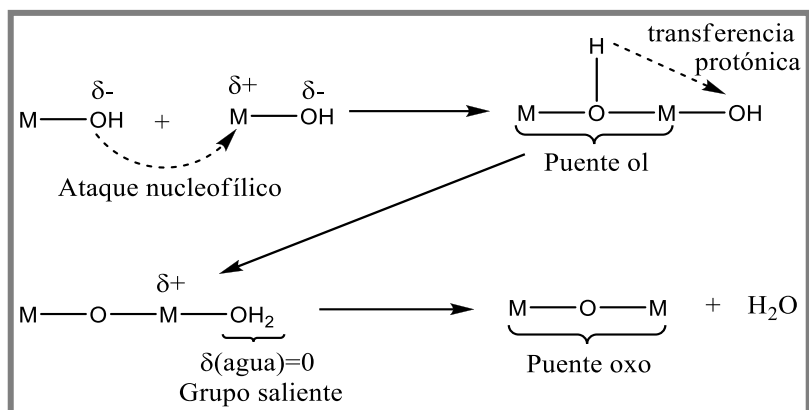
El primer paso de una condensación siempre incluye la construcción de un puente hidroxilo entre dos metales; que puede llevarse a cabo por varios mecanismos según la naturaleza del catión metálico.

Para elementos de transición, la reacción se produce mediante mecanismo $\text{S}_{\text{N}}2$. La condensación continua hasta que el complejo $[\text{M}(\text{OH})_h(\text{OH}_2)_{\text{N}-h}]^{(z-h)+}$, donde ($h < z$), no soporta más condensación, o hasta la aparición de un precipitado por polimerización indefinida.



b) Condensación por oxolación:

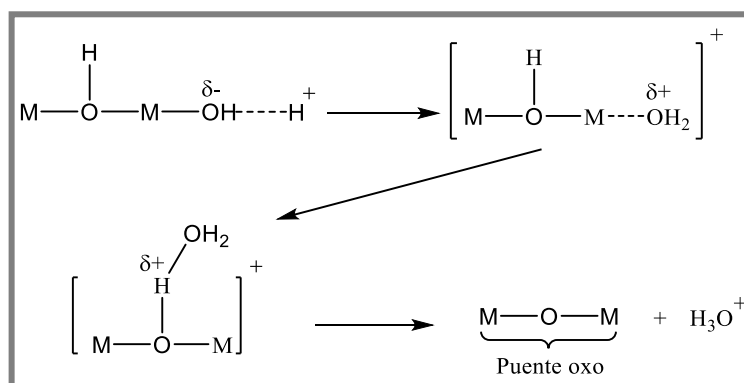
La oxolación es el proceso por el cual se crean puentes oxo (O^{2-}) entre dos cationes que no tienen ligandos acuo en su esfera de coordinación. Como paso previo a hay formación de un puente hidroxilo por $\text{S}_{\text{N}}2$, lo que implica la formación de un buen grupo saliente, según el siguiente mecanismo:



Este proceso puede ser catalizado tanto por ácidos como por bases.

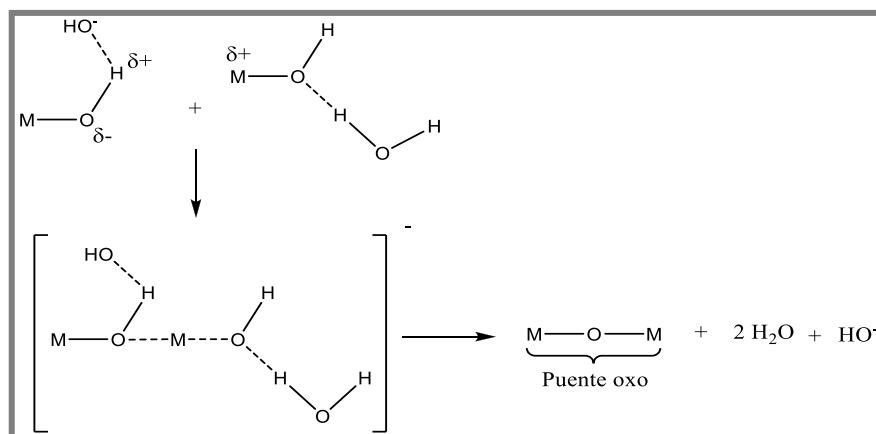
i) Mecanismo de reacción para catálisis ácida:

Un H^+ ataca al átomo de oxígeno del ligando hidroxilo del complejo. El ligando H_2O formado gana una carga parcial positiva y se acerca a otro ligando hidroxilo, formando un complejo intermedio. El H_3O^+ deja el complejo, formándose un puente oxo.



ii) Mecanismo de reacción para catálisis básica:

Un OH^- ataca al átomo de hidrógeno de otro ligando hidroxilo del complejo, incrementándose la carga parcial negativa del átomo de oxígeno del ligando, volviéndose más nucleofílico; se enlazará con otro complejo, igualmente con un grupo hidroxilo solvatado. Se separa un OH^- del complejo junto a dos moléculas de agua.



En los mecanismos de reacción, para una sustitución nucleofílica se necesita:

- Un nucleófilo; átomo o grupo molecular con la carga parcial (δ^-) más negativa.
- Un electrófilo; el metal (δ^+) donde experimentalmente se ha concluido que debe cumplir una carga parcial mayor o igual a 0.3 ($\delta(M) \geq 0,3$).
- Un grupo saliente; ligando del metal que posee la carga parcial (δ^+) más positiva.

Para que se produzca la condensación, es necesario generar un electrófilo y un grupo saliente, por lo tanto el MO_NH_{2N-Z} no será ni ácido ni base fuerte y no existirá como acuocomplejo u oxoanión puro a cualquier pH.

La olación procede si hay un ligando acuo en la esfera de coordinación del catión, hasta la formación de la fase sólida $M(OH)_Z$. Para que los hidróxidos sean estables, $\delta(H_2O)$ debe ser negativo en el sólido; de lo contrario puede proceder la oxolación por deshidratación interna.

El desarrollo del PCM de la especie MO_NH_{2N-Z} , para la condensación por olación es como sigue:

Balance de carga:

$$\delta(M) + N \cdot \delta(O) + (2N-Z) \cdot \delta(H) = 0$$

$$\delta(M) + [N \cdot \delta(O) + 2N \delta(H)] - Z \cdot \delta(H) = 0$$

Considerando como condición para el límite de la olación $\delta(\text{H}_2\text{O}) = 0$:

$$\begin{aligned}\delta(\text{M}) + \text{N} \cdot \delta(\text{H}_2\text{O}) - z \cdot \delta(\text{H}) &= 0 \\ \delta(\text{M}) - z \cdot \delta(\text{H}) &= 0\end{aligned}\tag{1.35}$$

Considerando $\delta(\text{M})$ de la ecuación 1.27, $\delta(\text{H}) = +0.2$ se obtiene la ecuación:

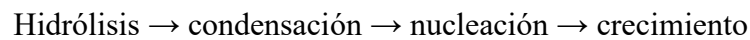
$$\sqrt{\chi_{\text{OL},z}} = -0.136z + \sqrt{(0.136z)^2 + 2.49}\tag{1.36}$$

Si $\chi_{\text{B},z} < \chi_{\text{M}}^* < \chi_{\text{OL},z}$, solamente procede la condensación por olación, y como se estableció, permite la formación de hidróxidos estables.

En el caso que $\chi_{\text{OL},z} < \chi_{\text{M}}^* < \chi_{\text{A},z}$, tenemos $\delta(\text{H}_2\text{O}) > 0$, entonces también procede la oxolación, llevando a la formación de oxihidróxidos u óxidos.

1.1.3 Partículas coloidales [37]

La formación de partículas sólidas puede ser descrita como procesos consecutivos de:



Los precursores reaccionan según las condiciones de pH, temperatura, etc., para dar lugar a complejos con ligandos OH^- , O^{2-} y posteriormente formar complejos polinucleares. Luego, aparecerán los embriones en la solución (nucleación), los cuales son fluctuaciones en la concentración del soluto en el sistema en ciertos puntos, que favorecerán la aparición de una fase sólida. El proceso de crecimiento se da cuando los embriones crecen, formando los núcleos, que son los bloques sobre los que se construye la estructura de la fase sólida.

1.1.3.1 Teoría de Gibbs para la transformación de fase

La formación de partículas sólidas a partir de una solución del precursor comprende, esencialmente, los procesos de nucleación y crecimiento; descritas por Gibbs, que comprende grandes cambios de composición dentro de una pequeña cantidad de volumen, en una etapa preliminar.

La energía libre total (ΔG_r) para formar una partícula esférica con un radio 'r', comprende una contribución G_s para crear la superficie de la partícula y una contribución ΔG_{int} la cual es debida a la transformación de fase dentro de la partícula.

$$\Delta G_r = G_s + \Delta G_{int} \quad (1.37)$$

La contribución debida a la superficie es de signo positivo y depende de la energía superficial γ de la partícula.

$$G_s = 4\pi r^2 \gamma > 0 \quad (1.38)$$

La contribución debida a la transformación de fase dentro de la partícula es de signo negativo y depende de la diferencia ΔG_v entre las energías libres por unidad de volumen entre la nueva fase β y la anterior α .

$$\Delta G_{int} = \frac{4}{3} \pi r^3 (G_\beta - G_\alpha) = \frac{4}{3} \pi r^3 \Delta G_v < 0 \quad (1.39)$$

El cambio de energía libre ΔG_v para formar la partícula, depende de r . Cuando r es muy pequeño, la contribución superficial domina, $\Delta G_r > 0$, es decir no es un estado termodinámicamente favorable. Después de pasar un valor crítico $r = r_c$ la contribución interna empieza a ser dominante, pasa a ser termodinámicamente favorable. El valor de r_c puede determinarse mediante diferenciación:

$$\frac{\partial G_r}{\partial r} = 0 \rightarrow r_c = \frac{-2\gamma}{\Delta G_v} \quad (1.40)$$

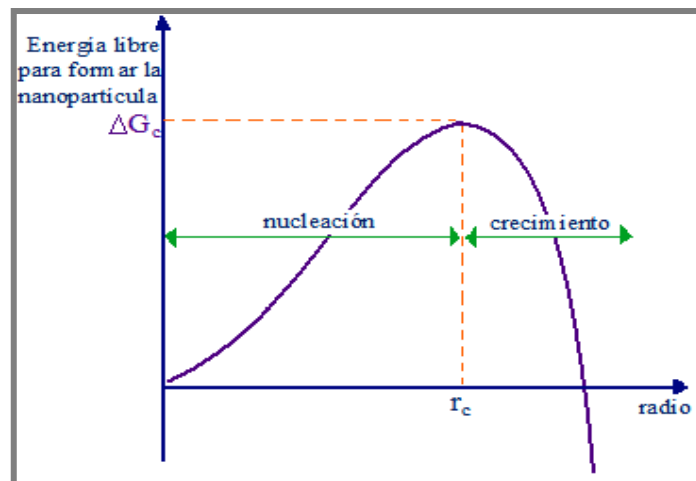


Figura 2. Nucleación y crecimiento de una partícula esférica. [37].

Cuando $r < r_c$ la nueva fase se llama embrión y el proceso nucleación; cuando $r > r_c$ la partícula se llama núcleo y el proceso crecimiento. La energía libre del punto crítico corresponde al máximo de ΔG_r , denominado ΔG_c :

$$\Delta G_c = \frac{4}{3} \pi r_c^2 \gamma = \frac{16\pi\gamma^3}{3(\Delta G_v)^2} \quad (1.41)$$

1.1.3.2 Modelo de LaMer- Nucleación homogénea

Para obtener una distribución monodispersa, es necesario tener en cuenta, al menos cualitativamente, la cinética de la nucleación y del crecimiento; de lo contrario pueden ocurrir simultáneamente, lo cual hace que se produzca una población polidispersa de tamaños de partícula [35]. Las etapas de control de la nucleación homogénea se muestran en la Figura 3. El soluto puede ser cualquier complejo en solución. La velocidad de crecimiento es mayor que cero por encima del límite de solubilidad C_s ; para que ocurra la nucleación, se requiere una mínima concentración de supersaturación $C_{nu}^{min} > C_s$. La nucleación ocurre en la región II, así como también el crecimiento. Sin embargo, si G es relativamente pequeña en comparación con N , es posible mantener C por encima de C_{min}^{nu} por un tiempo considerable para que los núcleos se puedan formar mientras no se produzca un crecimiento apreciable.

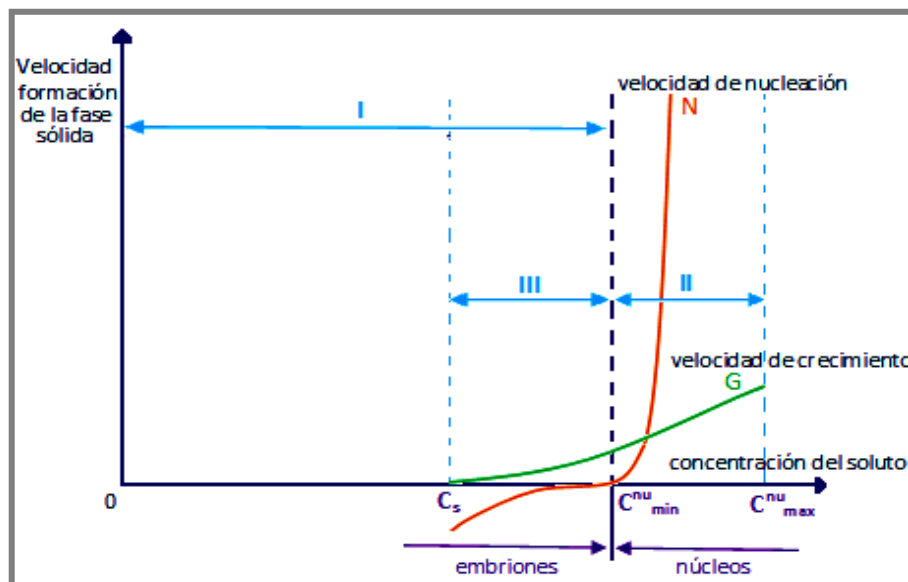


Figura 3. Variación de la velocidad de nucleación y crecimiento con la concentración del soluto. [37].

Para detener la nucleación, debe disminuirse la concentración del soluto por debajo de C_{min}^{nu} ; manteniéndola sobre la C_s , para que solo el crecimiento proceda.

1.1.3.3 Soles

La suspensión coloidal o sol es la dispersión estable de partículas sólidas. La estabilidad que está involucrada es del tipo cinético y no termodinámico, ya que estas partículas se encuentran en continuos choques unas con otras, debido al movimiento Browniano. Las partículas coloidales tienen una relación área-volumen muy grande, además de una gran energía superficial total. Por lo tanto, el único estado termodinámicamente estable sería la aglomeración de estas para formar un único monolito. Los soles se pueden dividir en dos grupos: electrostáticos y estéricos.

a) Soles electrostáticos

En estos soles predominan dos tipos de fuerzas: las fuerzas de Van der Waals (atractivas), y las fuerzas electrostáticas (repulsivas entre partículas).

Doble capa eléctrica:

Cuando una partícula sólida se dispersa en un líquido que contiene un electrolito, algunos iones específicos se pueden adsorber preferentemente en la superficie de la partícula. La superficie adquiere una densidad de carga eléctrica, un potencial eléctrico ψ_0 . Los iones que son adsorbidos sobre las partículas son denominados iones determinantes del potencial eléctrico. Para los óxidos, en la mayoría de los casos, este potencial se debe a la presencia de iones H^+ y OH^- en la superficie, por lo tanto el pH del medio es una variable fundamental. Cada óxido está caracterizado por un pH particular al cual las partículas no tienen carga, el cual se conoce como punto de carga cero (zpc). A $pH > zpc$, las partículas adsorben más iones OH^- que iones H^+ , así que están cargados negativamente. En cambio, si $pH < zpc$, las partículas están cargadas positivamente.

A los iones en el medio líquido que no están adsorbidos sobre la partícula, se les conoce como iones ‘indiferentes’. Como un sol es eléctricamente neutro, los iones con una carga opuesta a la de la partícula están en exceso alrededor de esta, estos iones son denominados contraiones. Estos iones no están adsorbidos sobre la partícula, se mueven constantemente por el movimiento Browniano, pero estadísticamente son atraídos por las partículas, formando una capa difusa a su alrededor.

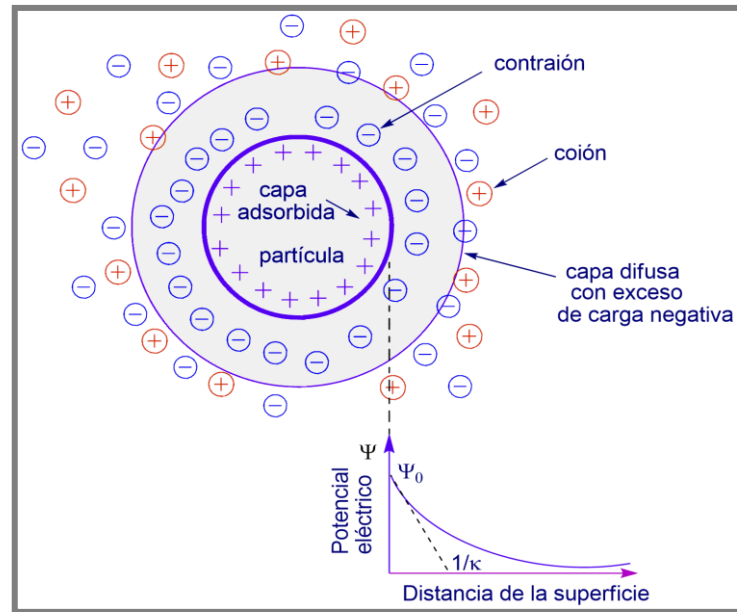


Figura 4. Doble capa eléctrica alrededor de las partículas coloidales [37].

La composición de estos iones es alta en las cercanías de la partícula y disminuye progresivamente conforme nos alejamos de ella, hasta que alcanza una concentración promedio en el seno del líquido, lejos de la partícula. Los iones en el medio líquido que tienen el mismo signo que los iones adsorbidos sobre la partícula se llaman co-iones. Estos están repelidos por las capas en la superficie de la partícula, así la concentración de estos es pequeña en las cercanías, y aumenta hasta un valor medio en las lejanías de la partícula.

b) Soles estéricos:

Las interacciones estéricas ocurren cuando macromoléculas poliméricas son adsorbidas sobre las partículas coloidales, interaccionando con el solvente.

Soluciones poliméricas:

El comportamiento de los polímeros como soluto en solventes, es controlado por dos tipos de fenómenos. Por un lado, el movimiento Browniano hace que cada macromolécula polimérica se extienda en el solvente, con un cierto límite debido a la longitud finita de la cadena del polímero y a su elasticidad. Por otro lado, las interacciones tales como las de Van der Waals, ocurren entre átomos en la misma cadena del polímero, y entre los átomos en la cadena y los átomos del solvente.

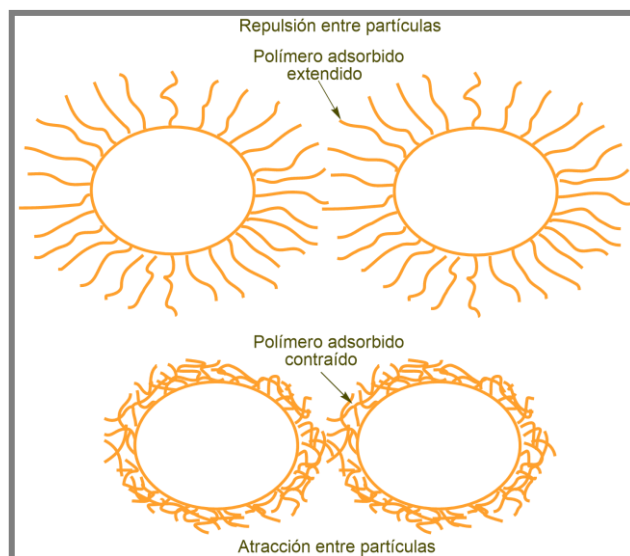


Figura 5. Interacciones estéricas entre partículas coloidales [37].

1.2 Nanopartículas de óxido de hierro

Las nanopartículas de óxido de hierro tienen amplias aplicaciones en biomedicina, biotecnología, ingeniería, ciencia de los materiales y áreas ambientales [41]. El interés de las Nps de óxido de hierro se debe a sus propiedades físicas, químicas, magnéticas, su alta relación superficie/tamaño, alta biocompatibilidad y fácil biodegradación en el organismo [2]. Sin embargo, para usos in vivo e in vitro, la superficie tiene que ser apropiada, por eso se modifican las partículas (funcionalización) para evitar la aglomeración, destrucción química y / o para unirse a otras sustancias (fármacos, células, etc.) [42].

Típicamente estas nanopartículas están formadas por magnetita (Fe_3O_4) o maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) nanocristalinas. [16, 41], pero también hay una fase α denominada hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), que no es estable y se obtiene por tratamiento térmico de la magnetita o la maghemita [43].

En base a estas propiedades, las nanopartículas magnéticas ofrecen un alto potencial de aplicaciones biomédicas, tales como: (a) terapia celular, (b) reparación de tejidos, (c) administración de fármacos, (d) formación de imágenes por resonancia magnética (MRI), (e) hipertermia, (f) magnetofección; etc. [44].

Las superficies de estas partículas podrían ser modificadas por capas poliméricas o metales inorgánicos (oro, plata) o superficies de óxido (por ejemplo, sílice o alúmina),

apropiadas para su posterior funcionalización por la unión de varias moléculas bioactivas [45].

Entre los métodos de síntesis de las nanopartículas de óxido de hierro, incluyen: la co-precipitación, sol-gel, microemulsión, síntesis por flujo de inyección, síntesis hidrotérmica, spray pirólisis de llama, descomposición de precursores orgánicos a alta temperatura, síntesis sonoquímica, reducción química y los métodos de oxidación de la nanopartículas de magnetita [41, 43, 46-47].

1.2.1 Magnetita

La magnetita, Fe_3O_4 , es un óxido de hierro magnético que tiene una estructura de espinela inversa cúbica con el oxígeno formando un empaquetamiento cerrado fcc y los cationes de Fe ocupando los sitios tetraédricos intersticiales y sitios octaédricos (Figura 6). Los iones Fe^{2+} bivalentes ocupan sitios O_h y los iones Fe^{3+} trivalentes están distribuidos equitativamente entre los sitios O_h y T_d . En la magnetita, ya que existe el mismo número de iones Fe^{3+} en los sitios O_h y T_d , que se compensan entre sí, la magnetización resultante surge sólo de los iones Fe^{2+} no compensados en los sitios O_h . Los electrones pueden saltar entre los iones Fe^{2+} y Fe^{3+} en los sitios octaédricos a temperatura ambiente, así la magnetita es un importante material semimetálico [43].

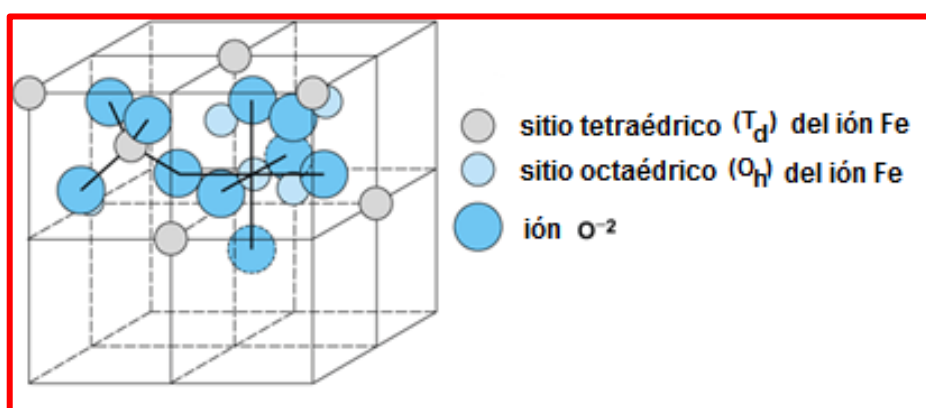


Figura 6. Estructura cristalina tipo espinela inversa de la magnetita Fe_3O_4 , mostrando los sitios T_d y O_h [43].

La magnetita presenta una densidad de $5,18 \text{ g/cm}^3$, cristaliza en el grupo espacial $\text{Fd}3m$ y su celda unidad en el sistema cúbico, con parámetro de red $a = 0,8395 \text{ nm}$, está compuesta por 8 fórmulas moleculares para un total de 56 iones: 32 oxígenos y 24 hierros. En la estructura los dos diferentes sitios cristalinos (que resultan tener geometría de

tetraedros y octaedros en relación con los átomos de oxígeno) forman la base para dos subredes cúbicas interpenetradas con contribuciones de momento magnético desiguales y antiparalelas. Este aspecto da lugar al comportamiento ferrimagnético del compuesto a baja temperatura ($T < 859 \text{ K}$) [1].

1.3 Nanopartículas de plata (NPs-Ag)

Los estudios han demostrado que el tamaño, la morfología, la estabilidad y las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas de plata son fuertemente influenciados por las condiciones experimentales, la cinética de la interacción de iones plata con agentes de reducción, y los procesos de adsorción del agente de estabilización con las nanopartículas de la plata. [48-50]. Por lo tanto, un campo de interés importante es el diseño de un método de síntesis en el que se controla el tamaño, la morfología y la estabilidad

Los métodos químicos más usados para la preparación de nanopartículas de plata son la reducción química, técnicas electroquímicas, y la reducción fotoquímica. En la literatura se reportan una gama de métodos para la síntesis de nanopartículas de plata y el método más frecuente para obtener estas nanopartículas en dispersiones coloidales en agua o disolventes orgánicos es la reducción química [51]. Los reductores comúnmente utilizados son borohidruro, D-glucosa [52], etilenglicol [53, 54], polietilenglicol [55], aldehídos, hidrazina, aminas, ascorbato, polisacáridos incluyendo quitosano, agente Tollens [50], citrato [56] y polifenoles como ácido gálico [57].

Se estima que los pasos elementales en la formación de NPs-Ag puede ser la generación de un átomo de plata neutro que subsecuentemente forma precursores cargados positivamente Ag_2^+ , Ag_4^{2+} , donde las agrupaciones más grandes siguen la agregación y forman las nanopartículas finales. La calidad de las nanopartículas obtenidas en el proceso iónico está influenciada directamente por muy pequeñas cantidades de agua absorbida, la contaminación por cloruro y reactivos de partida sobrantes que desestabilizan y / o afectan la morfología de las nanopartículas metálicas [48].

1.4 Actividad antibacteriana de las NPs-Ag

La plata ha sido ampliamente utilizada desde la antigüedad como un agente terapéutico para muchas enfermedades. De hecho, antes del comienzo de terapia con antibióticos, se utilizó plata por su actividad antiséptica, específicamente para el tratamiento de heridas abiertas y quemaduras.

La potente actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como su baja toxicidad para las células de mamíferos en bajas concentraciones y la posibilidad de desarrollar la nueva generación de antibióticos hacen que las NPS-Ag sean una alternativa atractiva para superar el problema de resistencia a los medicamentos [58].

La actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata, también es de gran interés ya que parece ser independiente de la cepa de bacterias. Fundamentalmente, la plata afecta a las cepas resistentes a los antibióticos, *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (MRSA), la *Escherichia coli* O157, y otros. Las razones para esto no son totalmente claras todavía, pero podrían estar relacionados con los mecanismos de acción de iones de plata en bacterias. Algunos efectos observados incluyen cambios estructurales en las paredes celulares de las bacterias y las membranas intracelulares y nucleares, así como desnaturalización de ADN y ARN bacteriano, inhibición de la replicación. Posiblemente estos efectos en el ADN y ARN bacteriano se relacionan con los efectos observados en la respiración mitocondrial y citosólica de la proteína que conducen a la muerte celular bacteriana. [59].

Li et al. [60] señalan tres posibles mecanismos antibacterianos de nanopartículas de plata:

- (1) La adhesión de las nanopartículas a la superficie de bacterias, alteran la permeabilidad de la membrana. El pequeño tamaño y el área superficial extremadamente grande de las nanopartículas les permite hacer fuerte contacto con la superficie de microorganismos.
- (2) Las nanopartículas de plata que penetran en el interior de la célula bacteriana, causan daños en el ADN. Los autores sugieren que esto se debe a un transporte más fácil (activo) a través de la membrana celular de las nanopartículas de plata no cargadas que de iones de plata con carga.

- (3) La disolución de las nanopartículas de plata que liberan iones Ag^+ antimicrobiano, los cuales pueden interactuar con las proteínas que contienen azufre en la pared celular bacteriana. Este fenómeno es a menudo considerado como el principal mecanismo de la actividad antimicrobiana de Nps-Ag, por lo que se puede suponer que las propiedades antimicrobianas de iones de plata se puede aplicar al caso Nps-Ag. Al mismo tiempo, el problema de la resistencia bacteriana a los iones de plata se mantiene significativo para al menos algunos usos de las Nps-Ag.

La interacción de los iones Ag^+ disueltos en la pared celular y las proteínas citoplasmáticas propuesto por Cao et al. [61], también resalta el hecho de que la interacción de iones de plata con el grupo tiol de las enzimas vitales puede resultar en la alteración de la función o inactivación. De acuerdo con Lee et al. [62], los iones de plata inhiben las enzimas que actúan en los ciclos de fósforo, azufre y nitrógeno de las bacterias nitrificantes.

Según Samberg et al. [63], la causa de la actividad antibacteriana de los iones de plata es por el efecto sinérgico entre la unión de los iones de plata a la pared celular, su absorción y la posterior acumulación en la célula, y su interferencia con biomoléculas críticas dentro de la célula.

Según Wong y Liu [64] los iones de plata también pueden interactuar con compuestos que contienen fósforo (por ejemplo, ADN). La interferencia con los procesos de replicación de ADN, detiene la proliferación bacteriana y disminuye el número de células con el tiempo.

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) también se generan fuera de la célula, en el medio, o en el interior de la célula, también como consecuencia del daño/interrupción celular.

- (4) Como se describe Cao et al. [61], el gradiente electroquímico de protones en bacterias se establece por procesos respiratorios (transferencia neta de protones desde el interior al exterior de las bacterias). La síntesis de la adenosina trifosfato (ATP) se lleva a cabo cuando los protones entran en la célula (a través de la ATPasa), por lo que el gradiente electroquímico es un motor esencial para la síntesis de ATP en bacterias (procesos similares ocurren en la mitocondria). Si se

interrumpen los procesos, no es proporcionada la energía esencial para todas las reacciones dependientes de la energía, lo que conduce a la muerte celular.

La forma de las nanopartículas de plata puede ser un factor importante en sus propiedades antibacterianas. Pal et al. [65] muestran la acción biocida más fuerte de las NPS-Ag triangulares con un plano (111) frente a *Escherichia coli* (en comparación con las nanopartículas esféricas, con forma de bastón y con AgNO_3). Estas nanopartículas de plata triangulares dieron como resultado la inhibición casi completa del crecimiento bacteriano a un contenido de plata total de $1\mu\text{g}$. Los autores especulan que la acción de las nanopartículas de plata es ampliamente similar a la de los iones de plata, y que una célula bacteriana en contacto con nanopartículas de plata, toman los iones de plata, que inhiben las enzimas respiratorias, que facilita la generación de especies reactivas de oxígeno y en consecuencia, dañan la célula.

Los mecanismos de acciones antibacterianas de plata se resumen en la Figura 7.

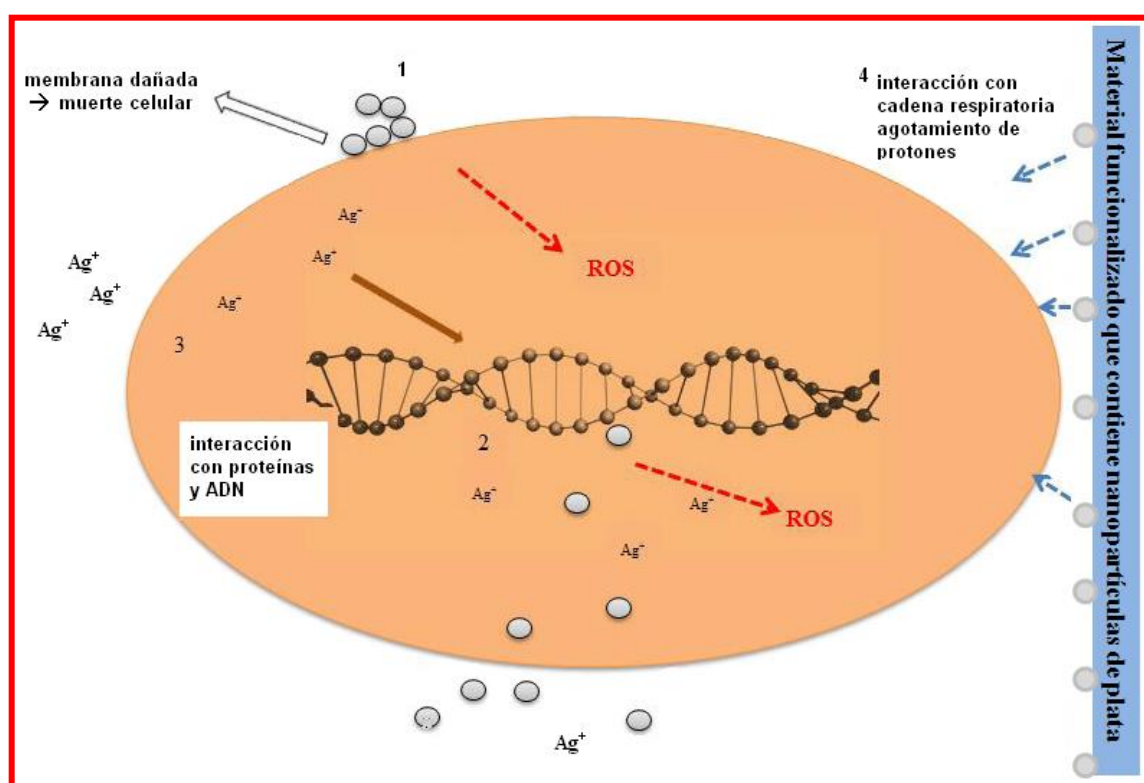


Figura 7. Representación esquemática de los mecanismos conocidos de acción antibacteriana de nanopartículas de plata y plata iónica liberada. Los números 1-4 corresponden a los mecanismos descritos anteriormente. Los círculos grises indican las NPs- Ag y plata iónica Ag^+ liberada de las nanopartículas [59].

Los mecanismos de acción de las NPs-Ag frente a algunos patógenos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Detalles de NPs-Ag y sus mecanismos de acciones contra diferentes organismos [48].

| Organismo | Tamaño (nm) | Recubrimiento | Mecanismo de acción |
|-----------------|-------------|-------------------|---|
| Bacteria | | | |
| E. coli | 9.68 | Gelatina | Alteración de la permeabilidad de la membrana y la respiración. |
| | 1-10 | Sin recubrimiento | |
| | 13.5 | Sin recubrimiento | |
| P. aeruginosa | 9.68 | Gelatina | Daños irreversibles en las células bacterianas. |
| | 55 y 278 | Quitosano | |
| | 1-10 | Sin recubrimiento | Alteración de la permeabilidad de la membrana y la respiración. |
| S. aureus | 55 y 278 | Quitosano | Daños irreversibles en las células bacterianas. |
| | 13.5 | Sin recubrimiento | |
| | 11.23 | PEG | |
| S. epidermidis | 14 | Sin recubrimiento | Inhibición de la replicación del ADN bacteriano, daño a la membrana del citoplasma bacteriano, modificación de los niveles de ATP intracelulares. |
| S. typhi | 55 y 278 | Quitosano | Inhibición de la replicación del ADN bacteriano, daño a la membrana del citoplasma bacteriano, modificación de los niveles de ATP intracelulares. |
| V. cholera | 1-10 | Sin recubrimiento | Alteración de la permeabilidad de la membrana y la respiración. |
| Hongos | | | |
| C. albicans | 100 | Sin recubrimiento | Alteración de la integridad de la membrana. |

1.5 Microorganismos estudiados

1.5.1 Clasificación de las bacterias con la técnica de análisis microbiológico de Tinción de Gram [66, 67]

Un método de identificación de las bacterias es la Tinción de Gram que permite identificar la morfología de la célula bacteriana en cocos y bacilos Gram positivos y Gram negativos según la estructura de su pared celular.

Se puede discriminar entre dos grandes grupos de bacterias: **Gram positivas** (se tiñen de color violeta) y **Gram negativas** (se tiñen de color rosado) debido a las diferencias en la composición de su pared celular.

La pared celular está formada por peptidoglucano, la diferencia consiste en que la pared de las bacterias Gram positivas es gruesa y está formada por varias capas de peptidoglucano aproximadamente 80%-90% (formado por los azúcares N-acetilglucosamina más N-acetilmuránico y un tetrapéptido) y algo de ácido teicoico, mientras que la pared de las bacterias Gram negativas está formada por una sola capa delgada de peptidoglucano aproximadamente hasta un 20% la cual está rodeada por una membrana exterior compuesta de fosfolípidos, lipopolisacáridos, y lipoproteínas y también tiene una membrana interna.

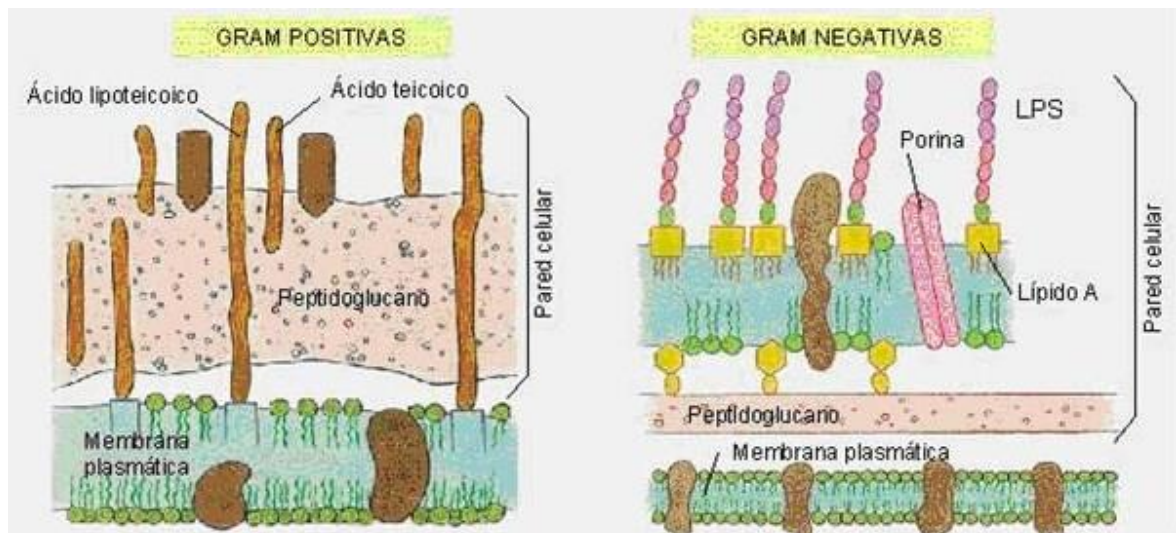


Figura 8. Pared celular de las bacterias Gram positivas y Gram negativas [68].

1.5.2 *Enterobacter aerogenes*

La bacteria Gram negativa *Enterobacter aerogenes* está incluida dentro de las 12 especies del género *Enterobacter* y es responsable de una variedad de infecciones nosocomiales. Es aeróbica y anaeróbica facultativa [69]. Es una especie común en las aguas y en el tracto intestinal, siendo también un patógeno ocasional, pudiendo producir afecciones del tracto urinario [70]. Esta bacteria coloniza con frecuencia las superficies interiores de las cañerías de agua y tanques de almacenamiento y crecen formando una biopelícula, cuando las condiciones son favorables [71]. Es un microorganismo indicador de contaminación en aguas y pertenece al grupo de los coliformes totales.

La Norma Técnica Nacional (NTN ITINTEC 214.003), incluye a los coliformes totales como indicador de contaminación de aguas.

1.5.3 *Enterococcus faecalis*

La bacteria *Enterococcus faecalis* pertenece a las 16 especies del género *Enterococcus*. Los *Enterococcus* se clasificaron anteriormente como *Streptococcus* del grupo D; sin embargo la bacteria *Enterococcus* presenta varios rasgos distintivos mediante los cuales se separó del *Streptococcus*.

Las bacterias *Enterococcus* son Gram-positivos, esféricos, ovales o cocobacilares y están dispuestos en pares y cadenas cortas. Crecen a un rango de temperatura de 35-37 °C [69]. Se ha demostrado una correlación entre los niveles de *Enterococcus* en el agua y una mayor incidencia en enfermedades gastrointestinales en nadadores que usaron esta agua [71]. En aguas de pozo esta bacteria puede producir gastroenteritis humana, tiene una relación directa entre su densidad y aparición de enfermedades entéricas y son mejores indicadores de contaminación fecal en lugar de los coliformes [72]. Esta bacteria es un indicador de contaminación fecal de fuentes humanas. El género *Enterococcus* también es considerado como el indicador bacteriológico más eficiente para evaluar la calidad de agua de mar para uso recreativo, debido a que es muy resistente a las condiciones salinas de este medio y además, está relacionado directamente con gastroenteritis, enfermedades respiratorias, conjuntivitis y dermatitis, entre otras [73].

1.5.4 Organismos indicadores en el agua

Los organismos indicadores indican la contaminación fecal en aguas. Éstas son generalmente bacterias comensales intestinales, que están presentes y son excretadas en gran número en heces humanas y animales. Rara vez se encuentran en otras fuentes.

Las bacterias estudiadas en este trabajo de tesis, está incluidas como bacterias indicadoras de contaminación fecal.

La presencia de organismos indicadores indica que [69]:

- la materia fecal ha entrado en el suministro de agua,

- las bacterias fecales no han sido sacrificadas o eliminadas por procesos de purificación, y
- el suministro de agua puede estar contaminado con patógenos intestinales peligrosos.

Algunos de los organismos que se utilizan como organismos indicadores son los siguientes [36, 69]:

- **Coliformes:** Son las bacterias que se producen en grandes cantidades en las aguas residuales y las heces. También se encuentran en el medio ambiente en ausencia de contaminación fecal. Tradicionalmente, estos son miembros de *Enterobacteriaceae*, que crecen en presencia de sales biliares y producen ácido y gas de la lactosa en 48 horas a 37 °C. El recuento total de coliformes es ampliamente considerado como el indicador más fiable de la calidad del agua potable. El grupo coliforme abarca los géneros *Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Serratia*. Las bacterias coliformes, no deben estar presentes en sistemas de abastecimiento, almacenamiento y distribución de agua, y si ocurriese, indicaría que el tratamiento fue inadecuado o que se produjo contaminación posterior.
- **Coliformes fecales:** Los coliformes fecales (termorresistentes) se definen como el grupo de organismos coliformes que pueden fermentar la lactosa a 44°-45°C, que comprenden el género *Escherichia* y en menor grado, especies de *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter*. Los organismos coliformes termorresistentes distintos de *Escherichia Coli* pueden provenir de aguas orgánicamente enriquecidas, por ejemplo de efluentes industriales o de materias vegetales y suelos en descomposición.
- **Streptococos fecales:** Estas bacterias se encuentran en el tracto intestinal de seres humanos y animales. Pertenecen al género *Enterococcus*, son cocos negativos a la catalasa y Gram-positivos. Pueden sobrevivir a 60 ° C durante 30 minutos, y pueden crecer a un pH de 9.6 y en presencia de cloruro sódico al 6.5%.
- **Clostridios reductores de sulfitos:** Son miembros del género *Clostridium*, que pueden reducir sulfito a sulfuro. El más importante del grupo es *Clostridium perfringens*. Aunque es menos abundante en heces humanas que otros organismos indicadores, sus esporas pueden sobrevivir en el medio ambiente y los procesos de tratamiento son mejores que la mayoría de otras bacterias indicadoras.

- ***Pseudomonas***: Son bacilos aerobios Gram negativos y móviles, algunos de los cuales producen pigmentos solubles en agua. Utilizan una variedad de compuestos orgánicos como fuentes de carbono y energía. La presencia de este microorganismo es un indicador de la calidad del agua ya que su resistencia al cloro es superior a la de otros microorganismos aislados del agua.

En el Perú, la Norma Técnica Nacional (NTN ITINTEC 214.003) contempla microorganismos indicadores a las bacterias heterotróficas, coliformes totales y fecales.

Se realizó una investigación en las aguas de consumo humano que provienen de las aguas superficiales del Río Rímac tratadas mediante procesos físicos y químicos; las cuales fueron aguas de inmuebles (224 cisternas evaluadas) y aguas de pozo subterráneo, distribuida por camiones cisterna a zonas urbano-marginales (56 pozos) [74]. El agua proveniente de la red pública no presentó contaminación microbiológica, sin embargo, si se evidenció contaminación en el sistema de abastecimiento y distribución de los inmuebles, en donde el 17.86% presentó contaminación microbiológica (no apta para el consumo humano), principalmente por bacterias heterotróficas (70 %), coliformes totales (70 %) y coliformes fecales (52.5%), según la Norma Técnica Nacional. Se encontró *Pseudomonas aeruginosa* en el 8.03 % de muestras de inmuebles, también se encontró 6.23 % de *Streptococcus* fecales (no están establecidas en la NTN). La existencia de fugas en el interior de los inmuebles y los sistemas de drenaje domiciliarios hacen posible la contaminación por coliformes totales y coliformes fecales [74]. Si se considera a *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus* fecales como indicadores adicionales a los establecidos en la Norma Técnica Nacional, el porcentaje de muestras no aptas para el consumo humano se elevaría de 17.86 % a 23.66 % [36]. En las muestras de agua de pozo, un 73.68 % presentó contaminación microbiológica de acuerdo a la NTN. Los indicadores encontrados fueron: coliformes totales y fecales (92.86 %) y bacterias heterotróficas (42.86 %). Se encontró *Pseudomonas aeruginosa* en el 60.71% de las muestras y 46.43 % de *Streptococcus* fecales. Si se considera a *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus* fecales como indicadores adicionales a los establecidos en la Norma Técnica Nacional, el porcentaje de muestras no aptas para el consumo humano se elevaría de 73.68 % a 94.64 % [36].

Por esta razón, es importante encontrar alternativas de inhibición antibacteriana de coliformes, *Streptococos* fecales y *Pseudomonas aeruginosa* para obtener agua apta para consumo humano.

1.6 Actividad antibacteriana: Conteo de colonia [70]

Es el método más usado para medir poblaciones bacterianas, ya que a diferencia de otros permite contabilizar el crecimiento de células viables, es decir células que pueden dar una descendencia. Este método requiere mínimo 24 horas para conocer los resultados del conteo.

Esta técnica se fundamenta en que cada colonia está compuesta por un solo tipo de bacteria y se supone que cada célula viable puede formar una colonia. Los recuentos se informan en unidades formadoras de colonias (UFC). Existen dos métodos para realizar el recuento en placa: el método de extensión en placa o el método de placa vertida (Figura 9).

- Método de extensión en placa: Un volumen de la muestra (0.1ml) se coloca sobre la superficie de la placa que contiene el medio y se extiende con ayuda de un asa de extensión.
- Método de placa vertida: la muestra se mezcla con el medio de cultivo y se vierte en la placa estéril. Permite inocular volúmenes mayores de la muestra. En la mayoría de los casos antes de realizar la siembra las muestras tienen que diluirse (diluciones seriadas), cuando el número de colonias en placa supera el de 300 UFC.

Una vez inoculadas, las placas se incuben a temperatura adecuada y cuando aparecen, se cuentan las colonias.

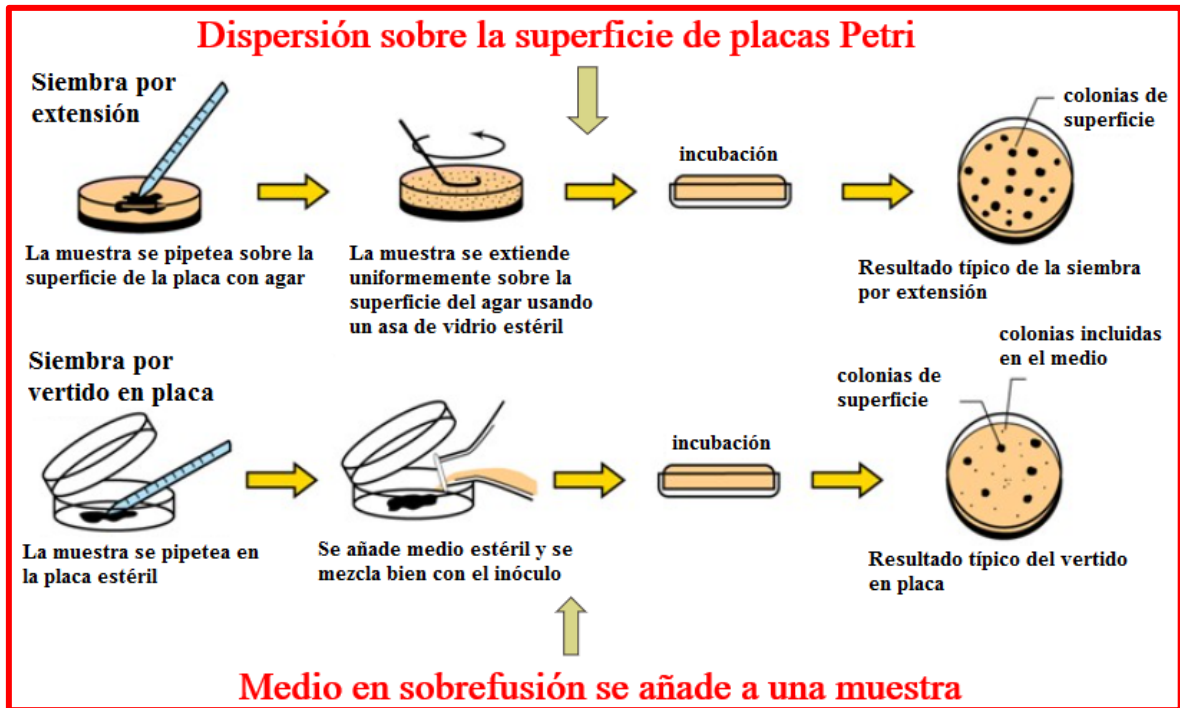


Figura 9. Dos métodos de realizar una determinación de células viables (conteo en placa). En cada caso la muestra se diluye normalmente antes de sembrar [70].

Para obtener el número apropiado de colonias casi siempre se diluye la muestra. Como raramente se sabe de antemano el número de células viables, normalmente se hace más de una dilución. Lo más frecuente es realizar diluciones decimales de la muestra (Figura 10). Para hacer una dilución de 10^{-1} se mezclan 0.5 ml de la muestra con 4.5 ml de diluyente o 1 ml de diluyente con 9 ml de diluyente. En la mayoría de los casos se realiza diluciones seriadas para alcanzar la dilución final deseada.

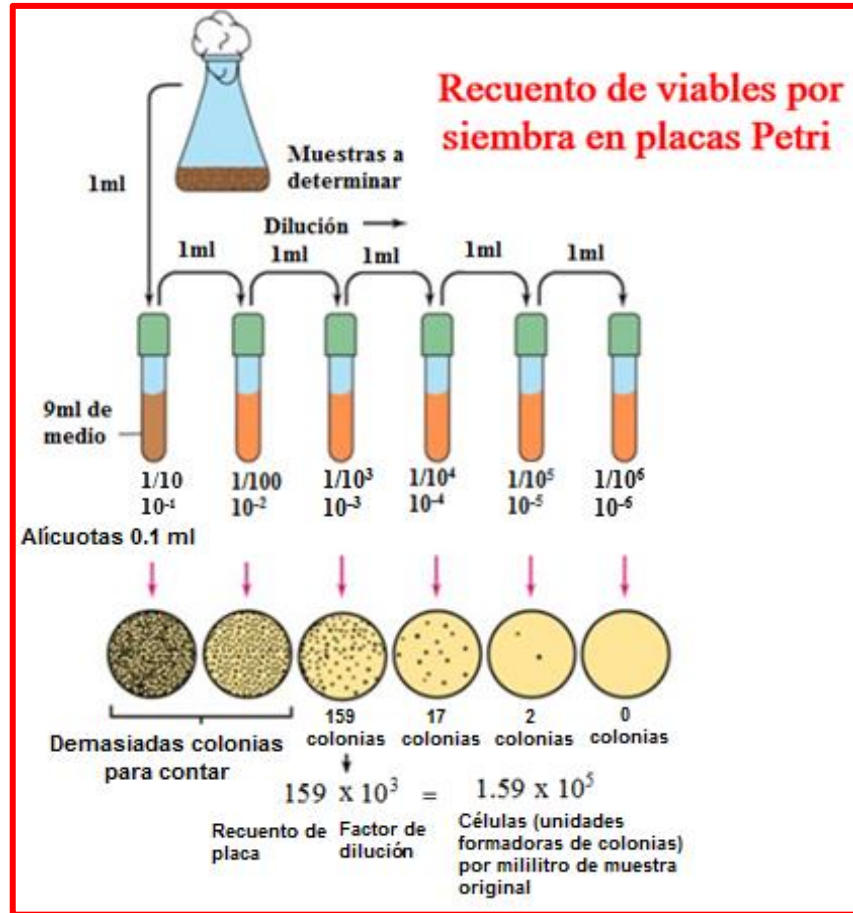


Figura 10. Procedimiento para la determinación de viables usando diluciones seriadas de la muestra. El líquido estéril usado para hacer las diluciones puede ser agua, pero una solución salina equilibrada o medio de cultivo suele dar mejor recuperación [70].

Capítulo 2

TÉCNICAS EXPERIMENTALES

2.1 Introducción

En este capítulo, se hará un resumen de las técnicas experimentales usadas en la caracterización de las MNPs de magnetita y del nanocompuesto binario en su forma sólida y líquida, tales como: espectrofotometría UV-VIS, espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia Raman, espectroscopia Mössbauer, difracción de rayos X (DRX), dispersión de luz dinámica (DLS), microscopía electrónica de barrido (SEM) con energía dispersiva de rayos X (EDS).

2.2 Espectrofotometría UV-VIS

El principio de la espectroscopia ultravioleta-visible involucra la absorción de radiación ultravioleta – visible por una molécula, causando la promoción de un electrón de un estado basal a un estado excitado, liberándose el exceso de energía en forma de calor. La longitud de onda (λ) comprende entre 190 y 800 nm [75].

Cuando un haz de radiación UV-Vis atraviesa una disolución conteniendo un analito absorbente, la intensidad incidente del haz (I_0) es atenuada hasta I (intensidad de luz que logra atravesar el analito). Esta fracción de radiación que ha logrado traspasar la muestra se denomina transmitancia, ($T = I/I_0$). En este caso, se utiliza la absorbancia (A) en lugar de la transmitancia ($A = -\log T$), por estar relacionada linealmente con la concentración de la especie absorbente según la Ley de Beer-Lambert:

$$A = -\log T = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad (1.42)$$

donde ε : coeficiente de absortividad molar, b : camino óptico y c : concentración de la especie absorbente [75].

2.2.1 Resonancia del plasmón de la superficie [76]

La presencia de electrones libres en la banda de conducción de la superficie de las nanopartículas metálicas que reciben un haz de luz incidente, induce una excitación colectiva de estos electrones libres, como consecuencia de la fuerte interacción con la luz incidente; se produce una oscilación coherente deslocalizada de los electrones confinados en la superficie de las nanopartículas metálicas, en la interfaz metal-dieléctrico o metal-semiconductor; la excitación electromagnética se llama polaritón del plasmón de superficie; el polaritón es una casi-partícula híbrida resultante del fuerte acoplamiento entre la luz y los electrones libres en la superficie de una nano partícula.

Para determinadas frecuencias de la energía incidente, se produce un acoplamiento entre las frecuencias de la onda incidente y de la oscilación del polaritón; este fenómeno se llama resonancia del plasmón de superficie y tiene la capacidad de absorber determinadas frecuencias de la luz incidente y de transmitir las frecuencias no absorbidas que se asocian a un determinado color.

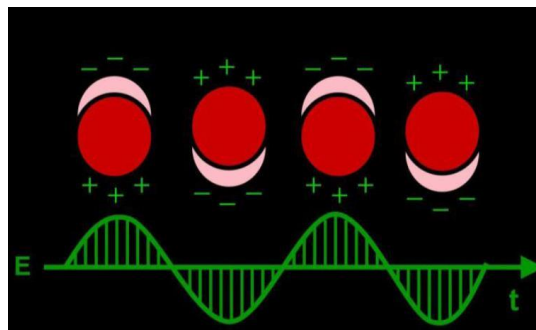


Figura 11. Resonancia plasmónica (polarización de una nanopartícula metálica [76]).

En las nanopartículas de los metales nobles como el oro y la plata, la resonancia es máxima y su frecuencia se produce en el campo visible del espectro electromagnético. Esta resonancia se origina cuando el tamaño de las nano partículas es mucho menor que la longitud de onda de la radiación incidente, $d \ll \lambda$. En estas circunstancias se producen excitaciones dipolares fuertes de los electrones libres en la superficie de la partícula; con la resonancia del plasmón se produce un fuerte acoplamiento de los electrones libres con el haz de luz incidente como consecuencia de los fotones absorbidos.

La frecuencia de resonancia y la anchura de banda de absorción del plasmón, dependen del tamaño y de la forma de las nanopartículas.

2.3 Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) [75]

La región infrarroja del espectro electromagnético se extiende entre la zona del visible y la de las microondas, que corresponde a los números de onda entre 12800 cm^{-1} a 10 cm^{-1} aproximadamente. La sección de mayor utilidad de la región IR es la que se extiende entre 4000 y 400 cm^{-1} denominada región infrarroja media.

Aunque el espectro IR caracteriza a cada compuesto, se encuentra que ciertas agrupaciones atómicas dan lugar siempre a bandas en un determinado intervalo de frecuencias, independiente de la naturaleza del resto de la molécula. La existencia de estas bandas, características de grupos funcionales, permite una amplia utilización de la espectroscopia IR en la determinación estructural.

La absorción de radiación en el infrarrojo se limita, en gran parte, a especies moleculares para los cuales existen pequeñas diferencias de energía entre los distintos estados vibracionales y rotacionales. Para absorber radiación en el infrarrojo, una molécula debe sufrir un cambio neto en el momento dipolar como consecuencia de su movimiento de vibración o de rotación. Sólo en estas circunstancias, el campo eléctrico alterno de la radiación puede interactuar con la molécula, y provocar cambios en la amplitud de alguno de sus movimientos.

2.3.1. Instrumentación

En este trabajo, se utiliza un equipo con transformada de Fourier (FTIR), el cual está basado en determinaciones interferométricas, donde someten a la muestra a la irradiación simultánea proveniente de la fuente IR policromática. Este tipo de equipo suministra la información en forma digitalizada y se ha impuesto por la rapidez, sensibilidad y resolución alcanzables. El componente más importante es el interferómetro (Figura 12).

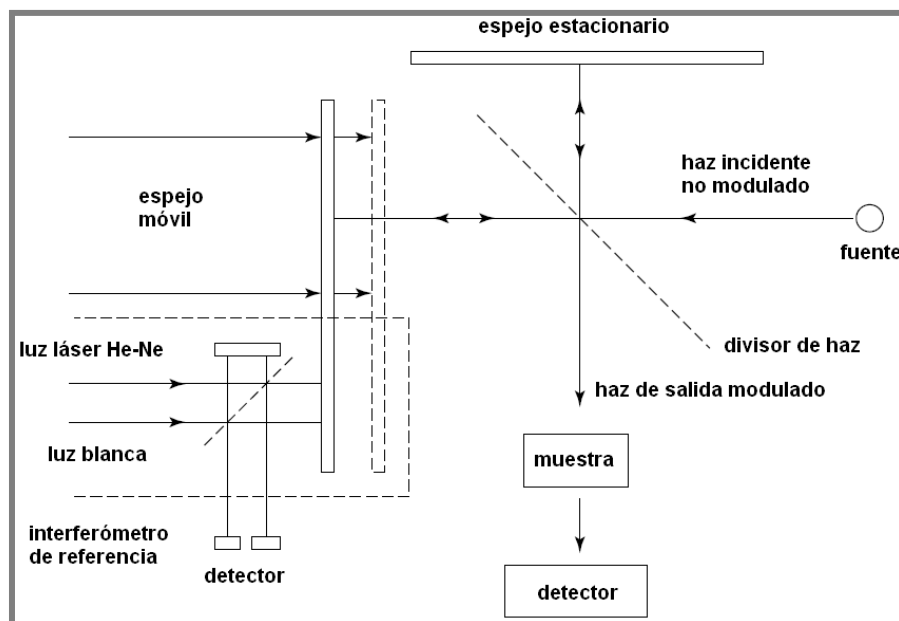


Figura 12. Esquema de un espectrómetro FTIR con un interferómetro Michelson [77].

El interferómetro Michelson consta de dos espejos planos perpendiculares, uno de los cuales puede viajar en una dirección perpendicular al plano. Una película semi-reflectante, el divisor de haz, biseca los planos de estos dos espejos. Si un haz colimado de radiación monocromática de longitud de onda λ (cm) se pasa a un divisor de haz ideal, el 50% de la radiación incidente se reflejará a uno de los espejos, mientras que 50% se transmitirá a otro espejo. Los dos haces se reflejan a partir de estos espejos, volviendo al divisor de haz, donde se recombinan e interfieren. El cincuenta por ciento del haz reflejado desde el espejo fijo se transmite a través del divisor de haz, mientras que 50% se refleja de nuevo en la dirección de la fuente. El haz que emerge del interferómetro a 90° del haz de entrada se llama el haz transmitido y este es el haz detectado en espectrometría FTIR [77].

2.4 Espectroscopia Raman

La espectroscopia Raman es una técnica fotónica que proporciona información química y estructural de casi cualquier material orgánico o inorgánico. Los espectros Raman se obtienen al irradiar una muestra con una fuente potente de rayos láser de radiación monocromática visible o infrarroja. Durante el proceso se registra el espectro de la radiación dispersada a un cierto ángulo, casi siempre 90° , con ayuda de un espectrómetro apropiado [75].

Es una técnica que se realiza directamente sobre el material a analizar sin necesidad de realizar tratamientos previos y que no conlleva ninguna alteración de la superficie por la que se realiza el análisis, por tanto, es una técnica no destructiva.

En la Figura 13, la muestra es irradiada con un haz monocromático de energía $h\nu_{ex}$ y como la longitud de onda de la excitación está muy lejos de una banda de absorción, se puede considerar que la excitación afecta un estado virtual del nivel energético j , indicado mediante la línea discontinua de la Figura 13a. Una molécula en el nivel vibracional fundamental ($\nu=0$) puede absorber un fotón de energía $h\nu_{ex}$ y volver a emitir un fotón de energía $h(\nu_{ex} - \nu_v)$, como se ilustra a la izquierda en la Figura 13a. Cuando la radiación difundida es de frecuencia más baja que la radiación de excitación se denomina difusión de Stokes. Las moléculas en un estado vibracionalmente excitado ($\nu=1$) pueden difundir también radiación de manera inelástica y producir una señal Raman de energía $h(\nu_{ex} + \nu_v)$. La radiación difundida de una frecuencia más alta que la radiación de la fuente se llama difusión anti-Stokes. La dispersión elástica también se presenta con emisión de un fotón de la misma energía que el fotón de excitación, $h\nu_{ex}$. La radiación difundida de la misma frecuencia que la fuente recibe el nombre de difusión de Rayleigh [75]. El espectro Raman simplificado se muestra en la Figura 13b.

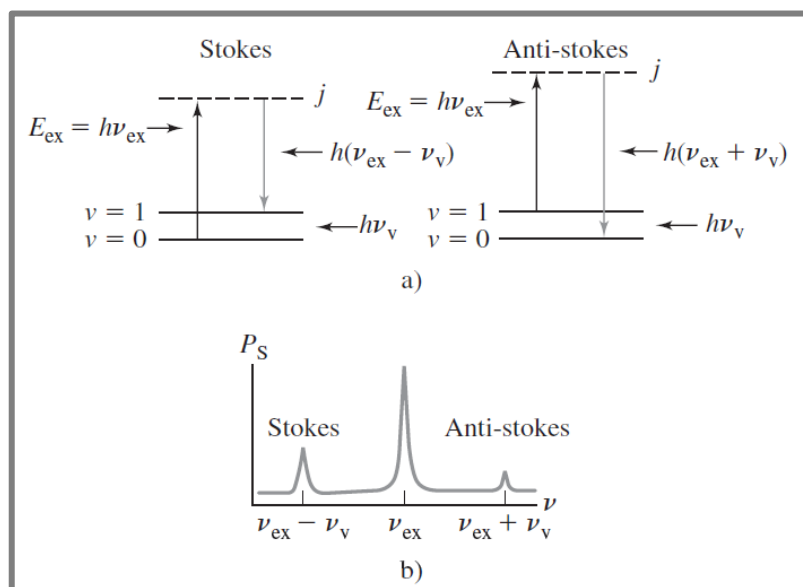


Figura 13. Origen del espectro Raman a) Origen de los espectros Raman. La radiación incidente causa excitación, hasta un nivel virtual j y una reemisión posterior de un fotón de energía baja (izquierda) o alta (a la derecha). b) El espectro Raman con emisiones de baja frecuencia (difusión de Stokes) y emisiones de frecuencia más alta denominadas (difusión anti-Stokes) [75].

El espectrómetro Raman contiene cuatro componentes principales, que incluyen [78]:

- (1) Fuente de excitación, que es generalmente un láser de onda continua (CW)
- (2) Sistema de iluminación y recogida de muestras
- (3) Selector de longitud de onda
- (4) Sistemas de detección y control / procesamiento informático

Un esquema de la disposición de estos componentes se muestra en la Figura 14.

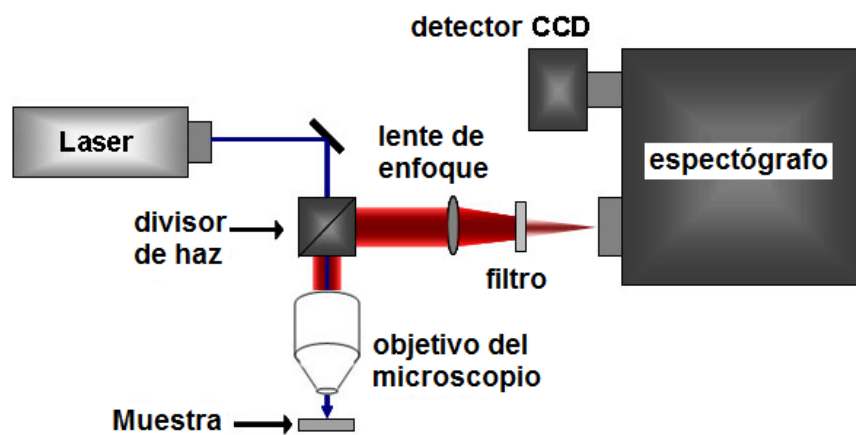


Figura 14. Espectrómetro Raman [79].

2.5 Espectroscopia Mössbauer [80]

El efecto Mössbauer representa la ocurrencia de los procesos de emisión, absorción y dispersión de fotones gamma, los cuales tienen lugar sin la retirada del núcleo implícito en el proceso. Sin embargo, solo el núcleo con apropiados niveles de energía, tal como ^{57}Fe , ^{119}Sn o ^{151}Eu se puede emplear como fuentes, porque estos deben poseer un gran valor de fracción libre. Esta propiedad especial de la emisión y absorción de rayos gamma por núcleo de átomos que están enlazados en un sólido dirige esencialmente a una forma de espectroscopia teniendo un poder de resolución intrínseco mucho más grande que cualquier otra forma de espectroscopia. Ya que el ancho de la línea asociada con las transiciones de salida libre son mucho más pequeñas que las energías características correspondiendo a las interacciones entre núcleo y sus electrones de alrededor (las interacciones hiperfinas), el espectro Mössbauer presenta una estructura hiperfina.

El desplazamiento isomérico (desplazamiento químico) corresponde a la interacción eléctrica del monopolo entre la distribución de la carga nuclear y el potencial generado por la distribución de la carga electrónica penetrando el núcleo (Figura 15). La interacción eléctrica del monopolo se origina en el hecho de que un núcleo atómico ocupa un volumen finito y los electrones s tienen la capacidad de penetrar el núcleo y pasar una fracción de su tiempo dentro de la región nuclear. Como resultado de esta interacción, el nivel de energía nuclear será desplazado en una pequeña cantidad, diferente para cada estado nuclear. En un espectro Mössbauer, el desplazamiento isomérico se calcula a partir de la distancia de la línea de resonancia desde una velocidad Doppler igual a cero. La información de desplazamiento isomérico puede correlacionarse con el estado de oxidación del átomo Mössbauer en un ion complejo, electronegatividad de ligaduras, número de coordinación, así como otros parámetros. Como ejemplo, el espectro de la Figura 15 corresponde al cloruro de hierro (III) y es un singulete.

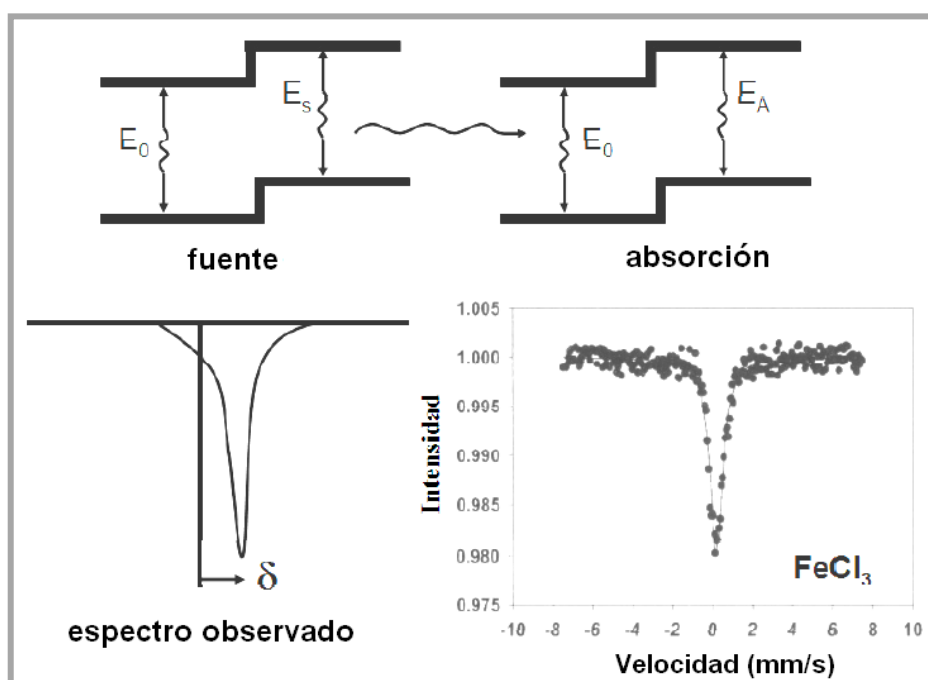


Figura 15. El cambio isomérico y el espectro sin valor de FeCl₃ [80].

La división cuadrupolar corresponde a la interacción entre el momento eléctrico del cuadrupolo nuclear y el gradiente del campo eléctrico en el sitio nuclear. Como ejemplo, la Figura 16 ilustra el efecto de interacción eléctrica cuadrupolar en el caso de un núcleo Mössbauer con giro $I=3/2$ en el estado excitado e $I=1/2$ en el estado base (como ⁵⁷Fe o ¹¹⁹Sn).

La perturbación eléctrica cuadrupolar no remueve la degeneración del estado básico del núcleo Mössbauer, pero produce conversiones de los sub-niveles del estado superior. En un experimento Mössbauer, son posibles las transiciones gamma entre el estado básico nuclear y ambos sub-niveles del estado superior. Usando una fuente de línea única, entonces se puede observar dos resonancias en el espectro Mössbauer. La distancia entre las líneas del par de la división del cuadrupolo corresponde exactamente a la división de la energía de la interacción cuadrupolar ΔE_Q . De acuerdo con los diferentes orígenes del gradiente de campo eléctrico (la contribución de red o la contribución de valencia electrónica), la división cuadrupolar refleja información sobre la estructura electrónica, propiedades de enlace, geometría molecular y permite distinguir entre sitios no equivalentes químicos o cristalográficos. El espectro en la Figura 16 corresponde a nanotubos de carbono mezclados con hierro y su par de división cuadrupolar.

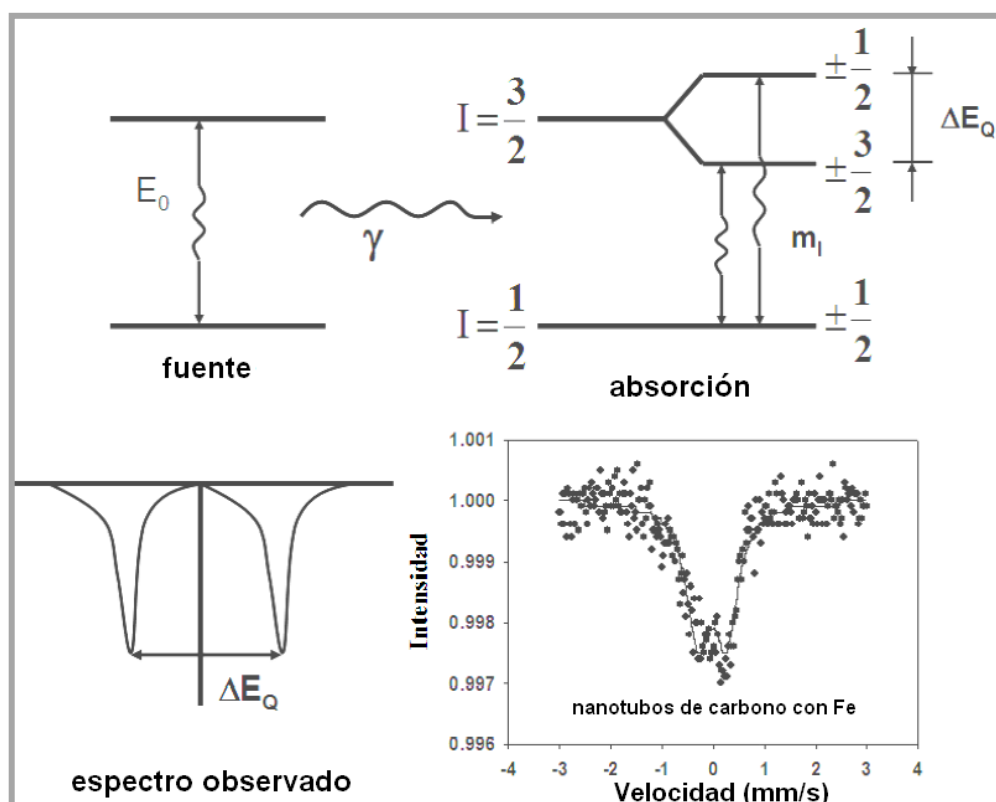


Figura 16. División cuadrupolar y uno de los pares del espectro de los nanotubos de carbono mezclado con hierro [80].

La interacción magnética hiperfina corresponde a la interacción entre el momento dipolo magnético del núcleo y el campo magnético hiperfino en el sitio nuclear. Se puede recordar a este campo hiperfino como el campo efectivo que actúa en el sitio del núcleo. La interacción magnética del dipolo divide un estado nuclear en $(2I+1)$ subniveles. La

división magnética se muestra en la Figura 17 para ^{57}Fe con $I=3/2$ en el estado excitado e $I=1/2$ en el estado base. Las transiciones gamma entre los sub niveles de la base y aquellos del estado excitado son temas de las reglas de la selección magnética del dipolo ($\Delta m=\pm 1,0$), dando seis transiciones permitidas en ^{57}Fe . Usando una fuente de línea sencilla, entonces se podría observar un sexteto de resonancia en el espectro Mössbauer, el centroide en el que se puede dividir de velocidad Doppler cero debido a la división isómera. El sexteto de la Figura 17 corresponde a la hematita. La división magnética hiperfina contiene información en presencia de diferentes fases, subredes magnéticas y sitios equivalentes en la muestra incorporando el núcleo Mössbauer, así como en la presencia en la fase de transición magnética cuando es estudiada la dependencia de la temperatura del campo magnético hiperfino.

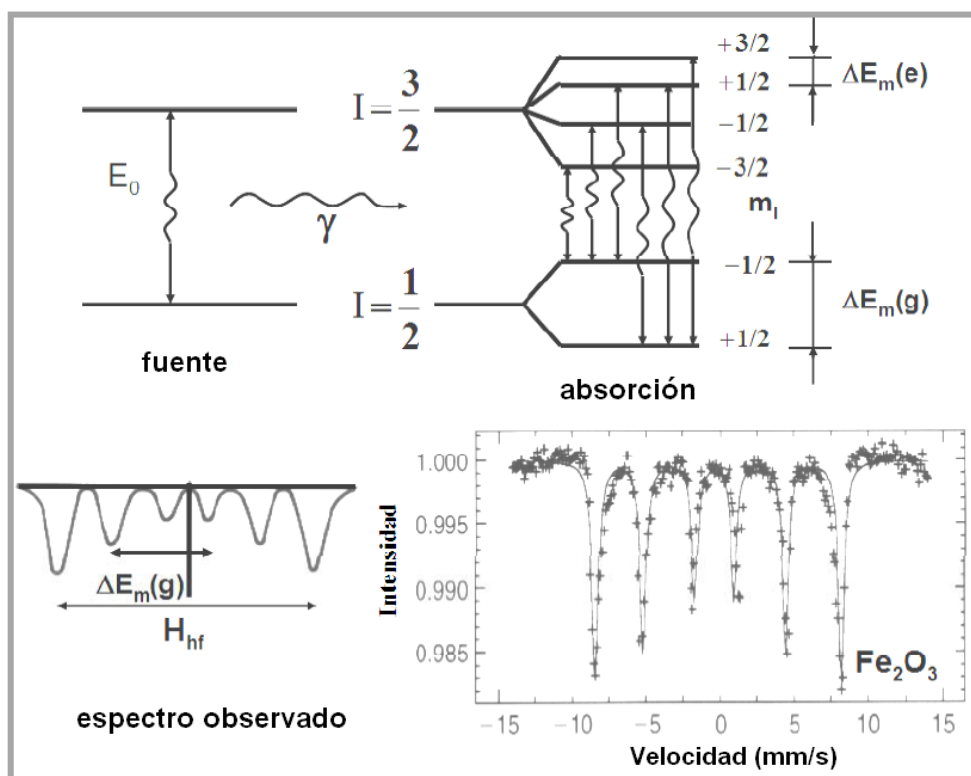


Figura 17. División magnética hiperfina y el espectro sexteto de hematita [80].

2.6 Difracción DE Rayos X (DRX) [81]

La interacción de las ondas con estructuras periódicas produce efectos de difracción si la longitud de onda y la periodicidad de los cristales, son de magnitud similar. Los rayos X se pueden producir con longitudes de onda que coinciden con las dimensiones de la celda

unidad de los cristales, pero los electrones o neutrones de energía apropiada también pueden ser utilizadas para los experimentos de difracción de los cristales.

Los átomos tienen diámetros del orden de Ångströms ($1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ m}$) y las celdas unitarias tienen dimensiones de varios Å. Esto implica que los cristales con tamaños de micras o más grandes consisten en miles de millones de celdas unitarias, que se repiten periódicamente en las tres dimensiones, es decir, poseen orden de largo alcance. Este tipo de orden, distingue a los materiales cristalinos de los amorfos, por ejemplo, el vidrio, que sólo tiene orden de corto alcance. Dado que la calidad de los efectos de difracción en difracción de rayos X depende en gran medida de la estricta periodicidad de átomos, cualquier tipo de desviación se mostrará en el diagrama de difracción de rayos X.

Las ondas electromagnéticas con longitudes de onda del orden de 10^{-10} m se llaman rayos X. El campo eléctrico de tales ondas interactúa con las cargas de todos los electrones de un átomo, que luego emiten una onda esférica casi con la misma longitud de onda que la radiación incidente. La amplitud de esta onda de salida es proporcional al número de electrones en el átomo, y, por lo tanto, al número atómico. Los elementos ligeros con pocos electrones, por ejemplo, carbono u oxígeno, son dispersores "pobres" para los rayos X, mientras que los elementos pesados como el plomo son dispersores "buenos". Los límites de detección son severamente influenciados por este efecto. Debido a la interferencia dentro de los átomos individuales, especialmente los más grandes, la amplitud de la onda de salida varía con el ángulo de dispersión 2θ .

Sin ningún tipo de efectos de difracción, la incidencia de un haz de rayos X primarios en un volumen de muestra produciría la dispersión en todas las direcciones. La difracción redistribuye la intensidad de toda la esfera de dispersión en direcciones distintas. Por lo tanto, se presentan picos de intensidad en ciertas direcciones, mientras que en las direcciones entre los picos la intensidad disminuye drásticamente. Una forma de describir en qué dirección se observan estos picos, llamados reflexiones es la noción de planos de dispersión de la red y la interferencia entre las ondas dispersas por planos de la red vecina.

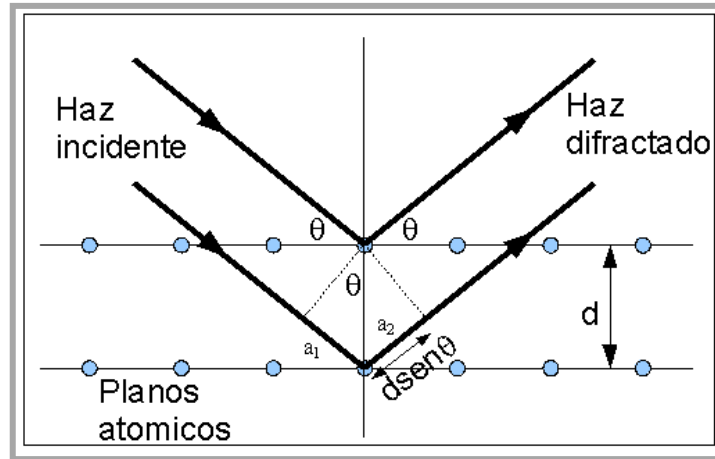


Figura 18. Derivación geométrica de la ley de Bragg: interferencia constructiva se produce cuando el retardo entre ondas dispersadas de planos de red adyacentes dados por $a_1 + a_2$ es un múltiplo entero de la longitud de onda λ [81].

La Figura 18 ilustra esta situación. La interferencia constructiva y por lo tanto lo que se denomina reflexión de Bragg, es cuando la trayectoria de la onda dispersa del más bajo de los dos planos es más largo por un número entero de longitudes de onda λ de la onda dispersada por el plano superior. Una reflexión puede ocurrir cuando:

$$n\lambda = 2d \operatorname{sen}\theta \quad (1.43)$$

Esta es la denominada ecuación de Bragg, donde λ es la longitud de onda de la radiación, n es un número entero, θ es el ángulo entre los planos de la red y el haz incidente y d es la distancia de los planos de la red para las que se produce el pico.

2.7 Dispersión dinámica de luz

La dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés de "Dynamic light Scattering"), espectroscopia de correlación de fotones PCS (Photon Correlation Spectroscopy) o dispersión QELS (Quasi Elastic Light scattering) es una técnica físicoquímica empleada para la determinación de la distribución de tamaños de partículas en suspensión. La luz láser al alcanzar las numerosas partículas que hay en una suspensión, se dispersa en todas las direcciones posibles. Si se separa una dirección, los haces de luz dispersados por distintas partículas interfieren entre sí y se obtiene una intensidad de luz dispersada determinada. [82]. En la Figura 19 se presenta un esquema del fundamento de dispersión de luz dinámica.

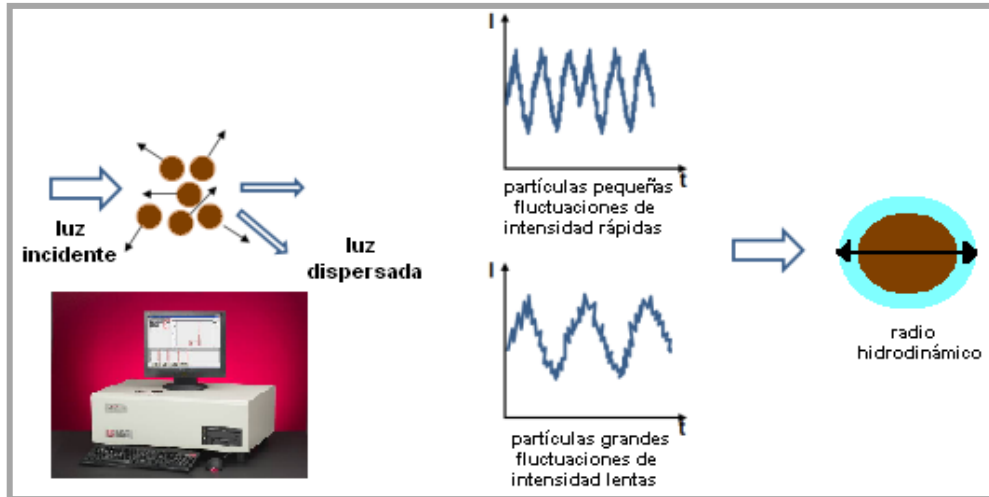


Figura 19. Esquema del fundamento de dispersión de luz dinámica.

El movimiento browniano de las partículas pequeñas en un líquido da lugar a fluctuaciones provocando cambios en la intensidad de la luz dispersada. La señal fluctuante se procesa mediante la formación de la función de autocorrelación, $C(t)$, siendo t el tiempo de retardo. Cuando t aumenta la correlación se pierde, y la función se acerca al término constante B . Para tiempos cortos la correlación es alta. Entre estos dos límites, la función decae exponencialmente para una suspensión monodispersa de partículas rígidas, globulares y está dada por:

$$C(t) = A e^{-2\Gamma t} + B \quad (1.44)$$

donde A es una constante óptica determinada por el diseño del instrumento, y Γ está relacionada con la relajación de las fluctuaciones dada por,

$$\Gamma = D q^2 \quad [\text{rad/sec}] \quad (1.45)$$

El valor de q se calcula a partir del ángulo de dispersión θ , la longitud de onda del láser λ_0 , y el índice de refracción n de la suspensión líquida. La ecuación que relaciona estas cantidades es:

$$q = \frac{2\pi n}{\lambda_0} 2\text{Sen} \left(\frac{\theta}{2} \right) \quad (1.46)$$

El coeficiente de difusión de traslación, D , es una cantidad medida por PCS. Es una propiedad inherentemente de partículas. El tamaño de las partículas está relacionado con D para las formas más comunes como una esfera, elipsoide, cilindro y espiral aleatoria. De estos, el supuesto esférico es más útil en el mayor número de casos. Para una esfera:

$$D = \frac{k_B T}{3\pi \eta(t)d} \quad [\text{cm}^2 / \text{sec}] \quad (1.47)$$

Donde k_B es la constante de Boltzmann (1.38054×10^{-16} ergs / deg), T es la temperatura en ° K, $\eta(t)$ (en centipoises) es la viscosidad del líquido en el que la partícula está en movimiento, y d es el diámetro de partícula. Esta ecuación supone que las partículas se mueven independientemente uno de otro.

Por tanto, se puede determinar el tamaño de partícula a partir de los cálculos previos de la función de medición Γ (ecuación 1.45), la constante de difusión D (ecuación 1.47) y los datos de T y η [82].

El tipo de diámetro obtenida con espectroscopia de correlación de fotones (PCS) es el diámetro hidrodinámico (el diámetro de partícula más el espesor de la doble capa). El diámetro efectivo medido es un diámetro promedio el cual se pondera por la intensidad de la luz dispersada por cada partícula. Esta ponderación de intensidad, no es la misma que la cantidad ponderada utilizando un solo contador de partículas, tales como en la microscopía electrónica. Sin embargo, los diámetros medios obtenidos son por lo general similares a los obtenidos por técnicas de partículas individuales [83].

2.8 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

El microscopio electrónico de barrido (SEM) es una técnica no destructiva que permite el análisis de la morfología de microestructuras a alta resolución a través de una imagen, así como determinar paralelamente, mediante microanálisis de Rayos X, los elementos químicos presentes en la muestra, cuantificarlos y plasmar en imagen la distribución de los mismos en la superficie de la muestra [84]. El SEM puede estar equipado con sistemas que permiten detectar las señales de: electrones retrodispersados (ER), electrones secundarios (ES) y rayos X (RX).

Los electrones secundarios (ES) se producen cuando un electrón del haz impacta con un electrón de la muestra expulsándolo de la capa. Son electrones poco energéticos (<50 eV) [85] y aportan información de la capa superior (10 nm). Las imágenes ES dan información de la topografía superficial.

La emisión de RX está vinculada a la vacante electrónica que deja el ES. Un electrón de otra capa ocupa la vacante produciéndose una pérdida de energía en forma de RX característico. [86].

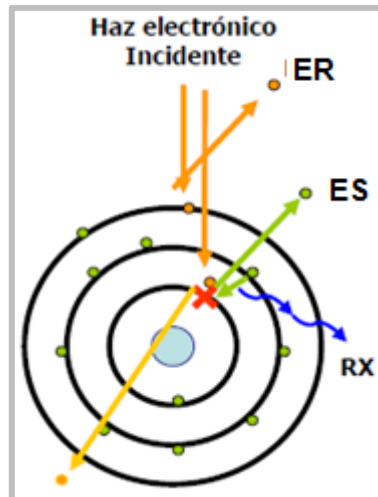


Figura 20. Modelo atómico de Bohr de un átomo de Na ($Z=11$) [81].

Para facilitar la emisión de electrones la muestra se metaliza recubriéndola con una pequeña capa de un metal conductor como el Au. El haz de electrones se puede concentrar en una zona diminuta ($\sim 20 \text{ \AA}$) que puede barrer la superficie de la muestra al ser deflectado por bobinas adecuadas. Los electrones secundarios se detectan por encima de la muestra y la imagen muestra la intensidad de los electrones secundarios emitidos por las diferentes partes de la muestra.

El esquema de un microscopio SEM se da en la Figura 21.

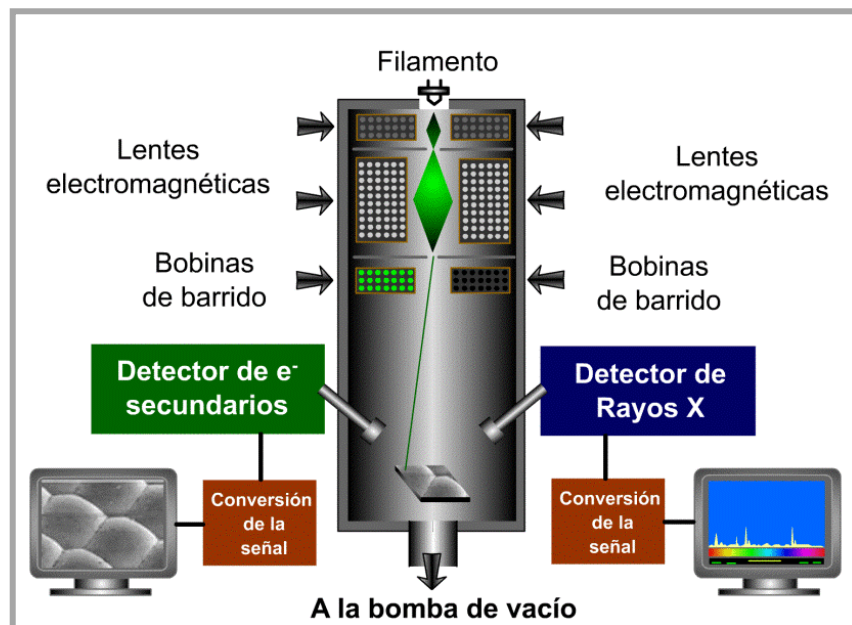


Figura 21. Esquema general de un SEM, indicando el detector de electrones secundarios y de Rayos X [87].

2.8.1 Microanálisis EDX (Energía dispersiva de Rayos X) en Microscopía electrónica de barrido (SEM)

En el microanálisis de RX se detectan y analizan los RX característicos que se producen al impactar el haz electrónico con la muestra, para así identificar la composición elemental de una muestra.

Cuando la muestra es bombardeada por el haz de electrones, los electrones son expulsados de los átomos que comprenden la superficie de la muestra. Las vacantes de electrones resultantes son ocupadas por electrones desde un estado superior, y se emite rayos x para equilibrar la diferencia de energía entre los estados de los dos electrones. La energía de rayos x es característica del elemento de la que se emite. Las transiciones energéticas se nombran usando la letra de la capa en el que ocurre la primera ionización, una letra griega que denota el grupo de líneas que pertenece a la transición, en orden decreciente de importancia, y una clasificación como subíndice numérico de la intensidad del pico dentro de ese grupo. Por lo tanto, el pico más intenso resultante de ionización en la capa K sería $K\alpha_1$. Dado que cada elemento tiene una carga nuclear diferente, las energías de las capas del núcleo y, aún más importante, el espacio entre ellos pueden variar de un elemento al otro. Aunque no todos los picos en el espectro de un elemento son exclusivos de ese elemento, hay suficientes picos característicos para poder determinar la composición de la muestra.

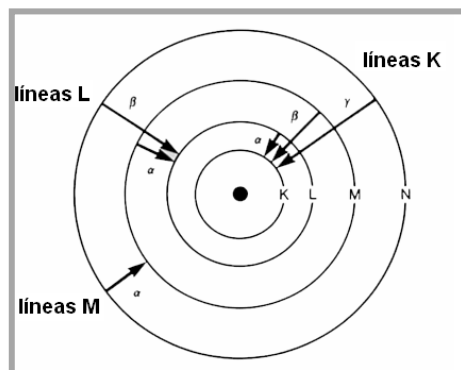


Figura 22. Diagrama de los niveles y transiciones de energía de un núcleo en un átomo [85].

Dos tipos de rayos X se producen en la interacción inelástica del haz de electrones con los átomos de la muestra en el SEM:

- Rayos X característicos resultado de cuando los electrones del haz expulsan electrones de la capa interna de los átomos de muestras.

- Rayos X continuos (bremsstrahlung: radiación de frenado) resultado de cuando los electrones del haz interactúan con el núcleo de los átomos de la muestra.

Los rayos X característicos se revelan como picos impuestos sobre un fondo de rayos X continuos como se muestra en la Figura 21.

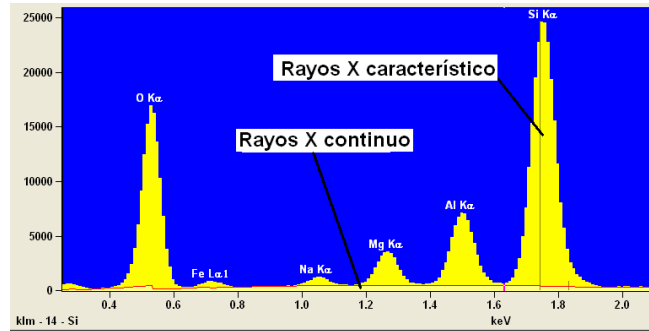


Figura 23. Espectro EDX [88].

Capítulo 3

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Generalidades

En soluciones acuosas, Massart et al [80], fueron los pioneros en la preparación de nanopartículas de magnetita por método de coprecipitación, a partir de sales de FeCl_2 y FeCl_3 ($\text{Fe}^{2+} / \text{Fe}^{3+} = 1/2$) precipitándolos en medio alcalino (NaOH , NH_3 , etc). Existen otras rutas químicas de preparación como la reducción hidrotermal del Fe^{3+} y la oxidación de sales de Fe^{2+} [3], microemulsión, descomposición térmica, síntesis hidrotermal, reducción química, entre otros [41,43].

Los métodos químicos más usados para la preparación de nanopartículas de plata son la reducción química, técnicas electroquímicas, y la reducción fotoquímica [33]. En la literatura se reportan una gama de métodos para la síntesis de NPs-Ag y el método más frecuentemente usado en dispersiones coloidales en agua o disolventes orgánicos es la reducción química. Los reductores comúnmente utilizados son borohidruro de sodio, citrato, D-glucosa, maltosa, aldehídos, aminas, ascorbato y polisacáridos [48].

3.2 Reactivos y equipos

Los reactivos usados en las síntesis de MNPs de magnetita Fe_3O_4 y del nanocompuesto $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$ se muestran en la tabla 3:

Tabla 3. Lista de reactivos usados en ambas síntesis.

| Reactivo | Marca | Grado de pureza |
|---|---------------|-----------------|
| FeCl ₂ .4H ₂ O | Merck | P.A. |
| NaOH | Merck | P.A. |
| NaNO ₃ | Merck | P.A. |
| Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ Citrato de sodio | Sigma Aldrich | P.A. |
| C ₁₉ H ₄₂ BrN Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) | Sigma Aldrich | P.A. |
| AgNO ₃ | Merck | P.A. |
| PVP polivinilpirrolidona | Sigma Aldrich | P.A. |
| glucosa | Merck | P.A. |

Entre los equipos usados son el pH-metro Accumet AB15 Plus, marca COLE PALMER, junto con un electrodo de vidrio OAKTON 4520. Para calibrarlos, se usaron soluciones buffer de pH 4.01, 7.01 y 10.04, marca FERMONT. Para ambas síntesis, la agitación fue constante y se realizó con un agitador magnético-calentador marca ARE. Para la síntesis de magnetita se usó un baño maría marca KeriLab CDK-S22. Para la síntesis del nanocompuesto se empleó un baño ultrasonido COLE-PARMER 8850.

En la preparación de las MNPs y del nanocompuesto se utilizó nitrógeno, para trabajar en atmósfera inerte.

En la caracterización de las MNPs y del nanocompuesto, así como en la prueba bacteriana, fue necesario obtener muestras en polvo y para eso se usó un campo magnético con la ayuda de un imán de neodimio y su posterior secado en una estufa marca FISHER SCIENTIFIC. Para analizar el coloide del nanocompuesto se centrifugó la muestra coloidal con una centrífuga marca EPPENDORF, modelo Centrifuge 5810 R.

Los reactivos usados en la prueba antibacteriana se muestran en la tabla 4:

Tabla 4. Lista de reactivos usados en la prueba antibacteriana.

| Reactivo | Marca |
|--|---------|
| CM 1135 Brain Heart Infusion | Oxoid |
| Plate count agar | Merck |
| Cloruro de sodio 9% | BiBraun |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048 | ATCC |
| <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 | ATCC |

Todos los materiales fueron esterilizados a 121°C por 15min en una autoclave marca Winters. Se usó un densitómetro Den-1 McFarland Densitometer, para medir la densidad óptica de la suspensión bacteriana en crecimiento (Figura 24). El llenado de las placas con agar se realizó en una cabina de flujo laminar clase II Purifier Class II Biosafety Cabinet LABCONCO (Figura 25).



Figura 24. Densitómetro, para medir la densidad óptica de la suspensión bacteriana.

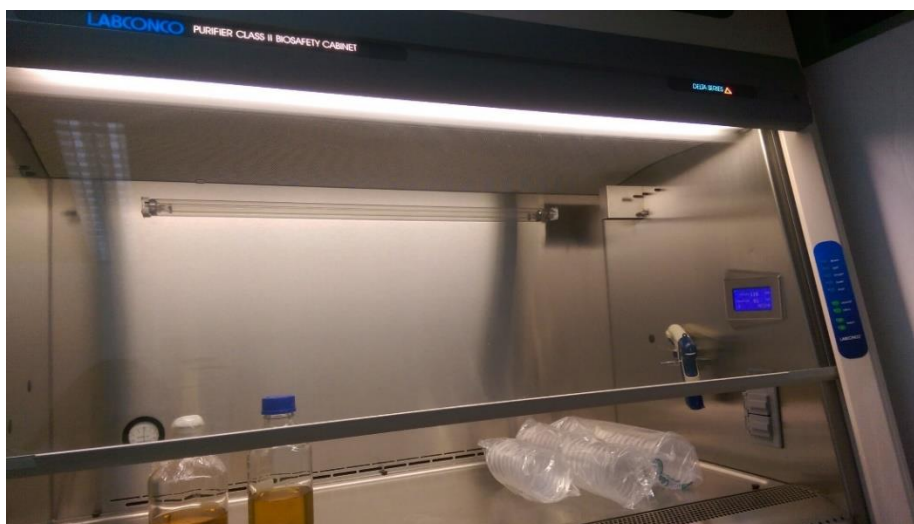


Figura 25. Cabina de flujo laminar clase II.

Las pruebas antibacterianas se realizaron en una cabina de flujo laminar clase I marca Nuair (Figura 26), previamente todos los materiales se dejaron en la cabina con irradiación de luz UV por 15 min. La incubación de las placas se realizó en una estufa marca Memmert que se mantuvo a 37°C (Figura 27).



Figura 26. Cabina de flujo laminar clase I.



Figura 27. Estufa a 37°C.

3.3 Procedimiento experimental

3.3.1 Síntesis de nanopartículas de magnetita Fe_3O_4

El procedimiento seguido para la síntesis de MNPs de magnetita Fe_3O_4 es mediante el método de control electrostático de soles, tomando como base a Vergés et al [3] y Hui et al [89], que trabajaron a partir de la oxidación de Fe^{2+} ; sin embargo, se varió sus condiciones iniciales, en los procesos de mezcla se adicionó como surfactante al Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) a una concentración de 0.1% w/V para la estabilización del sol. A su vez se controló la adición de la solución diluida de hierro (II) $5 \times 10^{-2}\text{M}$ y la

solución de NaOH 0.8M mediante un goteo lento y en paralelo se adicionaron a las soluciones de nitrato de sodio NaNO_3 0.2M, citrato de sodio $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 0.05M con agitación constante y controlando su temperatura con una chaqueta de calentamiento con un baño de agua a 80°C con recirculación de agua usando una bomba peristáltica. Luego de finalizar el goteo, el sistema de reacción se mantuvo en el baño de agua a la misma temperatura de 80°C por 1h. Durante todo el procedimiento, se burbujeo nitrógeno gaseoso. Es importante indicar que para preparar todas las soluciones, se usó agua ultrapura previamente hervida para eliminar el CO_2 y O_2 disueltos. Para la caracterización de la muestra en polvo, la magnetita se sometió a un campo magnético con la ayuda de un imán de neodimio, con lavados sucesivos por 5 veces y un proceso de secado en estufa a 70°C por 8h. En la Figura 28 se muestra el diagrama experimental para la síntesis de MNPs de magnetita Fe_3O_4 .

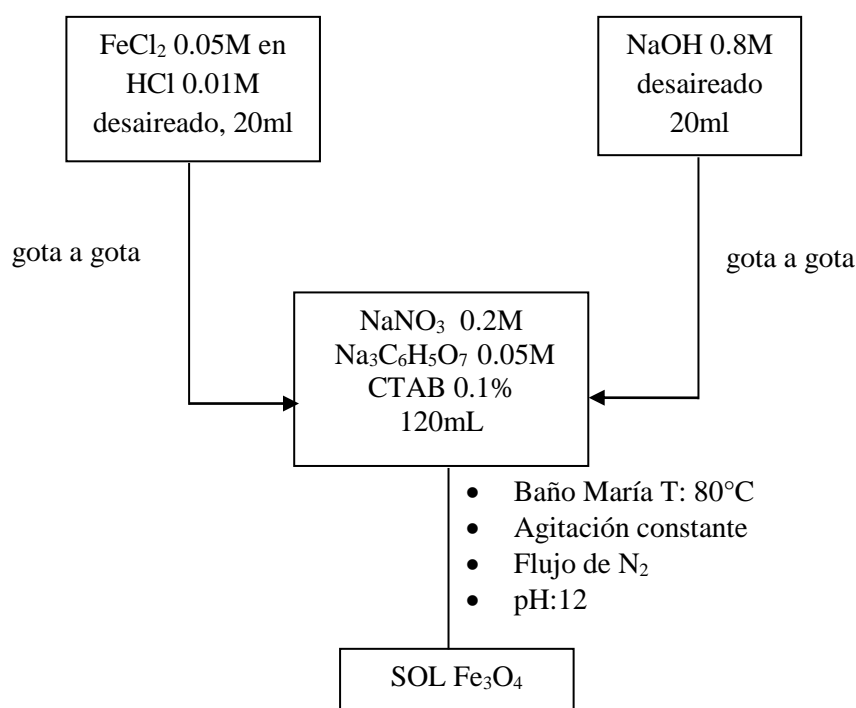


Figura 28. Diagrama de proceso para la síntesis de MNPs de Fe_3O_4 por el método de control electrostático de soles.

En la Figura 29 se muestra un esquema de cómo se llevó a cabo la síntesis de las MNPs de magnetita.

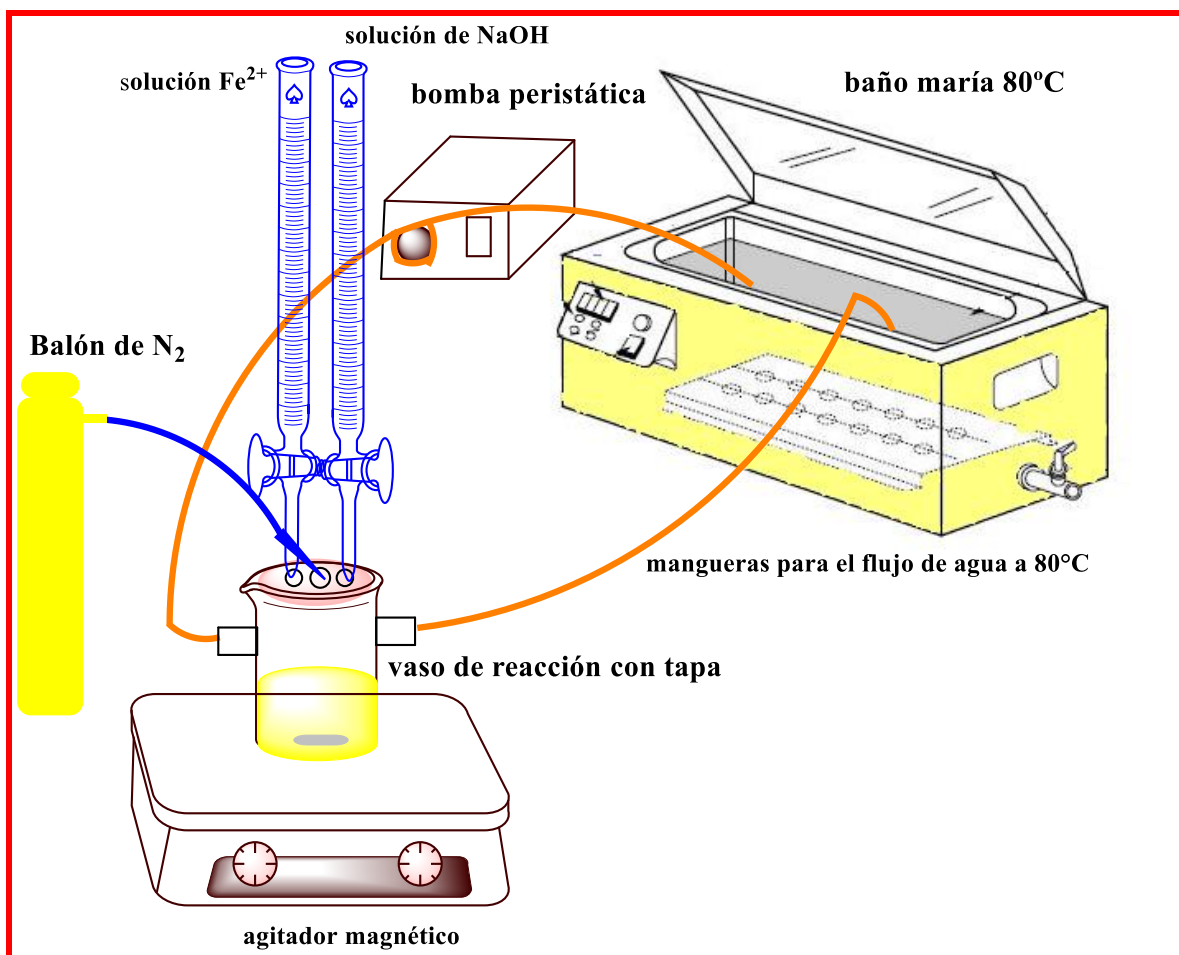


Figura 29. Representación esquemática del montaje experimental para la síntesis de MNPs de magnetita.

En la Figura 30 se muestra las variaciones de color a medida que se va goteando las soluciones de Fe^{2+} y la base NaOH, observándose la aparición del *green rust*, que es el hidróxido de Fe^{2+} (Figura 30 d) que se forma previo a la magnetita (color negro).

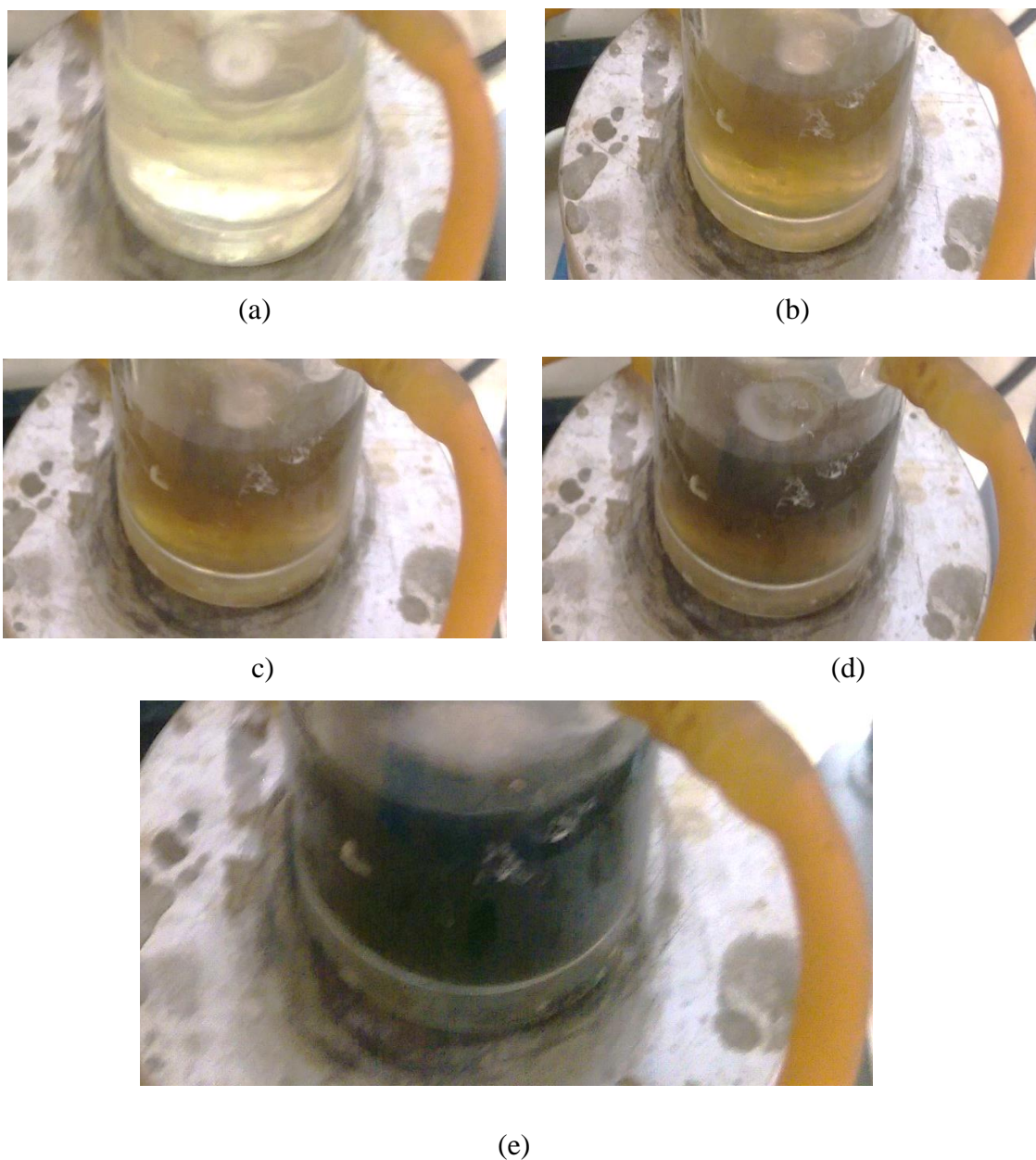


Figura 30. Variaciones en la coloración en la síntesis de MNPs de Fe_3O_4 por el método de control estérico de soles (a) antes de agregar la solución de Fe^{2+} , (b) después de gotear 5 ml de solución de Fe^{2+} , (c) después de gotear 10 ml de solución de Fe^{2+} , (d) formación del *green rust* a los 13 ml de solución de Fe^{2+} y (e) formación de la magnetita.

En la Figura 31, se observa la dispersión de la magnetita, después del goteo de las soluciones y cuando se mantuvo la agitación por 1h con burbujeo de N₂.



Figura 31. Dispersión de magnetita en el proceso de envejecimiento con burbujeo de N₂.

La suspensión final resultó de color negro (Figura 32), la cual se utilizó para la preparación del nanocompuesto Fe₃O₄/Ag. Para la caracterización se procedió a separar las partículas usando un imán de neodimio, con los respectivos lavados sucesivos y su posterior secado a 80°C en una estufa por 4h.



Figura 32. Sol de nanopartículas de magnetita Fe₃O₄.

3.3.2 Síntesis de nanocompuesto de Fe₃O₄/Ag

Luego de sintetizar el sol de magnetita, se procedió con la síntesis del nanocompuesto. La síntesis *in situ* de las nanopartículas de plata sobre la dispersión coloidal de magnetita se realizó por reducción de los iones Ag⁺ usando glucosa como agente reductor, tomando como base el método de síntesis de solo NPs-Ag realizado por Wang et al [90]. Se emplearon concentraciones propias de la solución de plata y PVP, a un pH de 11.5 para reducir los iones Ag⁺.

La solución de PVP se preparó por una disolución de PVP y glucosa en 35 ml de agua ultrapura y se calentó en un baño de agua a 60 °C con agitación. Se añadió 15ml de la dispersión coloidal de magnetita y se agitó con la solución de PVP. Luego se añadió gota a gota la solución de AgNO₃ 5x10⁻³M y se mantuvo en agitación a 60°C por 30 min. Las partículas se separaron con el uso del imán de neodimio, y se lavaron con agua destilada varias veces hasta que los NO₃⁻ sean eliminados. Luego la muestra sólida se secó en una estufa a 70°C por 8h. En la Figura 33 se muestra el diagrama experimental para la síntesis del nanocompuesto de Fe₃O₄/Ag.

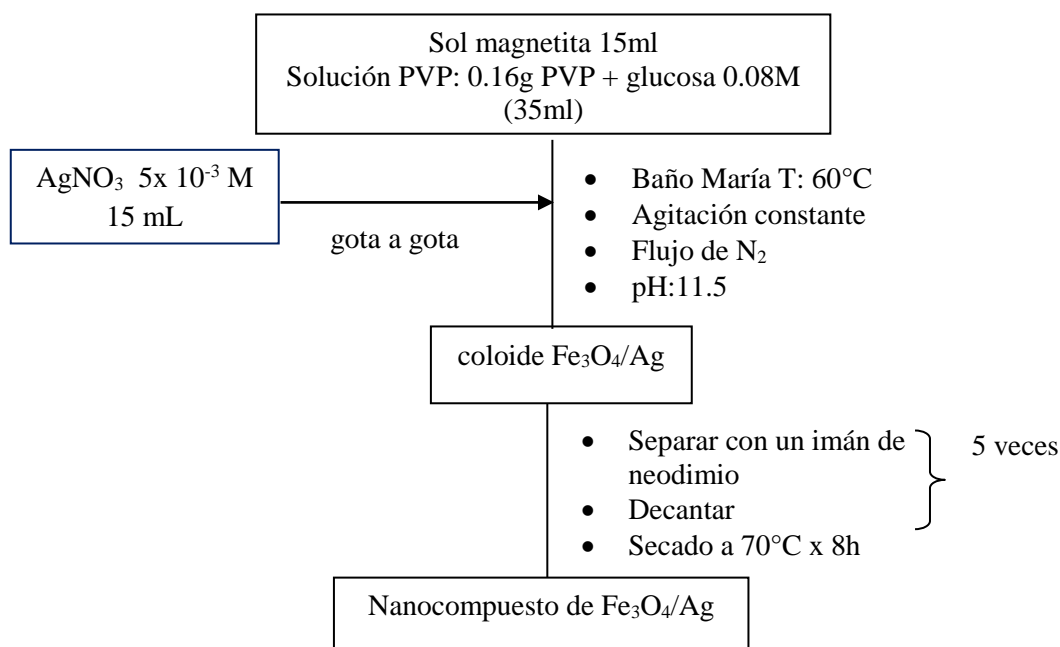


Figura 33. Diagrama de proceso para la síntesis del nanocompuesto de Fe₃O₄/Ag.

En la Figura 34 se muestra el montaje experimental de la síntesis del nanocompuesto Fe₃O₄/Ag.

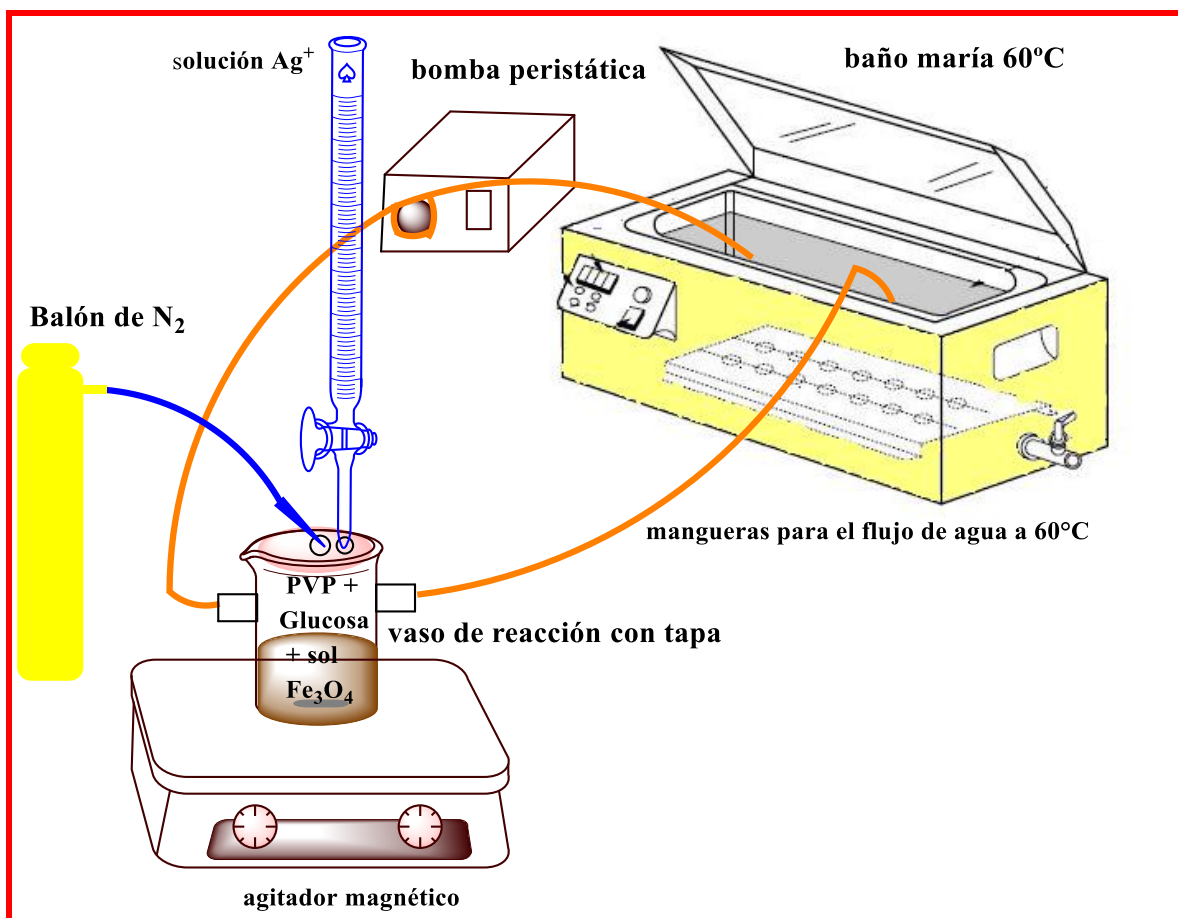


Figura 34. Representación esquemática del montaje experimental para la síntesis del nanocompuesto de Fe₃O₄/Ag.

En la Figura 35, se observa la dispersión final del nanocompuesto, con la medida del pH final que resultó 11.26. El nanocompuesto obtenido se muestra en la Figura 36, con una coloración ligeramente más clara que la magnetita de color negro.



Figura 35. Dispersión final del nanocompuesto de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$, con un pH final de 11.26.



Figura 36. Nanocompuesto en dispersión de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$.

Cuando el nanocompuesto se diluye con agua destilada, mostraron un marcado efecto Tyndall (Figura 37).



Figura 37. Dispersión coloidal diluida del nanocompuesto de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$.

Para obtener la muestra sólida del nanocompuesto, este se sometió a un campo magnético con la ayuda de un imán de neodimio (Figura 38) y con procesos de lavado continuo. El sólido obtenido fue secado en la estufa a $70\text{ }^\circ\text{C}$ por 8h.



Figura 38. Proceso de separación del nanocompuesto en dispersión con un imán de neodimio para obtener la muestra sólida.

3.3.3 Prueba antibacteriana del nanocompuesto de Fe₃O₄/Ag.

Las pruebas antibacterianas se llevaron a cabo tomando como referencia a Theamdee et al. [5], utilizando la norma ASTM modificada (un método de prueba estándar para E2149-01 para la determinación de la actividad antimicrobiana de agentes antimicrobianos inmovilizados bajo condiciones de contacto dinámico). Las colonias de *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048) y *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) se sembraron en una placa de Petri para luego inocularlas en un tubo con 5 ml de caldo Brain heart Infusion (BHI). Los cultivos se incubaron a 37 °C durante aproximadamente 3h hasta alcanzar la densidad óptica (D.O) de 0.5 en la escala de MacFarland.

Para el control 1, se agregó 100 µl al primer tubo con 9.9 ml de solución salina (cloruro de sodio al 9%, y se realizó las diluciones seriadas respectivas según la Figura 39a. Se colocó 100 µl de las diluciones 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ y también 10 µl de la dilución 10⁻⁵ a las placas con agar (por duplicado). Luego, los agregados se diseminaron sobre la superficie de las placas con la ayuda de una espátula de Drigalsky (Figura 40). Las placas se incubaron por 24h en una estufa a 37°C. Para el control 1 con *Enterococcus faecalis* se realizó las diluciones y la diseminación en las placas con agar plate count según la Figura 39b y luego de 48 h se procedió a realizar el conteo de las colonias en las placas.

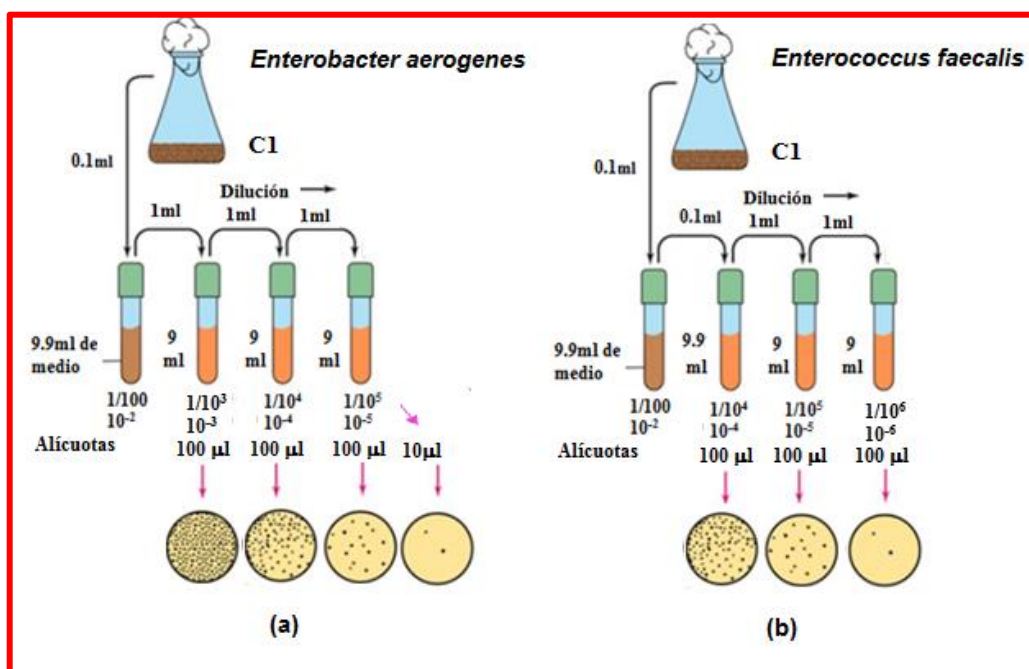


Figura 39. Diluciones para el control 1 con suspensión bacteriana (D.O:0.5 de la Escala de Mac Farland), sin tratamiento y sin el nanocompuesto, (a) para *Enterobacter aerogenes* y (b) para *Enterococcus faecalis*.



Figura 40. Siembra por diseminación de la dilución bacteriana sobre la superficie de la placa con agar.

En el control 2, la suspensión bacteriana se agitó a 37°C por 1h. Luego se agregó 100 µl al primer tubo con 9.9 ml de solución salina (cloruro de sodio al 9%) y se realizó las diluciones seriadas respectivas conforme la Figura 41. Se colocó 100 µl de las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} y también 10 µl de la dilución 10^{-6} a las placas con agar (por duplicado). Luego, los agregados se diseminaron en toda la superficie de las placas con la ayuda de una espátula de Drigalsky. Las placas se incubaron por 24h en una estufa a 37°C. Para el control 2 con *Enterococcus faecalis* se realizó las diluciones igual que para *Enterobacter aerogenes*, sólo que se trabajó con las diluciones 10^{-5} y 10^{-6} en las placas. Luego de 48 h se procedió a realizar el recuento de las colonias crecidas en las placas con agar.

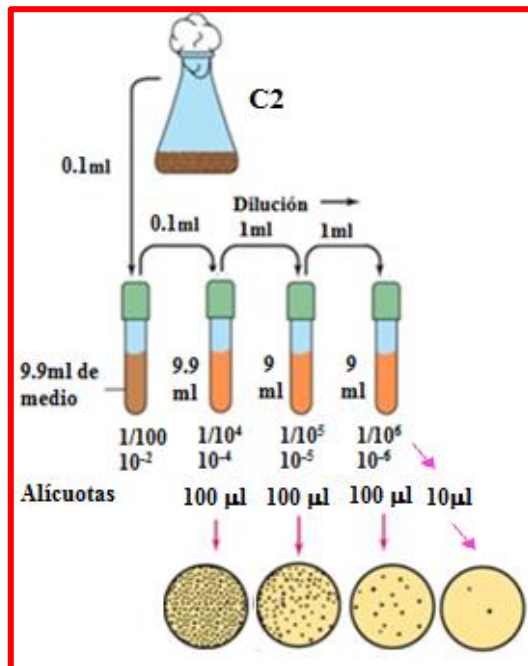


Figura 41. Diluciones para el control 2 con suspensión bacteriana (D.O:0.5 Escala de MacFarland), con tratamiento y sin el nanocompuesto, para las bacterias *Enterobacter aerogenes* y *Enterococcus faecalis*

Se pesó por duplicado 5 mg del nanocompuesto de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$ en tubos Eppendorf. Luego de su esterilización, se agregó 1 ml de la suspensión bacteriana respectiva y se mantuvo en agitación durante 50 min a 37°C . Después se decantó el sobrenadante con un imán de neodimio y se colocó (1000 μl) en placas con agar sin efectuar diluciones según la Figura 42. Luego se sembraron por diseminación las placas con la espátula de Drigalsky y se incubaron por 24 h en una estufa a 37°C para las bacterias *Enterobacter aerogenes* y 48 h para las bacterias *Enterococcus faecalis*. Finalmente, se observó si hubo formación de colonias en las placas con agar.

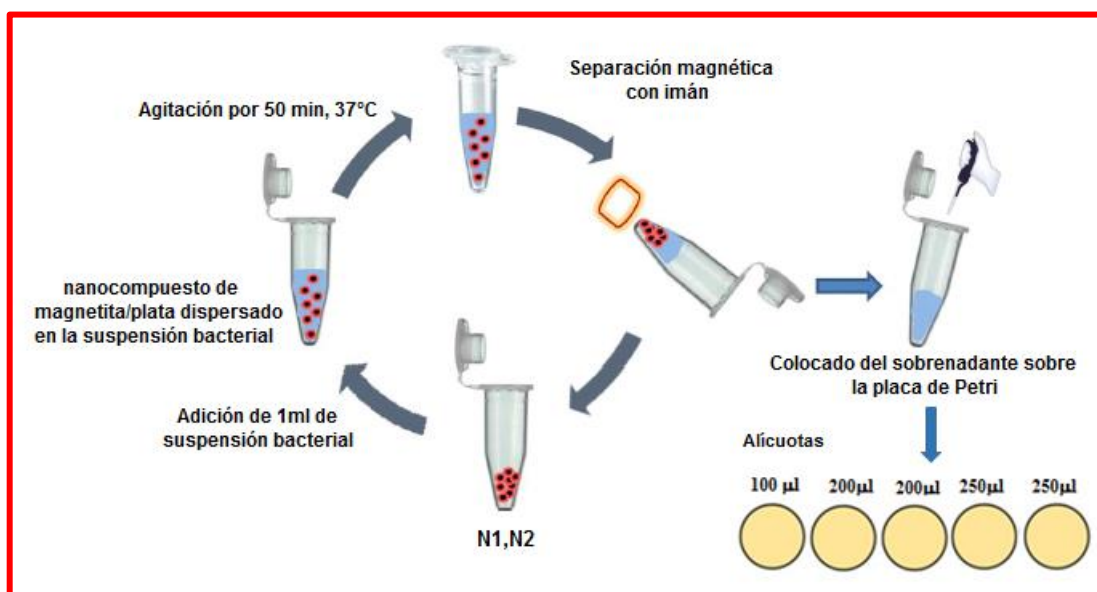


Figura 42. Tratamiento del nanocompuesto $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$ con la suspensión bacteriana (D.O:0.5 Escala de MacFarland), con agitación por 50 min a 37°C , para las bacterias *Enterobacter aerogenes* y *Enterococcus faecalis*.

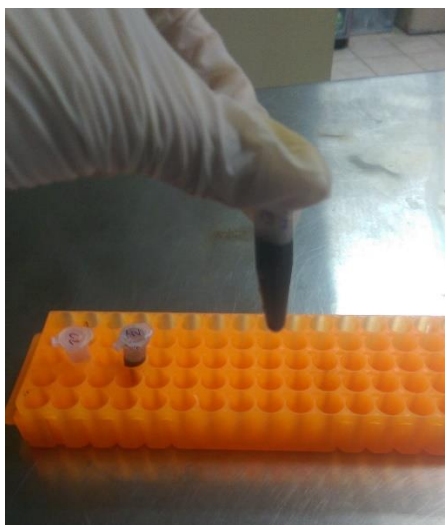


Figura 43. Dispersión de la suspensión bacteriana con el nanocompuesto de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$.



Figura 44. Separación del sobrenadante con un imán de neodimio.

La eficiencia antibacteriana del nanocompuesto de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$ puede medirse con la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia antibacteriana} = \frac{F_{\text{control}} \times N_{\text{control}} - F_{\text{muestra}} \times N_{\text{muestra}}}{F_{\text{control}} \times N_{\text{control}}} \quad (1.48)$$

donde N_{control} , N_{muestra} son el número de las colonias en las placas con agar del control y la muestra, respectivamente, y F_{control} , F_{muestra} son el factor de dilución del control y de la muestra, respectivamente.

Capítulo 4

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Magnetita (Fe_3O_4)

Para la formación de la magnetita según el proceso sol-gel se requiere primero formar el precursor, luego se llevará a cabo la hidrólisis de los precursores y condensación de las especies hidrolizadas. Después de la formación de los núcleos y su crecimiento, se obtendrá la fase sólida de magnetita.

4.1.1 Aplicación del Modelo de carga parcial (MCP) a la hidrólisis de Fe

Aplicando el Modelo de carga parcial explicado en el capítulo 1, se podrá predecir el precursor (complejo metálico) y encontrar el grado de hidrólisis según el pH y el mecanismo de condensación y después de la nucleación y crecimiento obtener el óxido de hierro en la fase magnetita. En este caso la carga formal del Fe^{2+} es $z=2$, su número de coordinación es $N=6$ y la electronegatividad del Fe según Alfred-Rochow es 1.72. Por tanto primero se comprueba si el Fe^{2+} tiene comportamiento de ácido o base fuerte y luego se determina su grado de hidrólisis.

i) Comportamiento ácido-base solución acuosa

- Para la Fe^{2+} ($z=2$), se obtiene:

| $\chi_{B,2}(\text{Fe}^{2+})$ | χ^*_{Fe} | $\chi_{A,2}(\text{Fe}^{2+})$ |
|------------------------------|----------------------|------------------------------|
| 0.92 | 1.72 | 3.51 |

$\chi_{B,1} < \chi^*_{\text{Fe}} < \chi_{A,1}$ por lo tanto Fe^{2+} no actúa como ácido ni base fuerte. De este modo, es factible que ocurran las reacciones de hidrólisis y condensación.

ii) Grado de hidrólisis del Fe

- Para la Fe^{2+} , reemplazando los valores de N (6) y χ^*_{Fe} (1.72) en la ecuación 1.32, se tiene:

$$h = \left(\frac{1}{1+0.014pH} \right) (0.617 + 0.243pH) \quad (1.49)$$

Esta ecuación nos permite determinar la zona de predominio de las especies hidrolizadas en función del pH. Resolviendo esta ecuación se obtiene los complejos de Fe^{2+} según el pH:

Tabla 5. Grado de hidrólisis del Fe^{2+} según el pH teórico.

| pH | h | Especie hidrolizada |
|-----|---|------------------------|
| 1.7 | 1 | $[Fe(OH)(OH_2)_5]^+$ |
| 6.4 | 2 | $[Fe(OH)_2(OH_2)_4]$ |
| 12 | 3 | $[Fe(OH)_3(OH_2)_3]^-$ |

Se observa que sólo a pH mayores a 1.7 se forma un acuoxocomplejo que será capaz de condensar. Por encima de pH 6.4, predomina la especie $[M(H_2O)_4(OH)_2]$, sin embargo no tiene carga eléctrica y precipitaría de la solución. Se trabajó con un pH 12 para obtener una especie hidrolizada con 3 OH^- que puedan participar en la condensación.

iii) Condensación y polimerización

Para la Fe^{2+} , se obtiene:

| $\chi_{B,2}(Fe^{2+})$ | $\chi_{A,2}(Fe^{2+})$ | χ^*_{Fe} | $\chi_{OL,2}(Fe^{2+})$ |
|-----------------------|-----------------------|---------------|------------------------|
| 0.92 | 3.51 | 1.72 | 1.77 |

Si $\chi_{B,z} < \chi^*_{Fe} < \chi_{OL,z}$, la condensación es por olación y si $\chi_{OL,z} < \chi^*_{Fe} < \chi_{A,z}$, la condensación es por oxolación.

Por lo tanto, se tiene:

$$\chi_{B,z} < \chi^*_{Fe} < \chi_{OL,z}$$

$$0.92 < 1.72 < 1.77$$

Así, el Fe^{2+} condensa por olación. Por tanto, si sólo están presentes puentes ‘ol’ en la estructura de los complejos intermediarios, se requerirá temperatura para

transformar la fase hidróxido a la fase óxido por deshidratación de la fase sólida. El mecanismo de la condensación por olación para el Fe^{2+} es el siguiente:

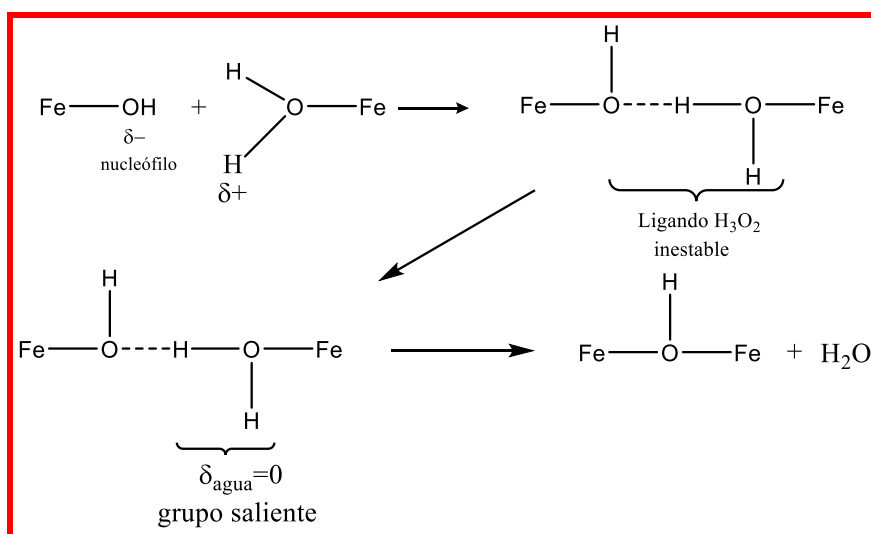


Figura 45. Mecanismo de condensación por olación para el Fe^{2+} .

4.1.2 Nucleación y crecimiento

El cambio de energía libre ΔG_v para formar la partícula esférica, depende de r . Cuando se supera el radio crítico r_c la contribución interna de la energía libre empieza a ser dominante y el sistema pasa a ser termodinámicamente favorable. El valor de r_c se expresó

en la ecuación 1.40: $r_c = \frac{-2\gamma}{\Delta G_v}$ y la energía libre asociada a este punto crítico

corresponde al máximo de ΔG_r , denominado ΔG_c según la ecuación 1.41 del capítulo 1:

$$\Delta G_c = \frac{4}{3} \pi r_c^2 \gamma = \frac{16\pi\gamma^3}{3(\Delta G_v)^2} \quad (1.50)$$

De este modo, para obtener un radio crítico menor, se tiene que disminuir la tensión superficial y así la ΔG_c sería menor ya que la tensión superficial γ , tiene una dependencia directa y cúbica con ΔG_c . Esto se logra agregando surfactantes con afinidad por el catión metálico que disminuyan la tensión superficial en el medio.

En este caso, se trabajó con el bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), que es una sal de amonio cuaternario, un surfactante catiónico con una cadena de 15 carbonos no muy grande, ya que así se evita que se enrolle sobre sí mismo y tampoco muy corta, evitando las interacciones de Van der Waals (Figura 46).

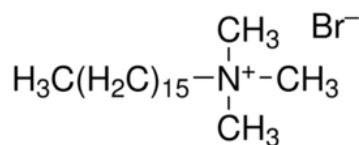


Figura 46. Estructura del surfactante bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB).

El amonio cuaternario interactúa electrostáticamente con la carga negativa del catión metálico del Fe, inhibiendo el crecimiento rápido de los núcleos formados, impidiendo el crecimiento en las zonas de coordinación superficiales. Esto también se puede interpretar, debido a que el CTAB lo que genera que el espesor de la doble capa aumente. El catión metálico tiene carga negativa debido al medio básico de la solución. Los iones de Fe^{2+} son estabilizados por la presencia de citrato de sodio (Figura 47) que acompleja superficialmente con sus grupos carboxilato al catión metálico y evita una rápida oxidación de estos iones.

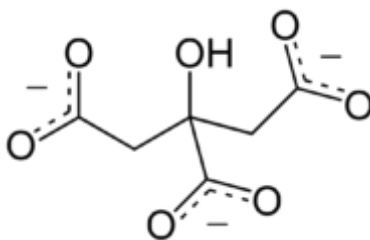


Figura 47. Estructura del citrato de sodio.

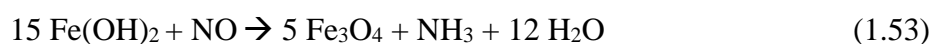
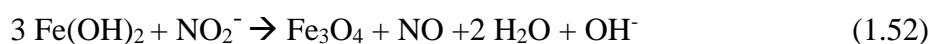
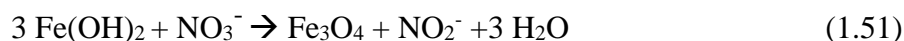
Otra de las razones para la elección del surfactante CTAB fue porque con un polímero como el PVA (polivinil alcohol), se obtenían aglomerados de partícula a simple vista en la preparación de la magnetita sintetizada a 80°C . El PVA es recomendable para síntesis a temperatura ambiente, ya que a esta temperatura sus cadenas poliméricas se mantienen estiradas y no tienden a enrollarse sobre sí mismas como a temperaturas más altas donde aumenta el movimiento de las colas.

En ausencia de cualquier recubrimiento superficial, las partículas magnéticas tienen superficies hidrófobas y tienden a aglomerar y forman *clusters*, dando como resultado un mayor tamaño de partícula. Estos *clusters*, muestran fuertes atracciones dipolo-dipolo magnético entre ellos y muestran comportamiento ferromagnético. Por lo tanto, es importante adicionar surfactantes para mejorar la dispersión y tamaño de las partículas magnéticas.

4.1.3 Transformación en fase sólida

En la síntesis se observa la formación del *green rust*, el hidróxido de Fe^{2+} ($\text{Fe}(\text{OH})_2$) como paso previo a la formación de la magnetita. Se debe evitar la oxidación total del Fe^{2+} , ya que la magnetita está formada por cationes de Fe^{2+} y Fe^{3+} . Por esta razón se trabaja en atmósfera inerte y realizando una oxidación controlada usando el ión nitrito como agente oxidante. La síntesis se realizó a pH 12, para que ocurra la hidrólisis del precursor y también para que se forme el *green rust*, la oxidación se realizó a temperatura de 80°C.

Sugimoto y Matijević [91] presentaron una serie de reacciones para la oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} en el proceso de formación de magnetita, a partir de la oxidación del $\text{Fe}(\text{OH})_2$, el *green rust*:



En la síntesis no se observa la presencia de gases nitrosos pardos del NO, posiblemente debido a que estos son convertidos en amoníaco NH_3 durante la reacción.

Se trabajó también con temperatura de 80°C, después de agregar la cantidad necesaria de la sal de Fe^{2+} y el NaOH para llevar a cabo el envejecimiento de la fase sólida y obtener una fase sólida con mejores propiedades estructurales y magnéticas.

4.1.4 Doble capa eléctrica

Las partículas de magnetita tienen un punto isoeléctrico alrededor de 7. En este punto debido a las pequeñas fuerzas de repulsión electrostáticas ocurre la agregación de las partículas, lo que significa que las partículas sólo son estables a valores bajos o altos de pH [92].

Con un exceso de OH^- , el pH fue 12 que es mayor al punto isoeléctrico y se mantuvo constante durante la reacción. Al aumentar el pH por encima del punto isoeléctrico, las partículas se cargan y evita su agregación.

La presencia de CTAB aumenta la doble capa eléctrica, al evitar las interacciones entre partículas, de esta forma se disminuye el radio crítico en la nucleación y se controla el

crecimiento de las partículas, obteniendo partículas más dispersas y pequeñas. En la Figura 48 se esquematiza la estabilización electrostática entre el CTAB por la presencia del N cargado positivamente en el amonio cuaternario y la superficie cargada negativamente de la partícula de magnetita.

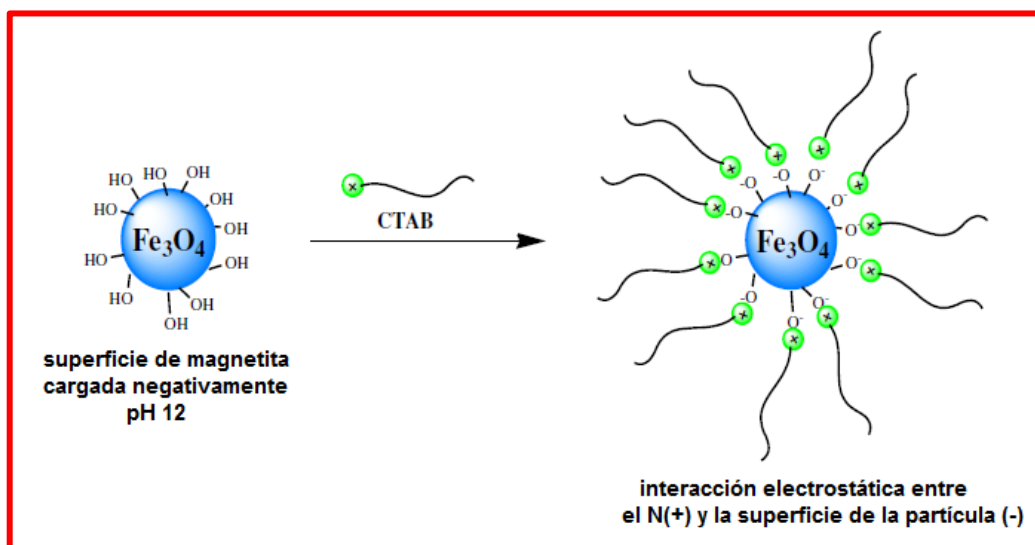


Figura 48. Mecanismo de atracción del surfactante CTAB sobre la superficie de las partículas de magnetita.

4.2 Caracterización de materiales

4.2.1 Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

La muestra sólida se preparó mezclándola con bromuro de potasio grado espectroscópico en un mortero con su pistilo de ágata. Posteriormente se coloca la mezcla en el portamuestra, en forma de disco, del equipo y finalmente se obtienen bandas de absorción que corresponden exclusivamente a la muestra, excepto la presencia a veces inevitable de bandas debidas al agua residual.

Esta técnica se establece sobre la base de la propiedad que posee el bromuro de potasio y otros haluros alcalinos de formar discos transparentes o translúcidos, cuando el material en polvo y secado previamente, es sometido a una presión manual. Los análisis se realizaron en un equipo IR Prestige-21 marca SHIMADZU.

4.2.1.1 Espectro IR de las MNPs de Fe₃O₄

La Figura 49 muestra el espectro IR de Fe₃O₄ con señales distintivas de la tensión del enlace Fe-O a bajos números de onda de 459cm⁻¹ y 578cm⁻¹. La banda a 578cm⁻¹ se refiere

a la vibración por tensión del Fe-O en los sitios tetraédricos ($\text{Fe}^{3+}\text{-O}^{2-}$) y la banda a 459 cm^{-1} se refiere a la tensión del Fe-O en los sitios octaédricos ($\text{Fe}^{2+}\text{-O}^{2-}$).

Se observa la banda a 960 cm^{-1} debido a la vibración por tensión del enlace C-N. Se evidencia la banda característica de la vibración de flexión simétrica del enlace N- CH_3 del CTAB en 1383 cm^{-1} . Las vibraciones de los enlaces CH_3^+ en el plano simétrico de enlace con CH_2 aparece en 1500 cm^{-1} . La banda de vibración por tensión $\nu(\text{O-H})$ es influenciada por el CTAB y se evidencia la formación de enlaces H con especies N---O. Las bandas de absorción observadas se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6. Bandas de absorción observadas en el espectro IR de las MNPs de Fe_3O_4 .

| Bandas de absorción (cm^{-1}) | Asignación | Referencias |
|--|----------------------------------|-------------|
| 459 | ν Fe-O (oh) | [27], [93] |
| 578 | ν Fe-O (th) | [27], [93] |
| 960 | ν C-N | [94] |
| 1383 | δ simétrica CH_3 | [94] |
| 1500 | ν CH_3^+ | [95] |
| 3730 | ν OH^- | [95] |

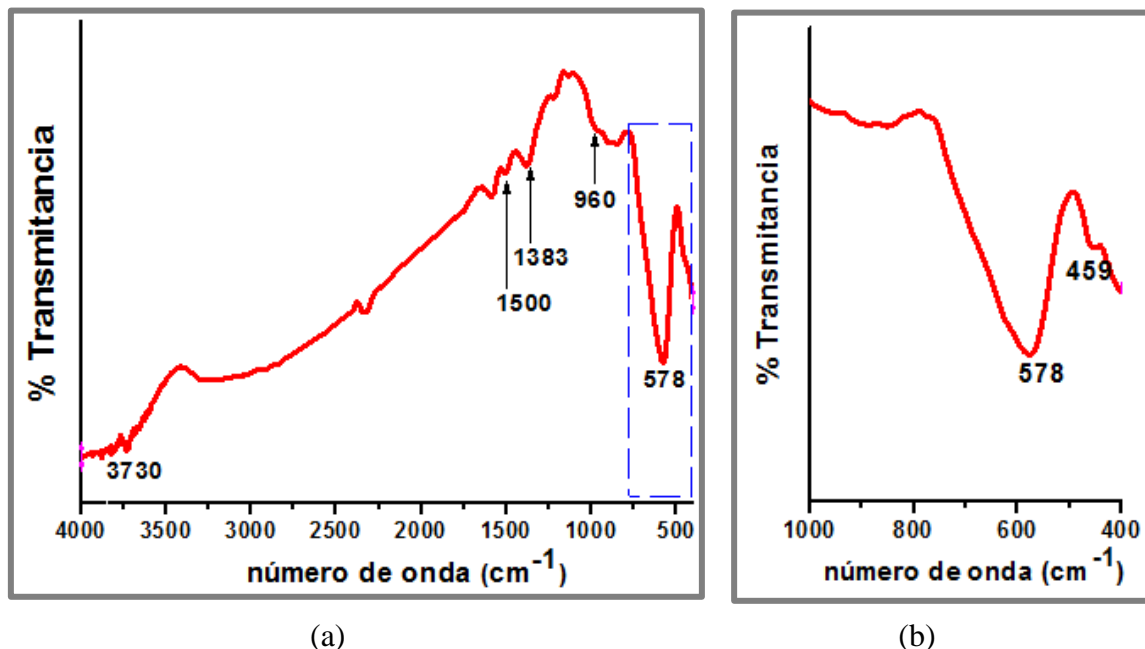


Figura 49. (a) Espectro IR de MNPs de Fe_3O_4 , (b) espectro de las MNPs de Fe_3O_4 en el rango de $400\text{-}100\text{cm}^{-1}$.

A partir del espectro se evidencia la formación de la magnetita ($\text{Fe}^{2+}_{\text{oh}}\text{Fe}^{3+}_{\text{oh}}\text{Fe}^{3+}_{\text{th}}\text{O}_4$) con la presencia de los enlaces Fe-O en sitios tetraédricos y octaédricos, a su vez como la interacción del surfactante CTAB con las partículas del Fe de la magnetita.

4.2.1.2 Espectro IR del nanocompuesto de Fe₃O₄/Ag

La Figura 50 muestra el espectro IR del nanocompuesto de Fe₃O₄/Ag con dos señales distintivas de los enlaces Fe-O a 459 y 578 cm⁻¹. La banda pequeña a 459cm⁻¹ se refiere a la vibración por tensión del Fe-O en los sitios octaédricos (Fe²⁺-O²⁻), mientras que la banda a 578 cm⁻¹ se refiere solo a la vibración por tensión de los sitios tetraédricos (Fe³⁺-O²⁻). Esto indica que la estructura de la magnetita no ha sido modificada, evidenciando solo el recubrimiento de la plata a la magnetita.

La banda a 849 cm⁻¹ corresponde a la amida del PVP y las bandas a 970 y 1217 cm⁻¹ representan las vibraciones por tensión del enlace C-N del PVP o también del CTAB. La banda en 1217 cm⁻¹ esta desplazada a menor número de onda, ya que según la referencia [86] el PVP tiene bandas en 1225 cm⁻¹ para la vibración C-N. Se evidencia la banda asociada a la deformación cíclica del grupo CH₂ del PVP ubicada a 1379 cm⁻¹ y la banda en 1481 cm⁻¹ corresponde al enlace C-H en grupos cíclicos del PVP. La pequeña banda a 1658 cm⁻¹ se asocia al grupo carbonilo C=O del PVP. Los enlaces C-H están asociados a la banda a 2924 cm⁻¹.

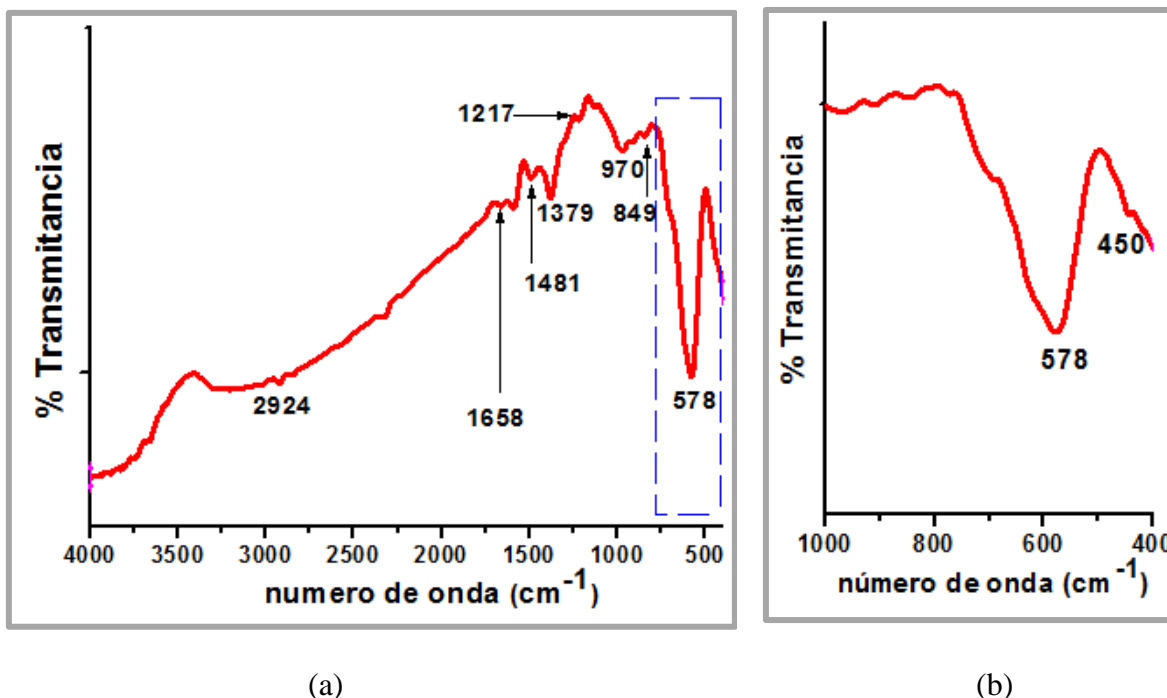


Figura 50. (a) Espectro IR del nanocompuesto de Fe₃O₄/Ag, (b) espectro del nanocompuesto en el rango de 400-1000cm⁻¹.

Las bandas de absorción observadas se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7. Bandas de absorción observadas en el espectro IR del nanocompuesto de Fe₃O₄/Ag.

| Bandas de absorción (cm ⁻¹) | Asignación | Referencias |
|---|---------------------|-------------|
| 419 | ν Fe-O (oh) | [27], [93] |
| 578 | ν Fe-O (th) | [27], [93] |
| 849 | ν -CO-N- | [96] |
| 970 | C-N | [96] |
| 1217 | C-N | [33, 96] |
| 1379 | CH ₃ | [96] |
| 1481 | ν CH (cíclicos) | [97] |
| 1658 | ν C=O | [96, 97] |
| 2924 | ν C-H | [97] |

A partir de la interpretación del espectro, se puede deducir que la magnetita mantiene su estructura. También se evidencia la presencia del polímero polivinilpirrolidona PVP, que actuaría como un dispersante y estabilizante de las nanopartículas de plata en el nanocompuesto final e interactúa con la plata mediante el N de la pirrolidina y el O del carbonilo.

En la Figura 51, se hace un comparativo de los espectros IR para las MNPs de magnetita y el nanocompuesto de Fe₃O₄/Ag, evidenciando los dos picos de Fe-O de la magnetita para los sitios tetraédricos y octaédricos. De esta forma comprobamos que la estructura de la magnetita no ha sido modificada por el recubrimiento con las NPs de plata.

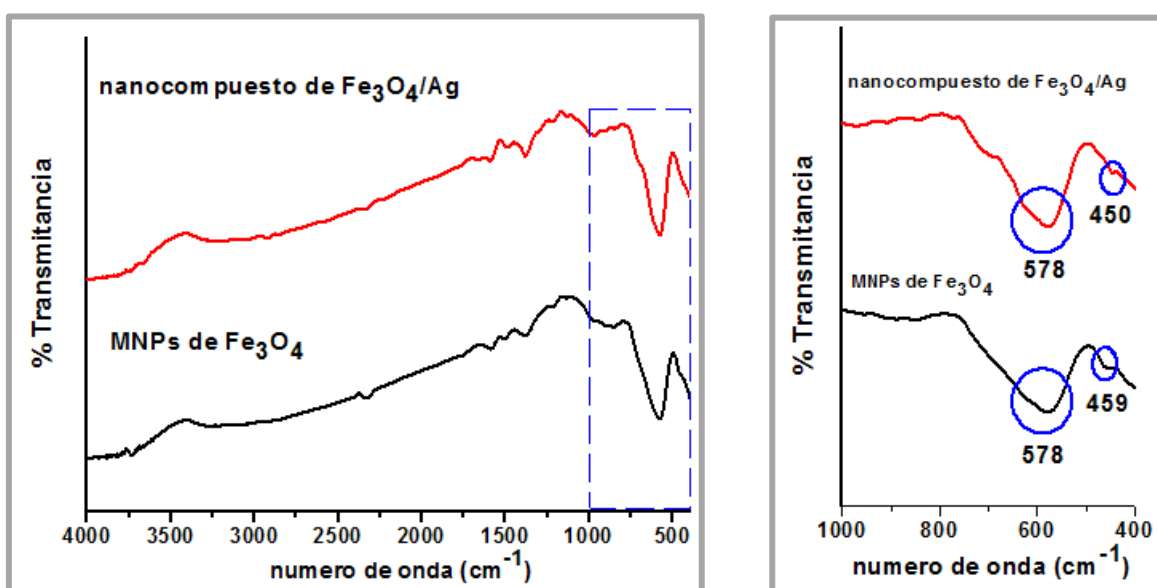


Figura 51. (a) Espectro IR comparativo de las MNPs de Fe₃O₄ y del nanocompuesto de Fe₃O₄/Ag, (b) espectro comparativo en el rango de 400-1000cm⁻¹.

4.2.2 Difracción de rayos X (DRX)

Las muestras en polvo evaluadas fueron secadas a 70°C por 8h. El espectro se evaluó usando un difractómetro de rayos X marca BRUKER modelo D8-FOCUS y la radiación Cu-K α 1.5406Å.

4.2.2.1 DRX de las MNPs de Fe₃O₄

El patrón de DRX (Figura 52) de los polvos analizados muestra la formación de las nanopartículas de Fe₃O₄ y revela que la celda unidad presente en la estructura es una espinela cúbica. Los picos de difracción a 2 θ son 18.3°, 30.1°, 35.5°, 43.1°, 53.3°, 56.9°, 62.5°, 74.3°, 89.6° y 94.4° que corresponden a los planos (111), (220), (311), (400), (422), (511), (440) y (533) respectivamente (Tabla 10), según la base de datos ICDD-2007. La ficha asociada a las fases del difractograma es la JCPDS-PDF 19-0629, a su vez son confirmados por la referencia [28].

Además se observa en el difractograma un crecimiento preferencial del plano (311).

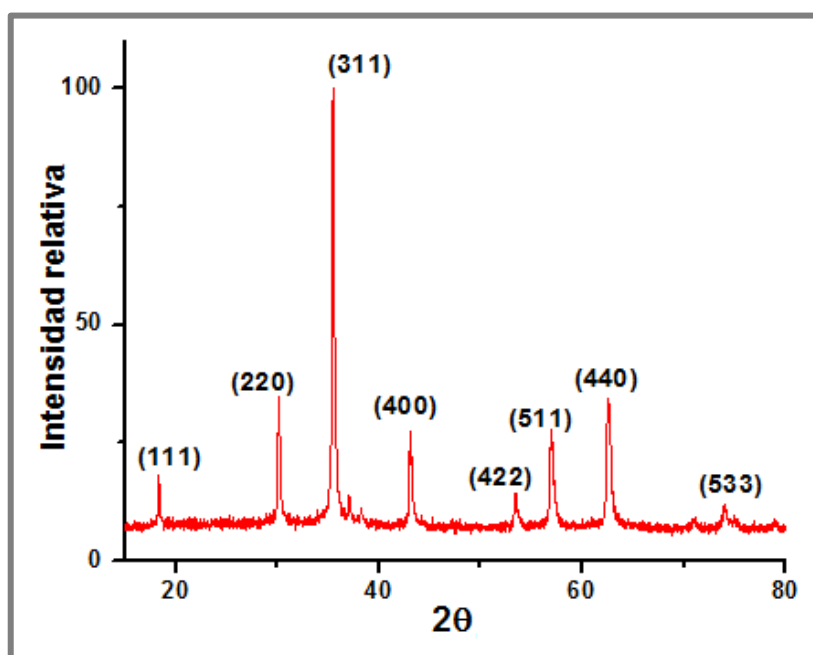


Figura 52. Difractograma de las MNPs de Fe₃O₄.

En la Tabla 8, se muestra el valor 2 θ con el respectivo plano para las MNPs de Fe₃O₄.

Tabla 8. Ángulo y plano correspondiente del DRX de las MNPs de Fe₃O₄.

| 2θ | Plano |
|-------|-------|
| 18.3° | (111) |
| 30.1° | (200) |
| 35.5° | (311) |
| 43.1° | (400) |
| 53.3° | (422) |
| 56.9° | (511) |
| 62.5° | (440) |
| 74.3° | (533) |

El diámetro medio de la cristalita de la magnetita Fe₃O₄, se calculó a partir del pico más representativo con intensidad máxima en base a la fórmula de Debye y Scherrer:

$$d_{crist} = \frac{0.9 \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos\theta} \quad (1.54)$$

Donde:

λ = Longitud de onda de la emisión CuK α = 1.5406 Å

β = Ancho de pico (2θ) a la altura media.

θ = Angulo de intensidad máxima.

El diámetro de la cristalita resultó 5.6 Å, usando el pico más intenso para el plano (311).

Tabla 9. Diámetro de la cristalita para la Fe₃O₄.

| Muestra | 2θ | θ | β | d _{cristalita} (Å) |
|--------------------------------|-------|------|------|-----------------------------|
| Fe ₃ O ₄ | 35.45 | 17.7 | 0.26 | 5.60 |

4.2.2.2 DRX del nanocompuesto Fe₃O₄/Ag

Según el patrón de DRX del nanocompuesto de Fe₃O₄/Ag (Figura 58), se confirma la presencia de los componentes cristalinos de Fe₃O₄ y Ag.

Una comparación del DRX de la Figura 53, con la base de datos ICDD-2007 confirma la presencia de magnetita y de plata, comparando con las fichas JCPDS-PDF 19-0629 y 04-0783 y confirmados por la referencia [23, 28]. Las NPs-Ag tienen una estructura cúbica, como evidencian los picos a valores de 2θ de 38.2°, 44.2°, 64.5° y 77.5° correspondientes a los planos (111), (200), (220) y (311) respectivamente. Estos picos

están de acuerdo con la estructura fcc con el parámetro de red, $a = 4,08 \text{ \AA}$ de plata metálica.

Los picos de difracción a 2θ son 18.3° , 30.1° , 35.5° , 43.2° , 53.4° , 57.1° , 62.6° y 74.3° , corresponden a los planos (111), (220), (311), (400), (422), (511), (440) y (533), respectivamente y están asociados a las MNPs de magnetita. Esto indica que la formación del nanocompuesto no afectó la estructura cristalina de la magnetita.

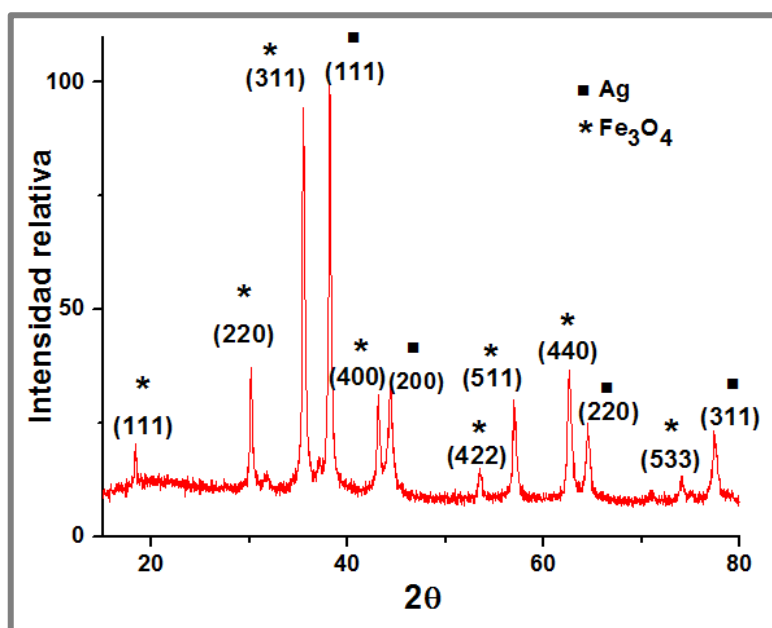


Figura 53. Difractograma del nanocompuesto de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$.

En la Tabla 10, se muestra el valor 2θ con el respectivo plano para las MNPs de Fe_3O_4 .

Tabla 10. Ángulo y plano correspondiente del DRX del nanocompuesto de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$.

| 2θ | Plano | Compuesto |
|--------------|-------|-------------------------|
| 18.3° | (111) | Fe_3O_4 |
| 30.1° | (200) | Fe_3O_4 |
| 35.5° | (311) | Fe_3O_4 |
| 38.2° | (111) | Ag |
| 43.1° | (400) | Fe_3O_4 |
| 44.2° | (200) | Ag |
| 53.3° | (422) | Fe_3O_4 |
| 56.9° | (511) | Fe_3O_4 |
| 62.5° | (440) | Fe_3O_4 |
| 64.5° | (220) | Ag |
| 74.3° | (533) | Fe_3O_4 |
| 77.5° | (311) | Ag |

Estos espectros confirman la presencia de Fe_3O_4 y Ag sin cambios de sus estructuras cristalinas por separado, indicando que la plata no influyo en la estructura de la magnetita. De este modo, se evidencia la formación del nanocompuesto $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$.

El diámetro de la cristalita para la MNPs de magnetita resultó 4.85 \AA , usando el pico más intenso para el plano (311) y el diámetro de la cristalita para las NPs de Ag resultó 3.97 \AA , usando el pico más intenso para el plano (111). Se observa que el diámetro para las MNPs de magnetita disminuye con respecto al valor de las MNPs de magnetita sola, también se observa que el diámetro de la cristalita para las NPs de Ag es menor comparado con las MNPs de magnetita.

Tabla 11. Diámetro de la cristalita para las MNPs de Fe_3O_4 y Nps -Ag.

| Muestra | 2θ | θ | β | $d_{\text{cristalita}} (\text{\AA})$ |
|-------------------------|-----------|----------|---------|--------------------------------------|
| Fe_3O_4 | 35.5 | 17.8 | 0.30 | 4.85 |
| Ag | 38.2 | 19.1 | 0.37 | 3.97 |

La Figura 54, muestra un comparativo del DRX de la magnetita Fe_3O_4 y el nanocompuesto $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$. Los picos de la magnetita permanecen en el difractograma del nanocompuesto y adicionalmente se evidencia dos picos de la plata. Esto indica que tanto como la magnetita y la plata, mantienen sus propiedades estructurales y no se ha formado un óxido mixto.

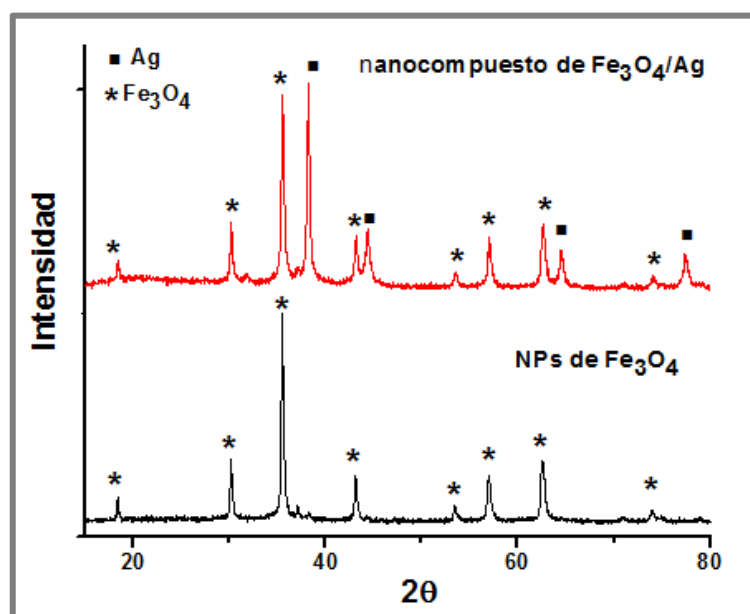


Figura 54. Difractograma comparativo de NPs de Fe_3O_4 (abajo) y nanocompuesto de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$ (arriba).

4.2.3 Espectroscopia Mössbauer

Para el análisis por espectroscopia Mössbauer se utilizó un espectrómetro convencional en la modalidad de transmisión con una fuente de ^{57}Co en matriz de rodio con una actividad de 12 mCi aproximadamente. Los espectros se acumularon a una velocidad de 11.017 mm/s en 1024 canales utilizando señal sinusoidal.

La espectroscopia Mössbauer ^{57}Fe , se usó para identificar el tipo de óxido de hierro en el nanocompuesto y declarar sus propiedades magnéticas.

Los espectros Mössbauer correspondientes a las muestras de MNPs de Fe_3O_4 y del nanocompuesto de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$, se observan en las Figuras 55 y 56. Ambas gráficas presentan un ajuste por distribución, tres sextetos asociados a sitios magnéticos y un doblete asociado a un posible estado superparamagnético, los cuales son diferentes a un espectro de una magnetita estequiométrica. La distribución representa sitios magnéticos desordenados con un campo magnético medio de 40.15 T posiblemente asociados al efecto de superficie de las partículas; los sextetos corresponden a los sitios octaédricos del Fe^{2+} y los sitios octaédricos y tetraédricos del Fe^{3+} de la magnetita, y el doblete está relacionado a los cationes de Fe^{2+} .

En la magnetita, ya que existe el mismo número de iones Fe^{+3} en los sitios Oh y Td, que se compensan entre sí, la magnetización resultante surge sólo de los iones Fe^{+2} no compensados en los sitios Oh [43].

Al comparar los parámetros hiperfinos (Tabla 12 y 13) obtenidos con los que están reportados en el Mössbauer Mineral Handbook, se observa que los parámetros hiperfinos (δ y Δ) para los sextetos en cada muestra, están dentro del rango de valores correspondiente al de una muestra de magnetita Fe_3O_4 .

La magnetita tiene la siguiente fórmula estructural:



en el que los iones ferrosos y férricos del sitio octaédrico (B) se fusionan en $\text{Fe}^{2.5+}$ debido a un salto electrónico rápido por encima de la transición de Verwey ($> 125 \text{ K}$). En el espectro Mössbauer a RT esta repartición de cationes da lugar a dos sextetos con parámetros hiperfinos típicos para Fe^{3+} y $\text{Fe}^{2.5+}$, y con una relación de área de aproximadamente 1: 1.9 para la magnetita estequiométrica [98].

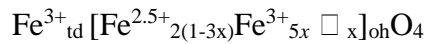
La magnetita no estequiométrica tiene la fórmula general $Fe_{3-x}O_4$ con $0 < x < 0.33$. Si se supone que las vacantes solo se localizan en los sitios octaédricos de la estructura, la fórmula puede escribirse como [97, 99]:



La estequiometria se puede convertir mediante la siguiente relación:

$$X = \frac{Fe^{2+}}{Fe^{3+}} = \frac{1-3x}{2+2x} \quad (1.55)$$

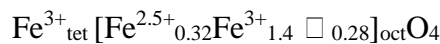
El salto rápido de electrones, que se conoce como un fenómeno de la magnetita, resulta en $Fe^{2.5+}$ por una cantidad igual de Fe^{2+} y Fe^{3+} octaédrico, dando la siguiente fórmula:



El espectro tiene tres sextetos: uno para $Fe^{2.5+}$ y dos para Fe^{3+} . Los espectros de magnetita a 298 K suelen ser capaces de encontrar la estequiometria comparando las áreas relativas de $^{Oh}Fe^{3+}$, $^{Td}Fe^{3+}$ y $^{Oh}Fe^{2.5+}$ usando la siguiente ecuación [100]:

$$X = \frac{Fe^{2+}}{Fe^{3+}} = \frac{\frac{1}{2} * Fe^{2.5+}_{oct}}{\frac{1}{2} * Fe^{2.5+}_{oh} + Fe^{3+}_{td}} = \frac{2(1-3x)}{5x} \quad (1.56)$$

En la evaluación para determinar la estequiometria de la MNPs de magnetita, siguiendo el modelo planteado, es posible diferenciar a los sitios $^{Td}Fe^{3+}$, $^{Oh}Fe^{3+}$ y $^{Oh}Fe^{2.5+}$. A partir de la tabla 8 se puede calcular la estequiometria de la magnetita, con los datos de área relativa, obteniendo un valor de $X=0.24$ y $x=0.280$. Entonces las MNPs de magnetita estudiada tendrían la fórmula:



El valor de $X=0.24$ indica que la magnetita tiene 80.6% de Fe^{3+} y 19.4% de Fe^{2+} , indicando más especies de Fe^{3+} que Fe^{2+} en la red. Esta relación es menor que la relación estequiométrica de la magnetita pura $X=0.5$, evidenciando que posiblemente la magnetita este oxidada.

El corrimiento isomérico δ es proporcional a la densidad de electrones para el átomo de Fe, donde el átomo de Fe^{2+} tiene una densidad electrónica más baja que un átomo de Fe^{3+} debido a que el electrón extra en d reduce la densidad electrónica en s , y por lo tanto el corrimiento isomérico de un átomo de Fe^{2+} es mayor que un átomo de Fe^{3+} en la mayoría de los casos [98]. Según los datos, el corrimiento isomérico del sitio octaédrico del Fe^{2+}

(0.386 mm/s) es ligeramente mayor que el sitio tetraédrico (0.079 mm/s) y octaédrico (0.184 mm/s) del Fe^{3+} .

El desplazamiento cuadrupolar 2ε es proporcional a la simetría del enlace relativo de un átomo de Fe, si se tiene tensiones más altas resulta un cambio cuadrupolar más grande. Para un átomo perfectamente simétrico, como el $\text{Tet}^{\text{Fe}^{3+}}$ en magnetita, el desplazamiento cuadrupolar esperado debe ser cero. En este caso, el desplazamiento cuadrupolar es 0.00504 mm/s.

Estos tres sextetos tienen campos magnéticos hiperfinos B_{hf} diferentes, siendo el campo de los sitios tetraédricos ligeramente mayor que el de los sitios octaédricos. Además, el doblete posee un área relativa de 4.75 % y puede estar relacionado a sitios de Fe^{2+} .

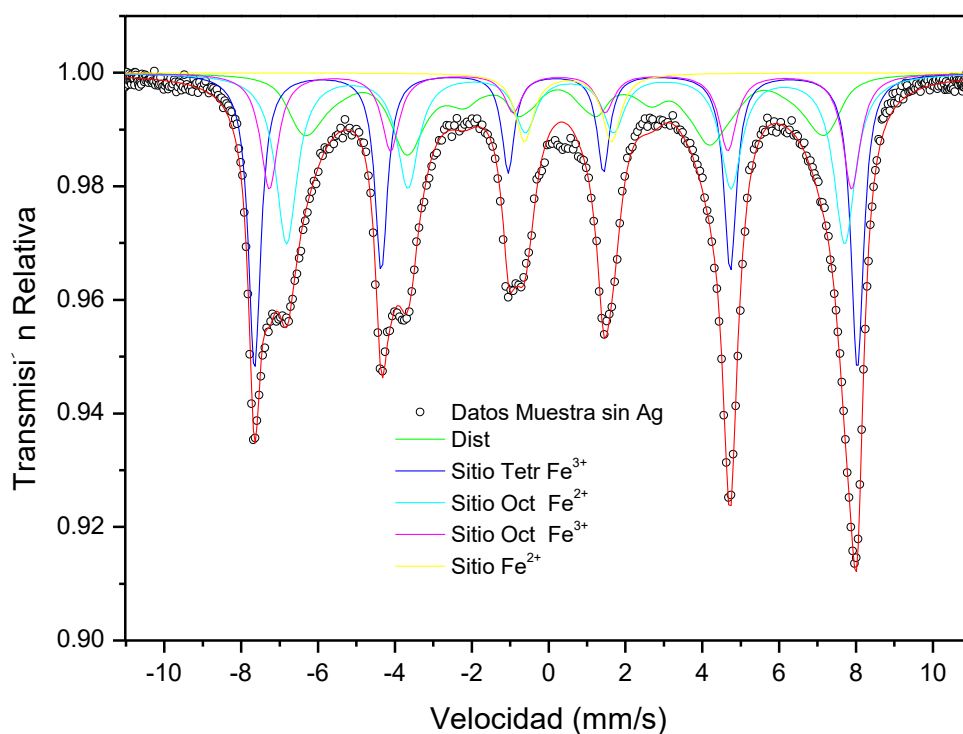


Figura 55. Espectro Mössbauer de las MNPs de Fe_3O_4 .

Tabla 12. Parámetros hiperfinos de MNPs de Fe_3O_4 .

| Muestras | $\delta/\text{Fe}(\text{mm/s})$ | 2ε (mm/s) | $\Delta E_Q(\text{mm/s})$ | B_{hf} (T) | A(%) |
|-----------------------------|---------------------------------|-----------------------|---------------------------|---------------------|-------|
| Tetraedral Fe^{3+} | 0.079 | 0.00504 | ---- | 48.652 | 28.32 |
| Octaedral Fe^{2+} | 0.386 | -0.1 | ---- | 45.04 | 27.85 |
| octaedral Fe^{3+} | 0.184 | 0.033 | ---- | 47 | 15.59 |
| Sitio con Fe^{2+} | 0.401 | ---- | 2.28 | ---- | 4.74 |
| Distribución | 0.222 | 0.18 | | 39.66 | 23.49 |

En la evaluación para determinar la estequiometría de la magnetita en el nanocompuesto de Fe₃O₄/Ag, si es posible diferenciar a los sitios ^{Td}Fe³⁺, ^{Oh}Fe³⁺ y ^{Oh}Fe²⁺ (Figura 56). A partir de la tabla 13 se puede calcular la estequiometría de la magnetita en el nanocompuesto, con los datos de área relativa, obteniendo un valor de X=0.22 y x=0.282. Entonces las MNPs de magnetita estudiada tendrían la fórmula:



El valor de X=0.22 y x=0.282 indica que la magnetita en el nanocompuesto tiene 82% de Fe³⁺ y 18% de Fe²⁺, indicando más especies de Fe³⁺ que Fe²⁺ en la red y en mayor proporción que la muestra de magnetita sola que tiene X=0.24.

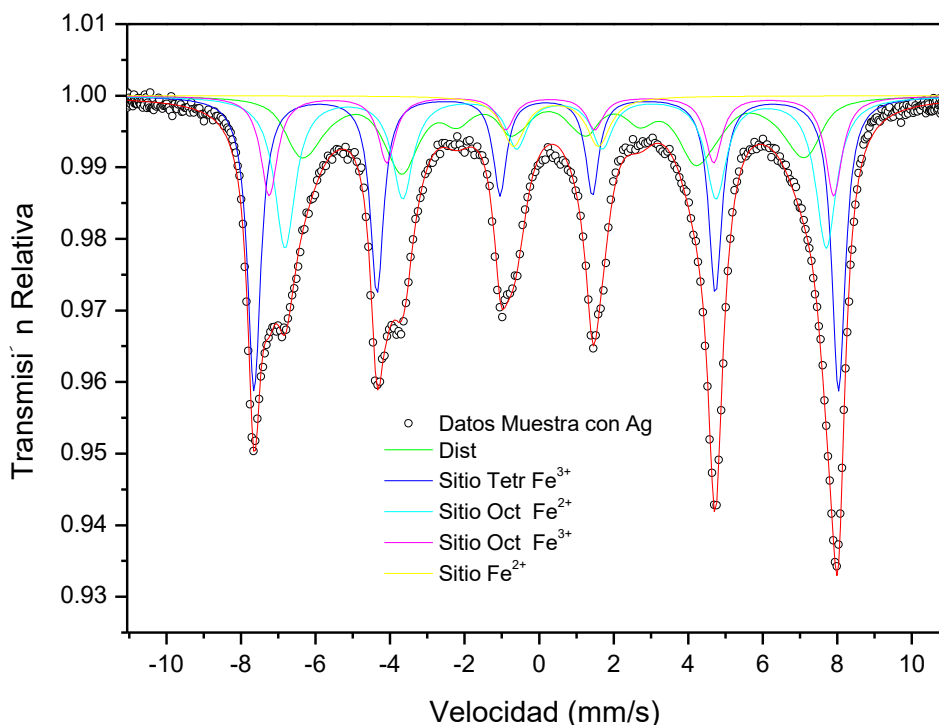


Figura 56. Espectro Mössbauer del nanocompuesto de Fe₃O₄/Ag.

Tabla 13. Parámetros hiperfinos del nanocompuesto de Fe₃O₄/Ag.

| Muestras | $\delta/\text{Fe}(\text{mm/s})$ | $2\varepsilon (\text{mm/s})$ | $\Delta E_Q(\text{mm/s})$ | $B_{\text{hf}} (\text{T})$ | A(%) |
|-----------------------------|---------------------------------|------------------------------|---------------------------|----------------------------|-------|
| Tetraedral Fe ³⁺ | 0.081 | 0.00504 | ----- | 48.652 | 32.34 |
| Octaedral Fe ²⁺ | 0.386 | -0.1 | ----- | 45.04 | 25.83 |
| Octaedral Fe ³⁺ | 0.201 | 0.033 | ----- | 47 | 13.71 |
| Sítio con Fe ²⁺ | 0.34 | ----- | 2.278 | ----- | 4.773 |
| Distribución | 0.206 | 0.14 | | 40.15 | 23.34 |

Según los datos, el corrimiento isomérico del sitio octaédrico del Fe^{2+} (0.386 mm/s) es ligeramente mayor que el sitio tetraédrico (0.081 mm/s) y octaédrico (0.201 mm/s) del Fe^{3+} . Estos valores son muy cercanos para el caso de la magnetita sola, indicando que los parámetros no han sido modificados con el recubrimiento de las NPs de plata.

El desplazamiento cuadrupolar 2ε tiene los mismos valores para el caso de magnetita pura. Estos tres sextetos tienen campos magnéticos hiperfinos B_{hf} diferentes, siendo el campo de los sitios tetraédricos ligeramente mayor que el de los sitios octaédricos. Además, el doblete posee un área relativa de 4.773 % y puede estar relacionado a sitios de Fe^{2+} superficiales, que es mayor a los sitios de Fe^{2+} superficiales en la magnetita sola.

4.2.4 Espectroscopia Raman

Para las medidas de espectroscopia Raman se usó un equipo marca HORIBA Scientific con un láser de 532 nm, en el Laboratorio de Electroquímica de la FC de la UNI.

4.2.4.1 Espectro Raman de las MNPs de Fe_3O_4

La Figura 57 muestra el espectro Raman de las nanopartículas de Fe_3O_4 con señales características de la magnetita, corroboradas con la literatura, en la región de 200-800 cm^{-1} . Se observa una señal a 355 cm^{-1} y 722 cm^{-1} que corresponde a la maghemita, indicando que la magnetita tiene especies oxidadas.

Los picos correspondientes a los números de onda de 660 cm^{-1} a 720 cm^{-1} indican el grupo tetraédrico y entre 460 cm^{-1} a 660 cm^{-1} indican el grupo octaédrico de las ferritas [100]. Las bandas de dispersión Raman observadas se resumen en la Tabla 14.

Tabla 14. Bandas de dispersión observadas en el espectro Raman de las MNPs de Fe_3O_4 .

| Bandas experimentales (cm^{-1}) | Bandas referenciales (cm^{-1}) | Referencia |
|---|--|-----------------|
| 204 | 205 | [101] |
| 264 | 268 | [101] |
| 355 | 350 | [101] |
| 470 | 460-490 | [100,102,103] |
| 554 | 540-560 | [100, 102, 105] |
| 575 | 580 | [100] |
| 628 | 615-607 | [102,106] |
| 722 | 730 | [101] |

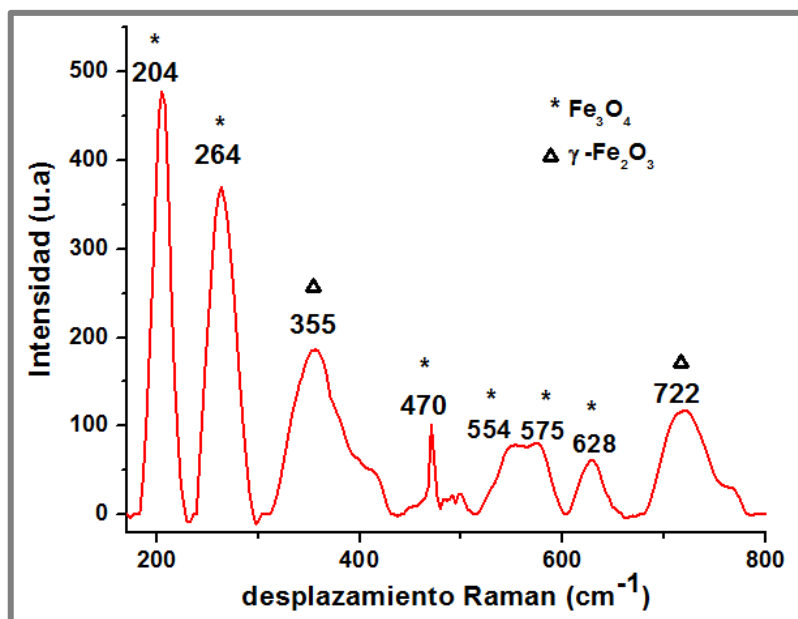


Figura 57. Espectro Raman de las MNPs de Fe₃O₄.

4.2.4.2 Espectro Raman del nanocompuesto de Fe₃O₄/Ag

En la Figura 58, se observa el espectro Raman del nanocompuesto de Fe₃O₄/Ag con señales características de la magnetita. Se observa una señal a 356 cm⁻¹ y 728 cm⁻¹ de la maghemita, más intensas que el espectro de las MNPs de magnetita, indicando un mayor porcentaje de oxidación en el nanocompuesto. La ausencia de la banda a 240 cm⁻¹ evidencia que el enlace Ag-O no se ha formado [107, 108].

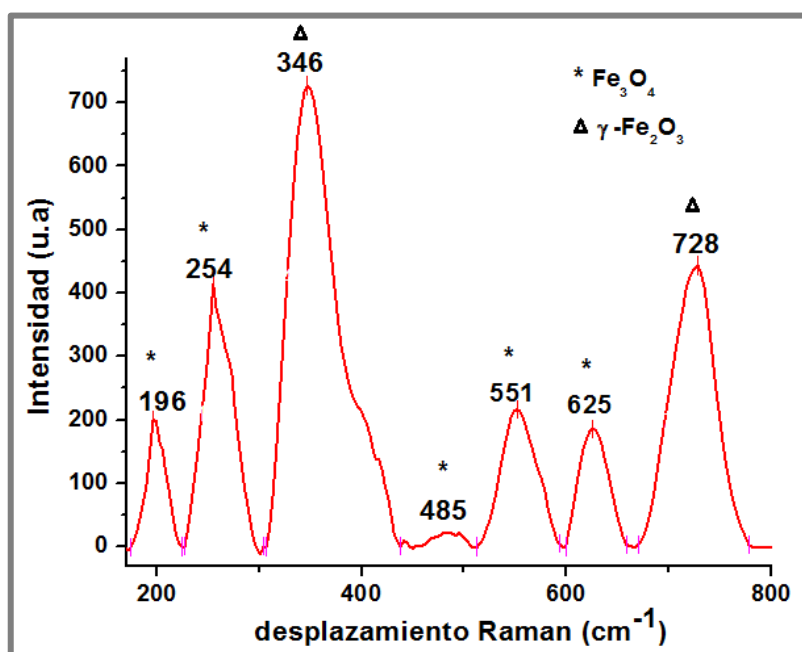


Figura 58. Espectro Raman del nanocompuesto de Fe₃O₄/Ag.

Las bandas de dispersión Raman de la magnetita en el nanocompuesto observadas se resumen en la Tabla 15.

Tabla 15. Bandas de dispersión observadas en el espectro Raman del nanocompuesto de Fe₃O₄/Ag.

| Bandas experimentales en MNPs Fe ₃ O ₄ (cm ⁻¹) | Bandas experimentales en nanocompuesto (cm ⁻¹) | Bandas referenciales (cm ⁻¹) | Referencia |
|--|--|--|----------------|
| 204 | 196 | 193 | [100] |
| 264 | 254 | 241 | [100] |
| 355 | 346 | 350 | [101] |
| 470 | 485 | 460-472 | [89-92] |
| 554 | 551 | 540-560 | [100, 102,103] |
| 575 | - | - | - |
| 628 | 625 | 607-615 | [102,106] |
| 722 | 728 | 690 | [101] |

Según la Tabla 15 y la Figura 59, se observa un desplazamiento a menor número de onda en el nanocompuesto con respecto a la magnetita sola, indicando la presencia de modos vibracionales de menor energía después del recubrimiento con iones plata.

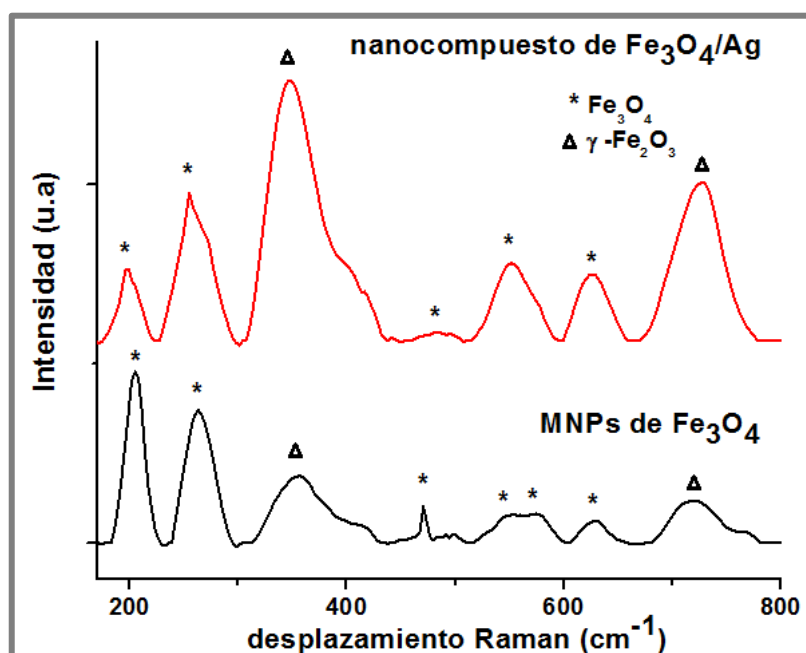
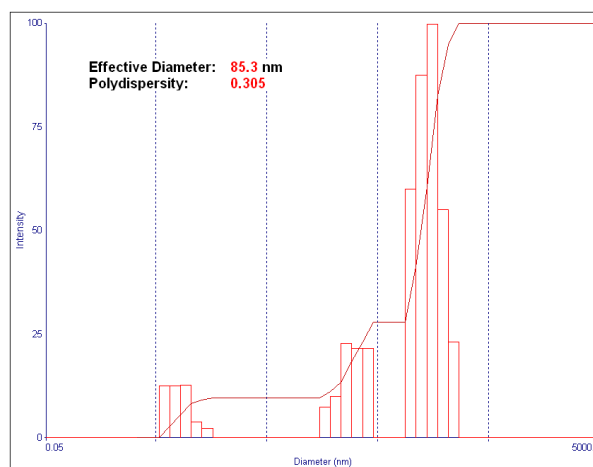
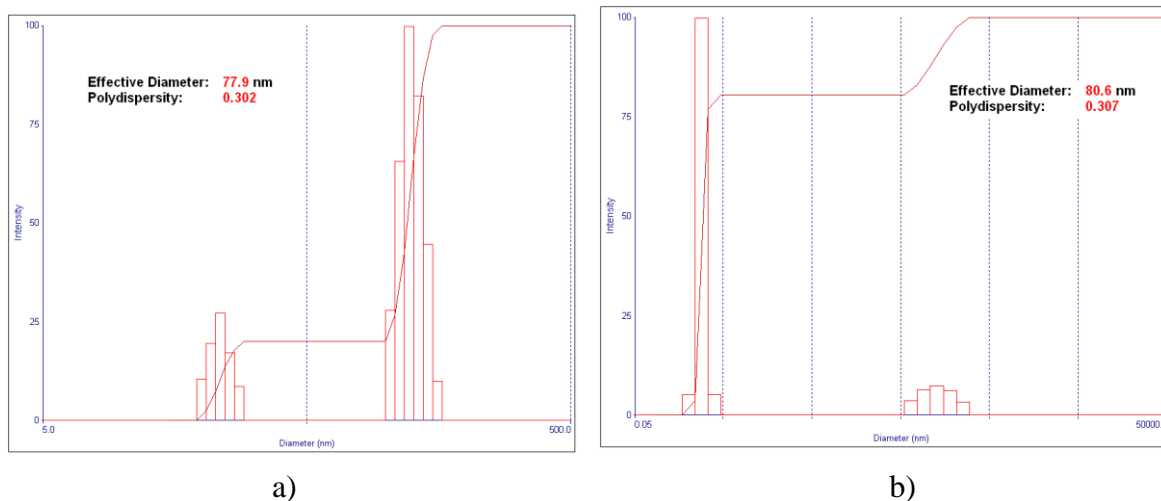


Figura 59. Espectro Raman comparativo de las MNPs de Fe₃O₄ (abajo) y del nanocompuesto de Fe₃O₄/Ag (arriba).

4.2.5 Dispersión de luz dinámica (DLS)

La suspensión de nanocompuesto de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$ se filtró a través de un filtro de membrana con tamaño de poro menor a $0.2 \mu\text{m}$. La distribución del tamaño de partícula se evaluó con medidas de dispersión de luz dinámica en un equipo 90 Plus Particle Size Analyser.

Se evaluaron diferentes muestras de nanocompuesto, con las mismas concentraciones para estudiar la estabilidad de las muestras (Figura 60). En tiempo cero, se observa un diámetro efectivo de partícula de 77.9 nm (Figura 60a), después de dos y cinco días se registró un leve crecimiento a 80.6 nm (Figura 60b) y 85.3 nm (Figura 60c), respectivamente.



c)

Figura 60. DLS del nanocompuesto de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$. Estabilidad a diferentes tiempos: a) Tiempo 0, b) después de 2 días y c) después de 5 días.

Esta técnica incluye el tamaño de partícula del polímero y surfactante incluidos en la superficie del nanocompuesto y las moléculas de agua adheridas a él (diámetro hidrodinámico).

Debido a que el material obtenido es un nanocompuesto, esta técnica no ayuda a determinar la distribución de tamaños por separado de la magnetita y plata. Sin embargo muestra que el tamaño en conjunto es nanométrico, tiene una polidispersibilidad de 30% y es estable.

4.2.6 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se examinó la morfología de los materiales con un microscopio electrónico de barrido.

4.2.6.1 Imagen SEM de las MNPs de Fe_3O_4

La Figura 61, muestra un aglomerado de partículas de tamaño nanométrico. En la Figura 62 se observa el histograma de los tamaños ajustando a una distribución logarítmica normal, con un tamaño promedio de 7.75 nm.

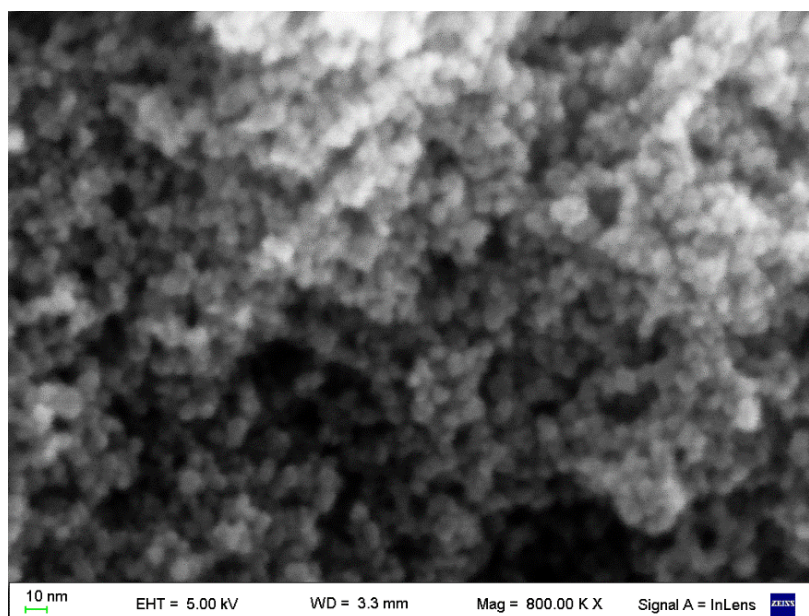


Figura 61. Micrografía SEM de las MNPs de Fe_3O_4 . (Magnificación = 800 00 aumentos).

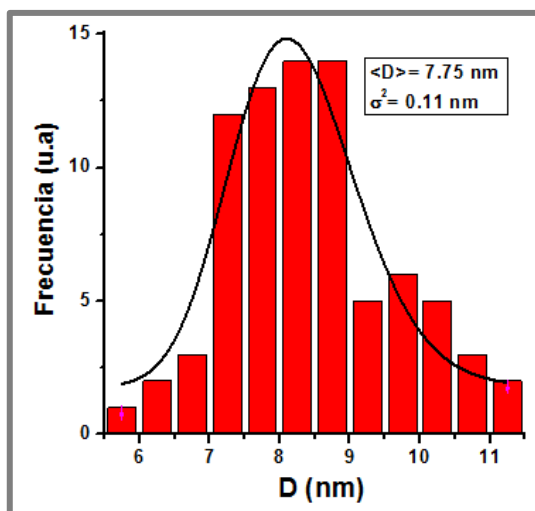


Figura 62. Distribución de tamaños de partícula para las MNPs de Fe_3O_4 con ajuste logarítmico normal.

4.2.6.2 Imagen SEM del nanocompuesto de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$

La Figura 63 muestra la imagen SEM del nanocompuesto de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$, se evidencia partículas esféricas y dispersas en su mayoría. La Figura 64 muestra el histograma con la distribución de tamaños de partícula para el nanocompuesto y revela un tamaño promedio de 10.13 nm con una cantidad reducida de partículas más grandes, alrededor de 22nm.

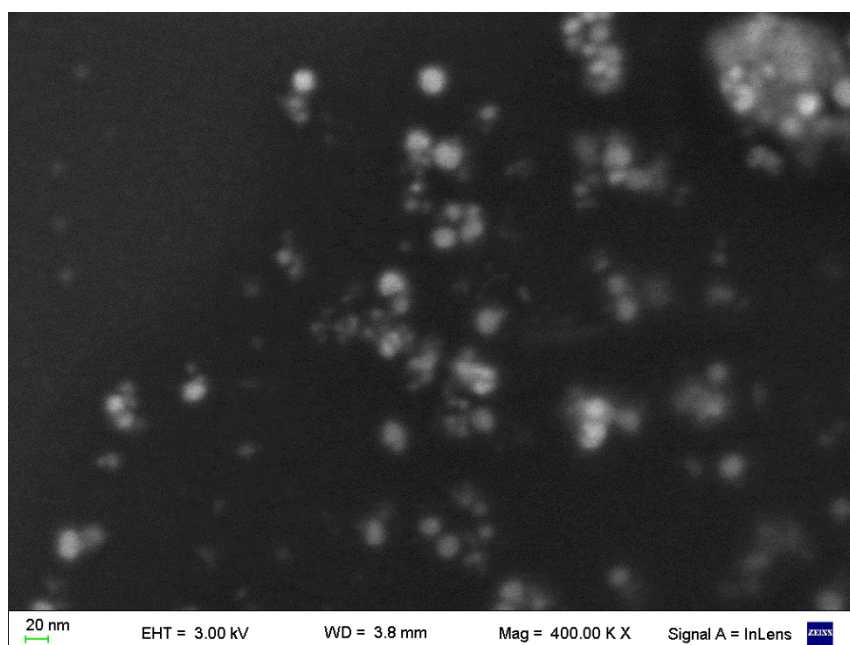


Figura 63. Micrografía SEM del nanocompuesto de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$. (Magnificación = 40000 aumentos).

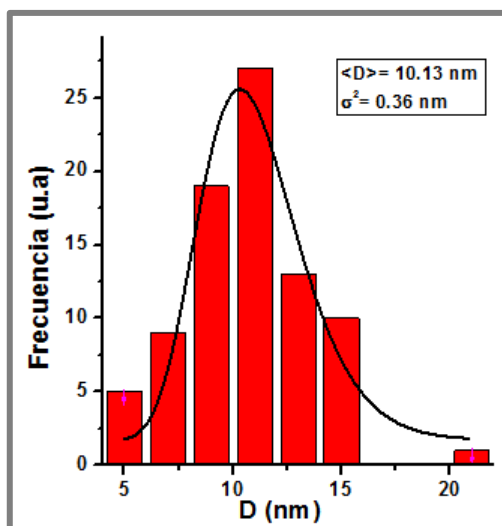


Figura 64. Distribución de tamaños de partícula del nanocompuesto de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$ con ajuste logarítmico normal.

4.2.7 Energía dispersiva de rayos X (EDX)

La composición química de las muestras correspondientes, se analizaron por la técnica de energía dispersiva de rayos X (EDX), la cual esta acoplada al microscopio electrónico de barrido (SEM).

4.2.7.1 Espectro EDX de MNPs de Fe_3O_4

La Figura 65 muestra el espectro EDX, que presenta al hierro Fe 2p. La presencia de C y K se relaciona con la contaminación de la muestra. El análisis EDX muestra tres picos de Fe y uno de O, confirmando la formación de óxido de hierro como magnetita de acuerdo a su porcentaje en masa. La Tabla 16 indica los porcentajes en masa para cada elemento que evidenció el análisis EDX.

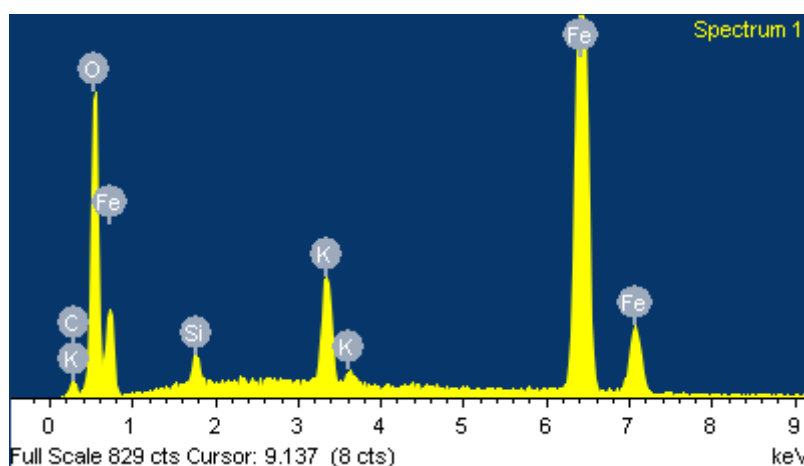


Figura 65. Espectro de energía dispersiva EDX de las MNPs de Fe_3O_4 .

Tabla 16. Porcentaje en masa de los elementos presentes en las MNPs de Fe₃O₄.

| Elemento | %Masa |
|----------|--------|
| Fe | 65.28 |
| O | 26.14 |
| K | 4.94 |
| C | 2.45 |
| Si | 1.19 |
| Total | 100.00 |

La relación molar Fe/O en la magnetita Fe₃O₄ es 0.75. Según el EDX los moles de Fe son 0.65 g/55.845 g/mol =11.68 mmoles y los moles de O son 0.2614 g /16 g/mol= 16.34 mmoles. Entonces la relación molar Fe/O según EDX es 11.68/16.34= 0.72. Este valor de 0.72 se acerca a la relación molar teórica 0.75.

4.2.7.2 Espectro EDX del nanocompuesto de Fe₃O₄/Ag

La Figura 66 presenta el espectro EDX presenta al hierro Fe 2p y plata Ag 3d. La presencia de C y K se relaciona con la contaminación de la muestra.

El pico de absorción óptica se observó aproximadamente a 3 keV, que es típico para la absorción de nanopartículas de plata metálica debido a la resonancia de plasmón superficial [109]. El contenido de plata fue de 11.7 % en masa.

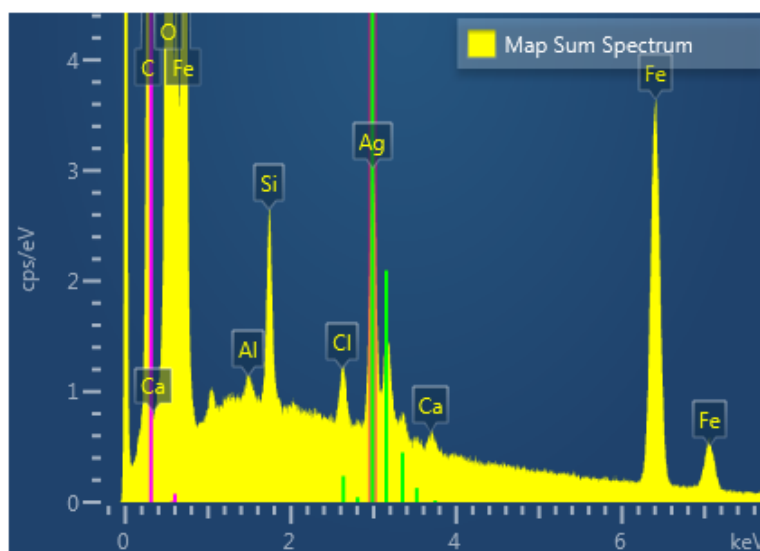


Figura 66. Espectro de energía dispersiva EDX del nanocompuesto Fe₃O₄/Ag.

La Tabla 17 se indican los porcentajes en masa y atómicos, que evidenció el análisis EDX.

Tabla 17. Porcentaje en masa y atómico de los elementos presentes en el nanocompuesto Fe₃O₄/Ag.

| Elemento | %Masa |
|----------|--------|
| Fe | 58.2 |
| O | 27.3 |
| Ag | 11.7 |
| Si | 1.5 |
| Cl | 0.6 |
| Ca | 0.4 |
| Br | 0.4 |
| Total | 100.00 |

La relación molar Fe/O en la magnetita Fe₃O₄ es 0.75. Según el EDX los moles de Fe son 0.582 g/55.845 g/mol =10.42 mmoles y los moles de O son 0.273 g /16 g/mol= 17.06 mmoles. Entonces la relación molar Fe/O según EDX es 10.42/17.06= 0.61. Este valor de 0.61 es más distante del valor de la relación molar teórica de 0.75.

4.2.8 Espectrofotometría UV-Visible

Los espectros de absorción UV-Vis se registraron en un espectrómetro UV- VIS Perkin Elmer Lambda 25, con cubetas de cuarzo de 1 cm.

En la Figura 67 se observa el espectro comparativo UV-Visible, en el rango de 350-700 nm, para la MNPs de Fe₃O₄, las nanopartículas Fe₃O₄/Ag-GLUC y para las nanopartículas Fe₃O₄/Ag-PVP. Esta comparación de síntesis se realizó con el fin de comprobar que el PVP no actúa como agente reductor y la glucosa sí.

En la Figura 67a y 67b se observa que el espectro de la magnetita y el espectro de Fe₃O₄/Ag-PVP son similares, evidenciando que el PVP no es un agente reductor en la síntesis de NPs-Ag a las condiciones y concentraciones utilizadas.

En la Figura 67c se observa una banda a aproximadamente 420 nm, que corresponde a la formación del pico de resonancia del plasmón superficial de las NPs-Ag. Por tanto, se evidencia que la glucosa actúa como agente reductor para los iones plata y que el PVP actúa como agente dispersante acomplejando a los iones plata.

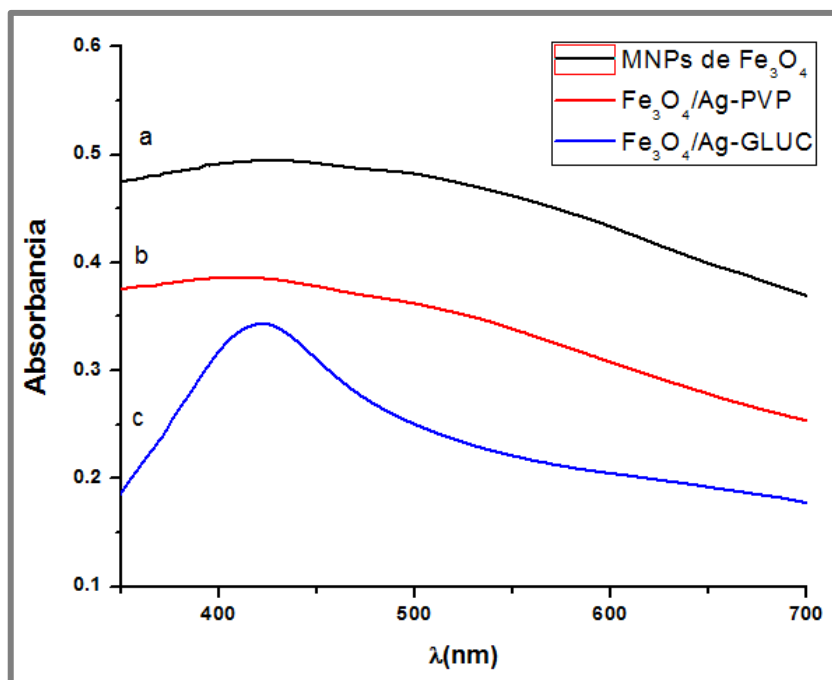


Figura 67. Espectro UV-Visible comparativo de a) MNPs de Fe₃O₄, b) Fe₃O₄/Ag-PVP, c) Fe₃O₄/Ag-GLUC.

4.3 Nanocompuesto de Fe₃O₄/Ag

El polímero sintético, polivinilpirrolidona PVP es uno de los polímeros más ampliamente utilizados en la medicina debido a su solubilidad en agua y su baja citotoxicidad (Figura 68).

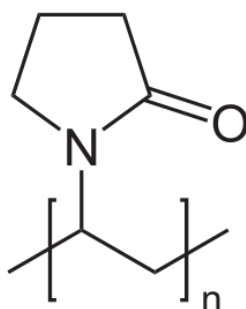


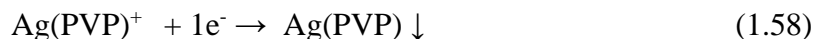
Figura 68. Estructura del polímero polivinilpirrolidona (PVP).

Las posibles reacciones entre la glucosa y los iones de plata en solución de PVP son las siguientes:

Primero el ion plata Ag⁺ forma un complejo con el PVP:

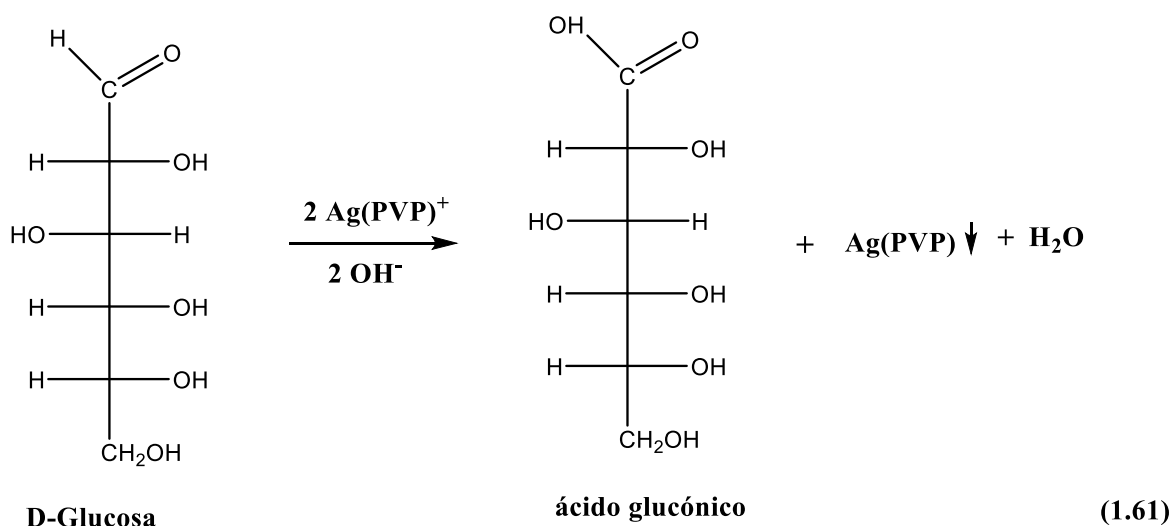
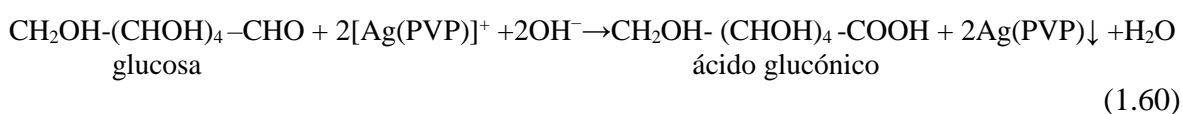


Luego ocurre una reacción de oxidación –reducción entre Ag(PVP)^+ y la glucosa. El complejo Ag(PVP)^+ se reduce a Ag(PVP) y la glucosa se oxida a ácido glucónico en medio básico:



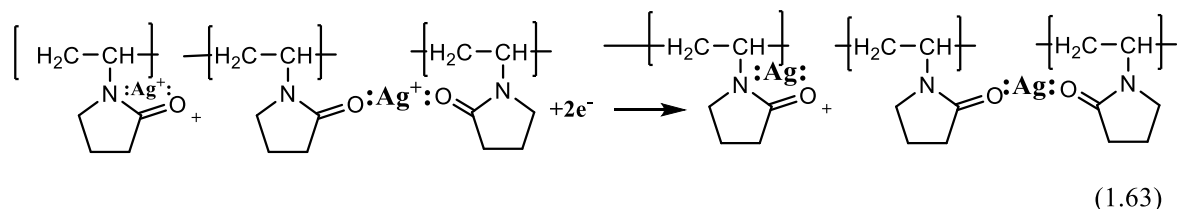
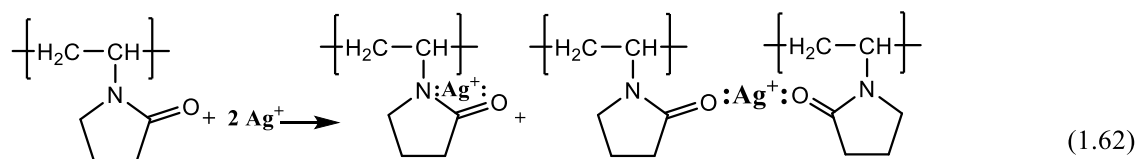
La formación del ácido glucónico ocurre mediante un mecanismo de adición nucleofílica entre el ion hidroxilo y la glucosa.

La reacción final balanceada sería:



El mecanismo de protección del PVP sobre las partículas de plata, puede ser planteado en base a la referencia [51], según la ecuación 1.62 y 1.63.

En la ecuación 1.62 se el ion plata Ag^+ interactúa con los grupos carbonilo o entre el N y el O del carbonilo del PVP. Luego el ion plata se reduce con la presencia de glucosa que se transforma a ácido glucónico. El producto final sería las partículas de plata interactuando con los carbonilos o entre N y O del PVP (ecuación 1.63), resultando un efecto estabilizador al crear una capa protectora sobre las partículas evitando su crecimiento y aglomeración.



La velocidad de la mezcla de reacción influye en el proceso ya que las partículas formadas necesitan tiempo para dispersarse en la solución, también el surfactante requiere tiempo para formar la capa protectora. Si la velocidad de mezcla es muy alta, las nuevas partículas se formarían a partir de las anteriores y formarían partículas más grandes. Es por eso que se controló la velocidad de goteo de la solución de Ag^+ a una gota por segundo, de este modo hay tiempo suficiente para que los núcleos puedan formarse antes de que se formen los nuevos núcleos y puedan crecer, aunque si el goteo es demasiado lento, el tiempo de reacción se hace más largo, y las partículas impactarán entre sí y tenderán a aglomerarse.

La aglomeración de las NPs-Ag depende de la concentración de OH^- , ya que con la concentración adecuada, los iones Cl^- se adsorben en la superficie de las partículas formando una doble capa eléctrica, protegiendo al coloide de la aglomeración. Si hay un exceso de iones OH^- , estos se difunden y la doble capa disminuye, logrando la aglomeración. La dispersión de magnetita agregada en la síntesis del nanocompuesto, estaba a un pH de 11.5, dando un medio básico para la formación de las partículas de Ag, es por eso que no se agregó más base a la síntesis.

Además, los tamaños de partícula también se ven influenciadas por el pH del sistema de reacción. En la literatura se realizó un estudio de la relación del pH y el tamaño de las nanopartículas de plata, encontrando que el tamaño aumenta al aumentar el pH. El menor tamaño fue a 11.5 y siguió aumentando a pH 12 y 13. El resultado indicó partículas nanométricas dispersas, según la imagen SEM del nanocompuesto.

La representación esquemática de las etapas de reacción en la síntesis del nanocompuesto se muestra en la Figura 69, validadas con la literatura [51] y con el

espectro UV-Vis presentado en la sección 4.2.8, donde se verifica la reducción de los iones plata con la glucosa como reductor y como acomplejante al PVP:

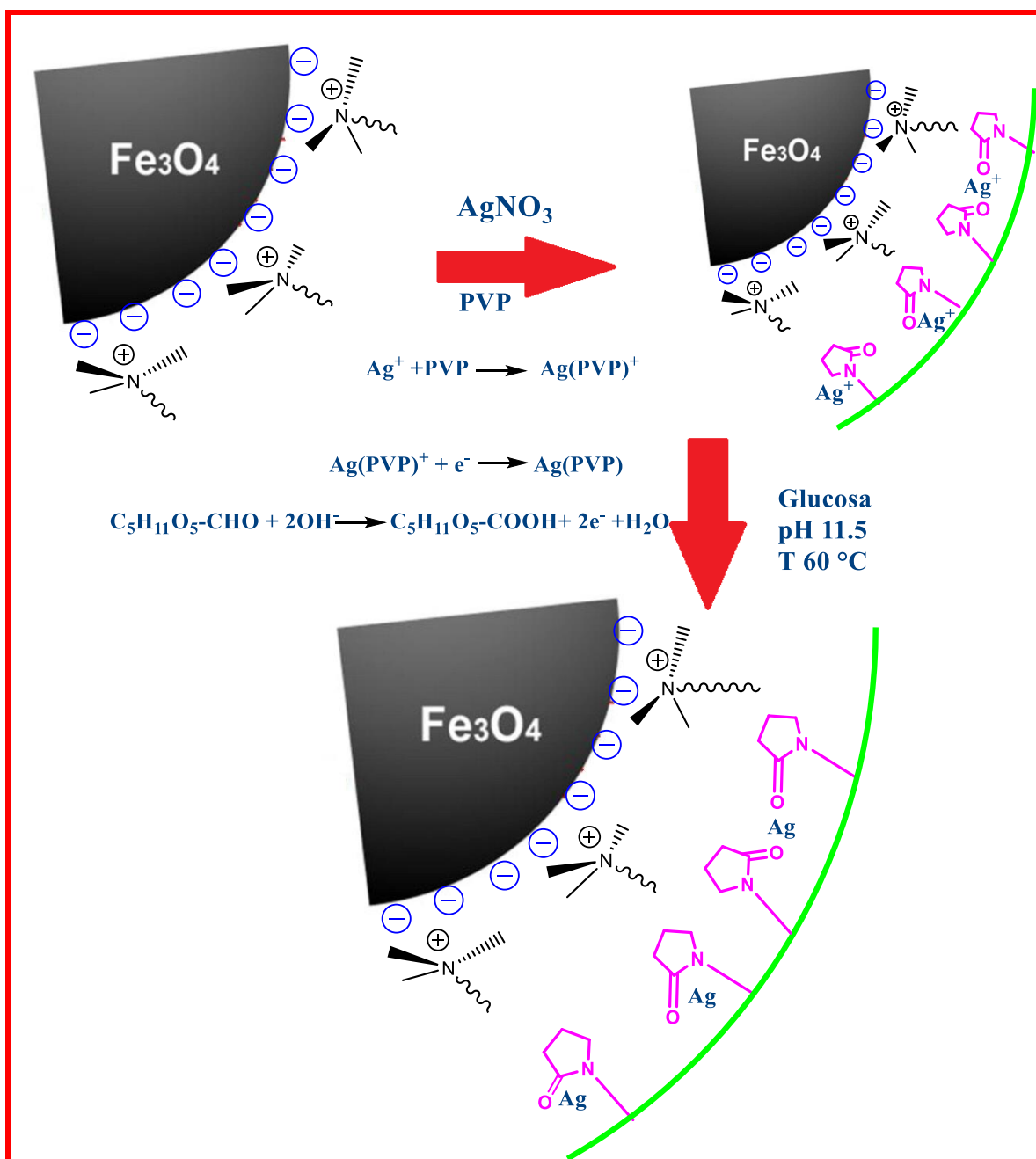


Figura 69. Representación esquemática de las etapas de reacción en la síntesis del nanocompuesto de Fe₃O₄/Ag.

4.4 Actividad antibacteriana del nanocompuesto de Fe₃O₄/Ag

La plata tiene una importante ventaja sobre los antibióticos convencionales, ya que mata todos los microorganismos patógenos, y no hay organismo que desarrolle fácilmente resistencia a ella. Además, es poco probable que los microbios desarrollen resistencia contra la plata, como lo hacen contra antibióticos convencionales, porque el metal ataca a una amplia gama de objetivos en el organismo, lo que significa que tendrían que desarrollar una serie de mutaciones al mismo tiempo, para protegerse. Por estas razones los compuestos se utilizan ampliamente en muchas aplicaciones bactericidas [7].

Las nanopartículas de plata son eficaces con los microorganismos debido a su pequeño tamaño y mayor área superficial. Muchos estudios proponen que las NPs-Ag pueden unirse a la superficie de la membrana celular perturbando las funciones de respiración y permeabilidad de la célula [110].

Las partículas más pequeñas que tienen la superficie más grande disponible para interacción darán un efecto bactericida más que las partículas más grandes [111].

Se determinó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) para los controles y el nanocompuesto, donde la eficacia antibacteriana del nanocompuesto de Fe₃O₄/Ag se demostró calculando el porcentaje de bacterias inhibidas por el nanocompuesto según la ecuación 1.48:

$$\text{Eficiencia antibacteriana} = \frac{F_{\text{control}} \times N_{\text{control}} - F_{\text{muestra}} \times N_{\text{muestra}}}{F_{\text{control}} \times N_{\text{control}}}$$

donde N_{control} , N_{muestra} son el número de las colonias en las placas con agar del control 2 y la muestra, respectivamente, y F_{control} , F_{muestra} son el factor de dilución del control y la muestra, respectivamente. De este modo $F \times N$ se expresa en UFC/ml de la muestra original.

4.4.1 Resultados para la prueba con la bacteria *Enterobacter aerogenes*

Las placas incubadas del control 1 y del control 2 después de la incubación de *Enterobacter aerogenes*, se muestran en la Figura 70 y 71 respectivamente. Los análisis se realizaron por duplicado.

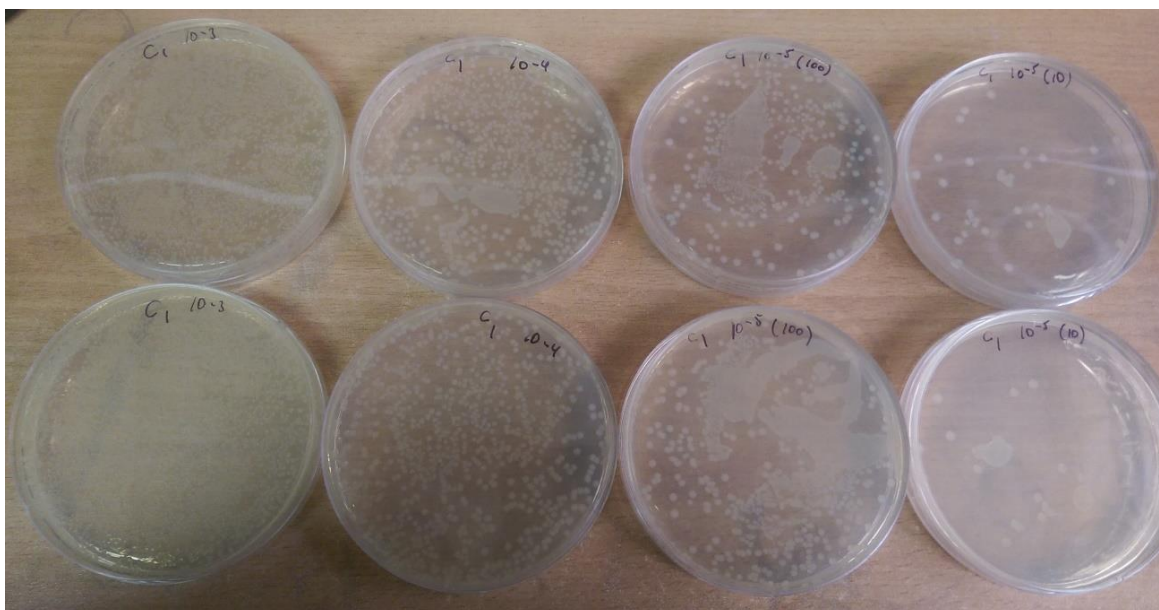


Figura 70. Placas después de la incubación a 37°C por 24h para el control 1 de la bacteria *Enterobacter aerogenes*.

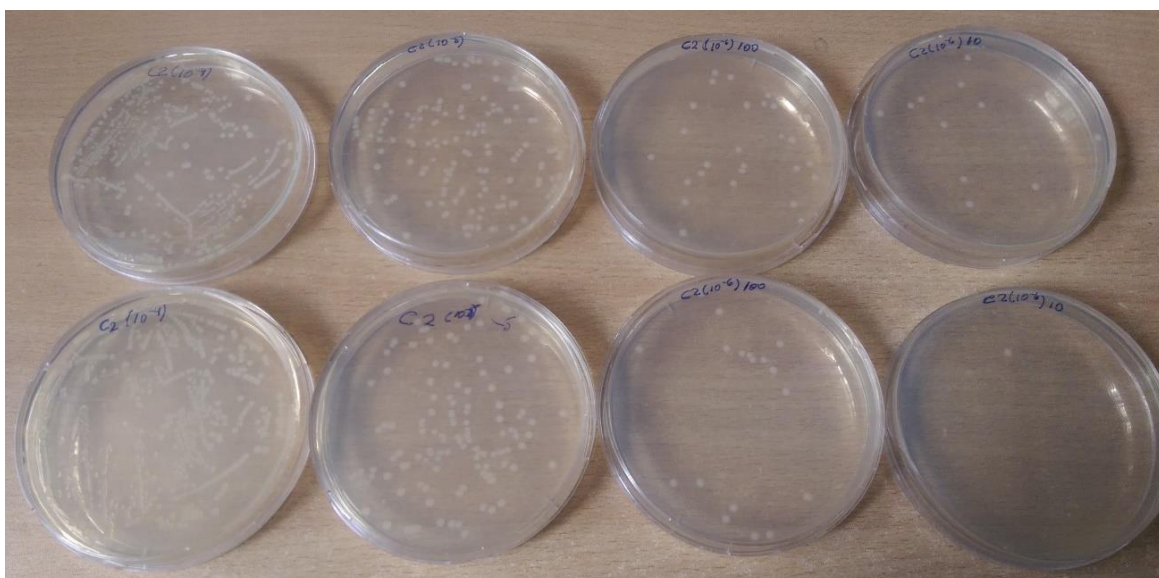
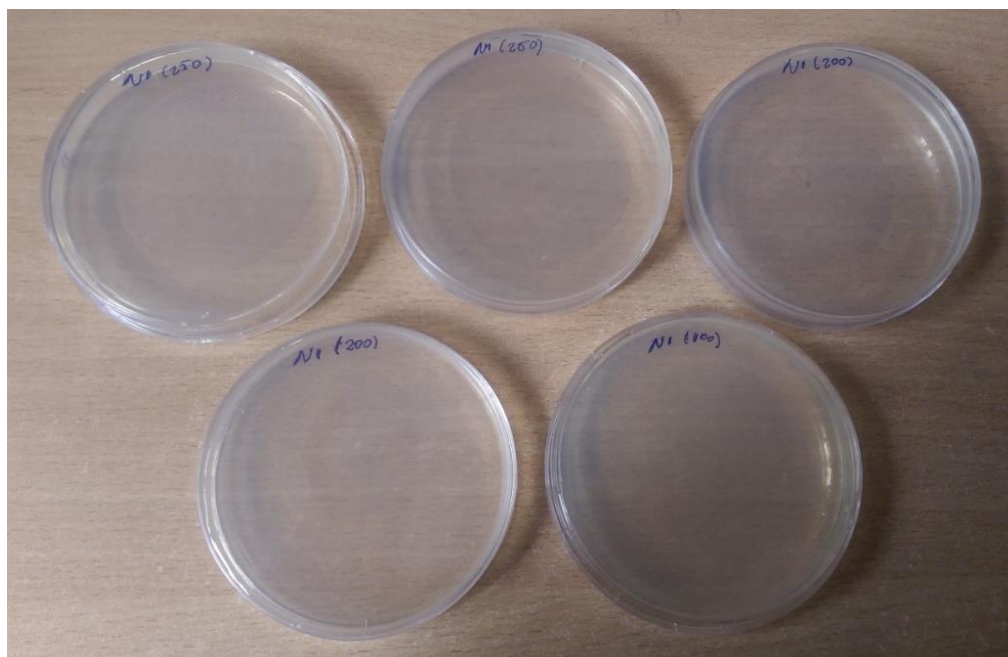
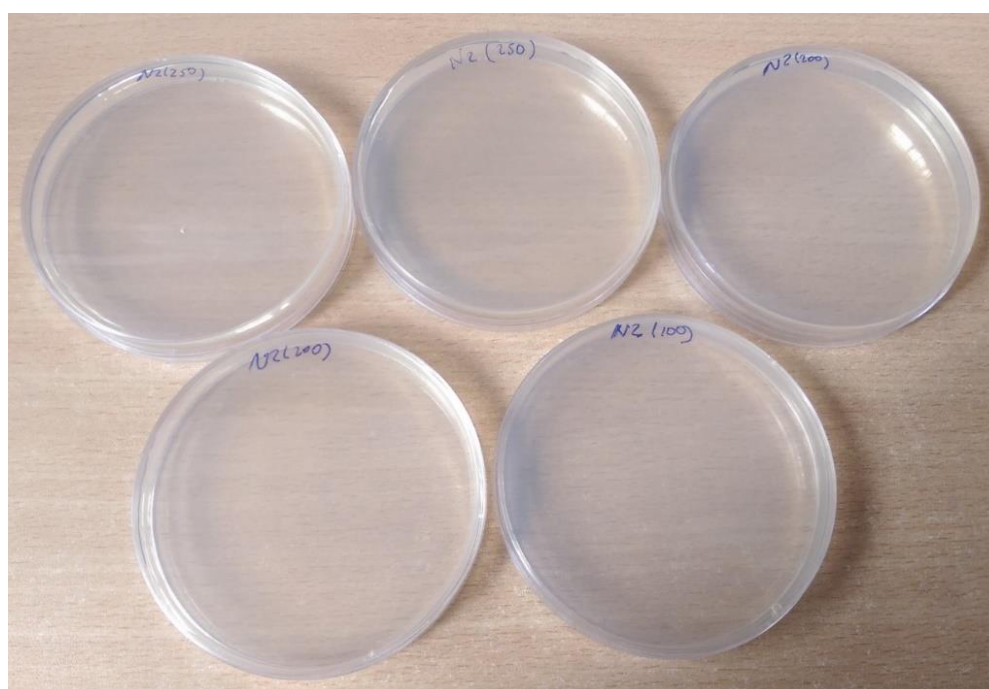


Figura 71. Placas después de la incubación a 37°C por 24 h para el control 2 de la bacteria *Enterobacter aerogenes*.

Las placas incubadas de la suspensión bacteriana tratada con el nanocompuesto Fe₃O₄/Ag después de la incubación para la bacteria *Enterobacter aerogenes*, se muestran en la Figura 72. Los análisis se realizaron a partir de dos muestras duplicadas del nanocompuesto (N1 y N2).



(a)



(b)

Figura 72. Placas después de la incubación a 37°C por 24 h de *Enterobacter aerogenes* tratada con nanocompuesto $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$; (a) y (b) son las dos repeticiones.

Los resultados del conteo de colonias se expresaron en UFC/ml para lo cual se multiplicó el promedio del número de colonias obtenido, por el inverso de la dilución final de la muestra. En la Tabla 18 se muestra los resultados del conteo de colonias del control 1 y 2 para *Enterobacter aerogenes*. Los conteos que se toman en cuenta solo para las placas

que contengan entre 30 y 300 colonias, es por eso que en algunos casos en la tabla no se calculó las UFC/ml.

Tabla 18. Resultados del conteo de colonias de *Enterobacter aerogenes*.

| Muestra | Dilución | Conteo | Factor de dilución | UFC/ml | Promedio parcial UFC/ml | Promedio Final UFC/ml |
|-----------|----------|--------|--------------------|----------------------|-------------------------|-----------------------|
| Control 1 | -4 | 432 | 100000 | 43 x 10 ⁶ | 39 x 10 ⁶ | 95 x 10 ⁶ |
| | -4 | 351 | 100000 | 35 x 10 ⁶ | | |
| | -5 | 135 | 1000000 | 14 x 10 ⁷ | 15 x 10 ⁷ | |
| | -5 | 156 | 1000000 | 16 x 10 ⁷ | | |
| | -5 | 24 | 10000000 | - | - | |
| | -5 | 15 | 10000000 | - | | |
| Control 2 | -5 | 89 | 1000000 | 89 x 10 ⁶ | 95 x 10 ⁶ | 95 x 10 ⁶ |
| | -5 | 100 | 1000000 | 10 x 10 ⁷ | | |
| | -6 | 17 | 10000000 | - | - | |
| | -6 | 27 | 10000000 | - | | |
| | -6 | 1 | 100000000 | - | - | |
| | -6 | 12 | 100000000 | - | | |

En la Tabla 19 se muestra los resultados del conteo de colonias de las dos repeticiones del nanocompuesto Fe₃O₄/Ag con *Enterobacter aerogenes*.

Tabla 19. Resultados del conteo de colonia para el nanocompuesto Fe₃O₄/Ag con la bacteria *Enterobacter aerogenes*

| Muestra | µl agregados sin dilución | Conteo | UFC/ml | Promedio |
|---------|---------------------------|--------|--------|----------|
| N1 y N2 | 100 µl | 0 | 0 | 0 |
| | 200 µl | 0 | 0 | |
| | 200 µl | 0 | 0 | |
| | 250 µl | 0 | 0 | |
| | 250 µl | 0 | 0 | |

Se observa que no hay formación de colonias, indicando la inhibición total del crecimiento de la bacteria Gram negativa *Enterobacter aerogenes*. Se continuó la incubación por 48 h, manteniéndose la ausencia de crecimiento bacteriano.

4.4.2 Resultados para la prueba con la bacteria *Enterococcus faecalis*

Las placas incubadas del control 1 y del control 2 después de la incubación para la bacteria *Enterococcus*, se muestran en la Figura 73 y 74 respectivamente. Los análisis se realizaron por duplicado.



Figura 73. Placas después de la incubación a 37°C por 48 h para el control 1 de la bacteria *Enterococcus faecalis*.

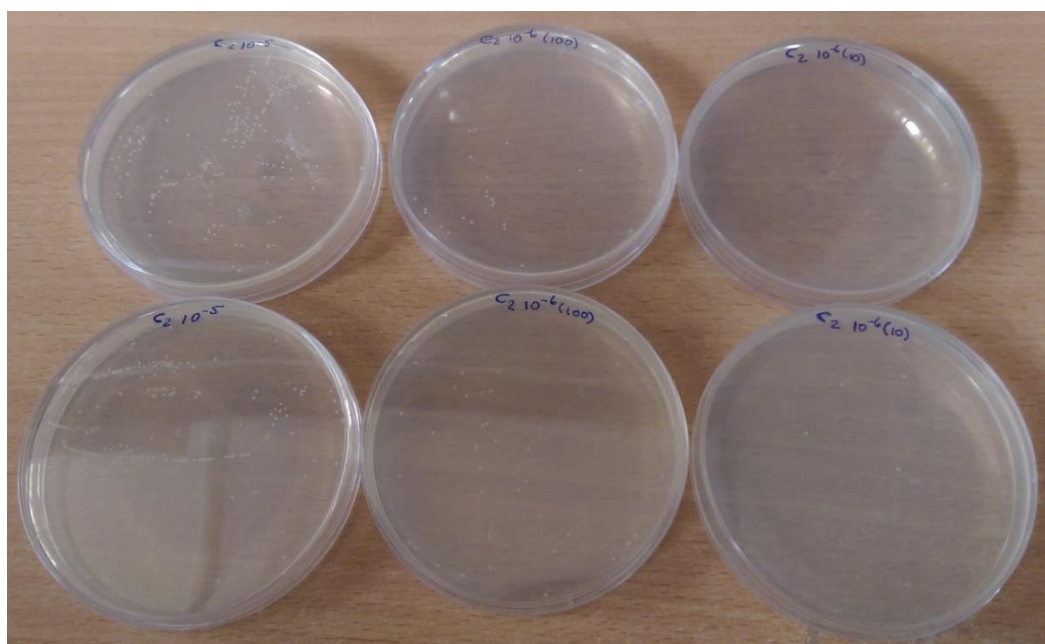
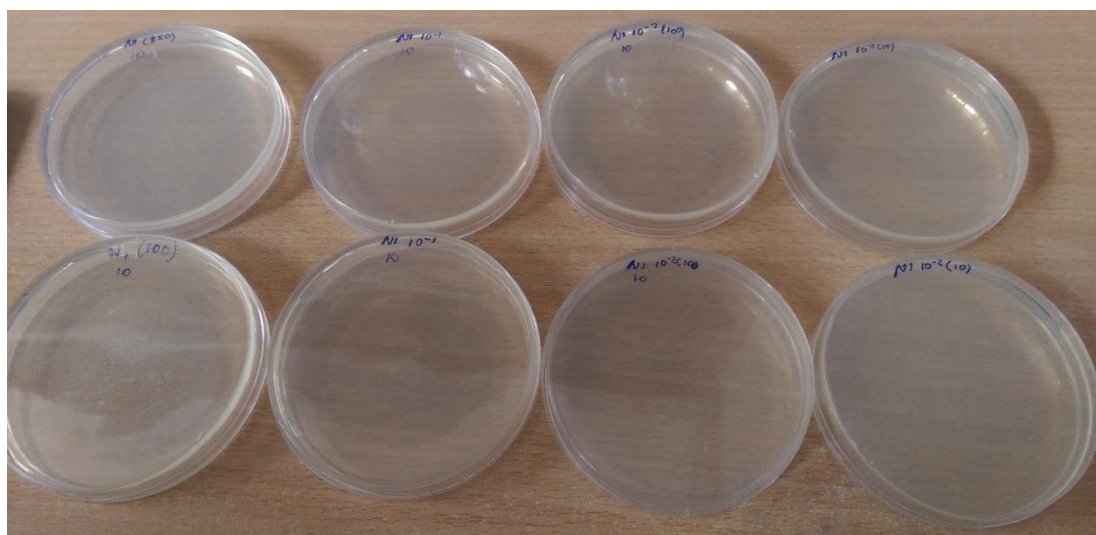
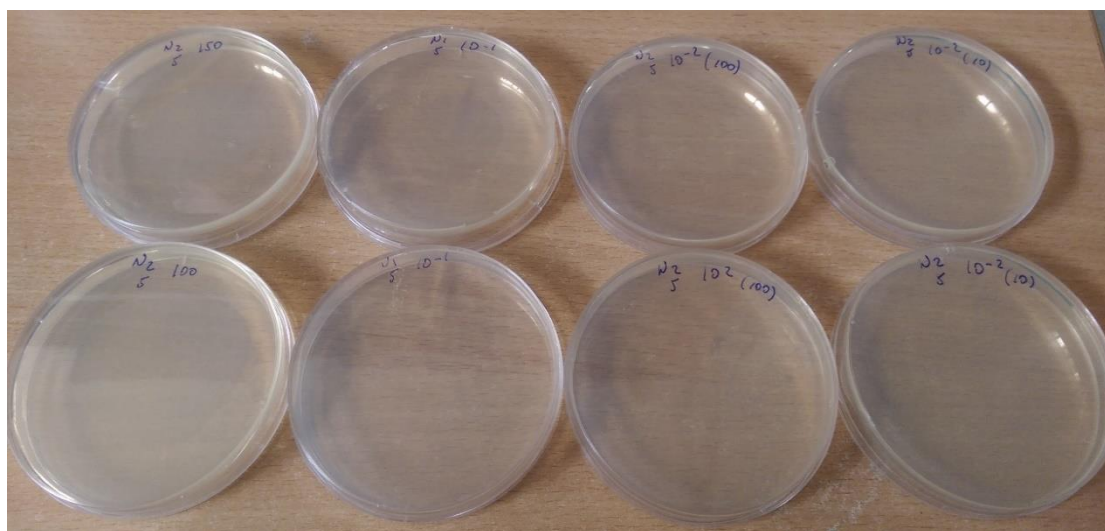


Figura 74. Placas después de la incubación a 37°C por 48 h para el control 2 de la bacteria *Enterococcus faecalis*.

Las placas incubadas de la suspensión bacteriana tratada con el nanocompuesto $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$ después de la incubación de *Enterococcus faecalis*, se muestran en la Figura 75. Los análisis se realizaron a partir de dos muestras duplicadas del nanocompuesto (N1 y N2).



(a)



(b)

Figura 75. Placas después de la incubación a 37°C por 48 h de la bacteria *Enterococcus faecalis* tratada con nanocompuesto $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$; (a) y (b) son las dos repeticiones.

En la Tabla 20 se muestra los resultados del conteo de colonias del control 1 y 2 para *Enterococcus faecalis*.

Tabla 20. Resultados del conteo de colonias para la bacteria *Enterococcus faecalis*.

| Muestra | Dilución | Conteo | Factor de dilución | UFC/ml | Promedio parcial UFC/ml | Promedio Final UFC/ml |
|-----------|----------|--------|--------------------|------------------|-------------------------|-----------------------|
| Control 1 | -4 | 432 | 100000 | 43×10^6 | 39×10^6 | 95×10^6 |
| | -4 | 351 | 100000 | 35×10^6 | | |
| | -5 | 135 | 1000000 | 14×10^7 | 15×10^7 | |
| | -5 | 156 | 1000000 | 16×10^7 | | |
| | -5 | 24 | 10000000 | - | - | |
| | -5 | 15 | 10000000 | - | | |
| Control 2 | -5 | 119 | 1000000 | 12×10^7 | 11×10^7 | 22×10^7 |
| | -5 | 96 | 1000000 | 96×10^6 | | |
| | -6 | 18 | 10000000 | - | 33×10^7 | |
| | -6 | 33 | 10000000 | 33×10^7 | | |
| | -6 | 0 | 100000000 | 0 | - | |
| | -6 | 5 | 100000000 | - | | |

En la Tabla 21 se muestra los resultados del conteo de colonias de las dos repeticiones del nanocompuesto Fe₃O₄/Ag con la bacteria *Enterococcus faecalis*.

Tabla 21. Resultados del conteo de colonia para el nanocompuesto de Fe₃O₄/Ag la bacteria *Enterococcus faecalis*.

| Muestra | µl agregados sin dilución | Dilución | Conteo | UFC/ml | Promedio |
|---------|---------------------------|----------|--------|--------|----------|
| N1 y N2 | 100 µl | - | 0 | 0 | 0 |
| | 150 µl | - | 0 | 0 | |
| | - | -1 | 0 | 0 | 0 |
| | - | -1 | 0 | 0 | |
| | - | -2 | 0 | 0 | |
| | - | -2 | 0 | 0 | |
| | - | -2 | 0 | 0 | |
| | - | -2 | 0 | 0 | |

Se observa que no hay formación de colonias, indicando la inhibición total del crecimiento de la bacteria Gram positiva *Enterococcus faecalis*. En este caso la incubación fue por 48 h debido al lento crecimiento de esta bacteria.

Cabe resaltar, las diferencias estructurales de los microorganismos utilizados en este estudio. *Enterobacter aerogenes*, es una Proteobacteria Gram negativa por lo que posee membrana externa y una pared celular delgada, en cambio *Enterococcus faecalis*, es una bacteria del Filo Firmicutes Gram positivo por lo que posee una pared celular muy gruesa que podría otorgar una resistencia estructural a este microorganismo. Sin embargo, los microorganismos en general poseen varios mecanismos de defensa frente a la acción tóxica de los metales [112]. En la presente investigación ambas bacterias mostraron sensibilidad al tratamiento con el nanocompuesto de Fe₃O₄/Ag lo que hace pensar en su utilidad para el control de la mayoría de microorganismos que pueden afectar al humano y otros animales, así como su uso en tratamiento de aguas contaminadas con microorganismos.

CONCLUSIONES

- Se sintetizó las nanopartículas de magnetita por método sol gel, a partir de una solución de Fe (II), usando como surfactante al CTAB en medio básico a una temperatura de 80°C. Se comprobó la formación de la magnetita con las siguientes técnicas de caracterización:
 - La espectroscopia FTIR, donde se evidenció los enlaces Fe-O para los sitios tetraédricos (578 cm^{-1}) y octaédricos (459 cm^{-1}) de la magnetita.
 - La espectroscopia Raman, mostró señales características de la magnetita entre $200\text{-}800\text{ cm}^{-1}$.
 - La espectroscopia Mössbauer, corroboró la formación de magnetita con sus tres sextetos de $^{\text{Th}}\text{Fe}^{3+}$, $^{\text{Oh}}\text{Fe}^{3+}$ y $^{\text{Oh}}\text{Fe}^{2+}$ y una relación no estequiométrica de la magnetita (19.4% de Fe^{2+} y 80.6% de Fe^{3+}).
 - La difracción de rayos X, evidenció los planos de crecimiento de la magnetita, con un crecimiento preferencial del plano (311) y un diámetro de cristalita de 5.60 \AA .
 - Se obtuvo partículas esféricas un tamaño medio de 7.75 nm según la microscopía electrónica de barrido SEM y un porcentaje en masa de 65.28 % de Fe y 26.14 % de O relacionados a la magnetita mediante la espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (EDX).
- Se sintetizó el nanocompuesto de magnetita/plata ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$) a partir de la reducción química de los iones plata con glucosa como agente reductor y acomplejante PVP sobre la dispersión coloidal de nanopartículas de magnetita, caracterizándolas por, espectroscopia FTIR, espectroscopia Raman, espectroscopia Mössbauer, difracción de rayos X, espectroscopia UV-Visible, dispersión de luz dinámica, microscopía electrónica de barrido SEM y espectroscopia de energía dispersiva EDX.
 - La espectroscopia FTIR, evidenció los enlaces Fe-O para los sitios tetraédricos (578 cm^{-1}) y octaédricos (450 cm^{-1}) de la magnetita, indicando que la presencia de NPs-Ag no modificó la estructura de la MNPs de magnetita.

- La espectroscopia Raman mostró señales características de la magnetita con un desplazamiento a menores números de onda con respecto a las MNPs de magnetita.
- La espectroscopia Mössbauer, corroboró los tres sextetos de $^{57}\text{Fe}^{3+}$, $^{57}\text{Fe}^{3+}$ y $^{57}\text{Fe}^{2+}$ y una relación no estequiométrica de la magnetita (18% de Fe^{2+} y 82% de Fe^{3+}). Esta relación fue menor ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}=0.22$) que la de la magnetita ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}=0.24$) indicando cualitativamente una pérdida del magnetismo en el nanocompuesto por la mayor cantidad de Fe^{3+} en la estructura.
- La difracción de rayos X, indicó los planos de crecimiento de la magnetita y la plata, con un crecimiento preferencial del plano (311) para las MNPs de magnetita y (111) para las NPs-Ag. Los diámetros de cristalita para las MNPs de magnetita resultó 4.85 Å y 3.97 Å para las NPs-Ag.
- Se determinó el tamaño hidrodinámico del nanocompuesto resultando 77.9 nm y una polidispersidad de 30.2 %. El nanocompuesto presentó un leve crecimiento después de dos y cinco días con diámetros de 80.6 y 85.3 nm, respectivamente y una polidispersidad similar para los tres casos. Por lo tanto, el nanocompuesto se mantiene estable.
- Se obtuvo partículas esféricas y dispersas con un tamaño medio de 10.13 nm según la microscopía electrónica de barrido SEM y un porcentaje en masa de 58.2 % de Fe, 27.3 % de O y 11.7% de Ag relacionados a la magnetita y la plata caracterizados la espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (EDX).
- La espectrofotometría UV-Visible evidenció el pico del plasmón resonante de las NPs-Ag (420 nm) en las nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$ -GLUC y se constató que la glucosa actúa como agente reductor y que el PVP funciona como dispersante, ya que no se observó ninguna banda de absorción del plasmón resonante de las NPs-Ag cuando se intentó realizar la reducción de los iones plata con solo PVP.
- Se comprobó la actividad antibacteriana del nanocompuesto de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$ frente a la bacteria Gram negativa *Enterobacter aerogenes* y la bacteria Gram positiva *Enterococcus faecalis* usando un método estándar ASTM modificado. La inhibición del crecimiento de ambas bacterias fue total (100%), frente al tratamiento con el nanocompuesto de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$, demostrando su potencial aplicación en tratamientos de aguas contaminadas, ya que estas bacterias son excelentes indicadores de contaminación fecal.

SUGERENCIAS

- Realizar medidas de curva de magnetización para estudiar el comportamiento magnético de la magnetita y del nanocompuesto sintetizado.
- Realizar la caracterización con microscopio electrónico de transmisión TEM de la magnetita y del nanocompuesto para tener información sobre el tamaño y la distribución de las NPs-Ag sobre las MNPs de magnetita.
- Comprobar la actividad antimicrobiana del nanocompuesto en muestras de aguas contaminadas.
- Comprobar la actividad antimicrobiana del nanocompuesto contra otros microorganismos patógenos.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Mazo, J., Una mirada al estudio y las aplicaciones tecnológicas y biomédicas de la magnetita. *Revista EIA*, 16, (2011), 207-223.
- [2] Shrivastava, S.; Bera, T.; Roy, A.; Singh, G.; Ramachandrarao, P.; Dash, D., Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 18, (2007), 225103.
- [3] Vergés, M.A.; Costo, R.; Roca, A.G.; Marco, J.F.; Goya, G.F., Uniform and water stable magnetite nanoparticles with diameters around the monodomain–multidomain limit. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 41, (2008), 134003.
- [4] Kim, D.; Mikhaylova, M.; Zhang, Y.; Muhammed M., Protective coating of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Chem. Mater.*, 15, (2003), 1617-1627.
- [5] Theamdee, P.; Rutnakornpituk, B.; Wichai, U.; Nakkuntod, M.; Rutnakornpituk, M., Recyclable silver–magnetite nanocomposite for antibacterial application. *J. Ind. Eng. Chem.*, 29, (2015), 63-70.
- [6] Frey, N; Peng, S; Cheng, K; Sun, S., Magnetic nanoparticles: Synthesis, functionalization and applications in bioimaging and magnetic energy storage. *Chem. Soc. Rev.*, 38 (2009), 2532.
- [7] Allafchian, A; Jalali,S., Synthesis, characterization and antibacterial effect of poly(acrylonitrile/maleic acid)-silver nanocomposite. *J. Taiwan Inst. Chem. E.*, 57, (2015) 154-159.
- [8] Jalali, S.A.H.; Allafchian, A.R., Assessment of antibacterial properties of novel silver nanocomposite. *J. Taiwan. Inst. Chem. E.*, 59, (2016), 506–513.
- [9] Fang, W; Zheng, J; Chen, Ch; Zhang, H; Lu, Y; Ma, L; Chen, G., One-pot synthesis of porous Fe₃O₄ shell/silver core nanocomposites used as recyclable magnetic antibacterial agents. *J. Magn. Magn. Matter.*, 357, (2014), 1-6.
- [10] WHO. Guidelines for Drinking-Water Quality; World Health Organization, 4th Ed. Geneva, (2011), 415.
- [11] Drake, P.L; Hazelwood, K.L., Exposure-related health effects of silver and silver compounds: A review. *Amm. Occup. Hyg.*, 49, (2005), 575-585.
- [12] Chudasama, B; Vala, A; Andhariya, N; Upadhyay, R.V; Mehta, R.V., Enhanced antibacterial activity of bifunctional Fe₃O₄–Ag core–shell nanostructures. *Nano Res.*, 2, (2009), 955- 965.
- [13] Joshi, M; Pant, H; Liao, N; Kim,J; Kim,H; Park, Ch; Kim, Ch., In-situ deposition of silver_iron oxide nanoparticles on the surface of fly ash for water purification. *J. Colloid. Interf. Sci.*, 453, (2015), 159-168.

- [14] Bao, J.; Chen, W.; Liu, T.; Zhu, Y.; Jin, P.; Wang, L.; Liu, J.; Wei, Y.; Li, Y. Bifunctional Au-Fe₃O₄ nanoparticles for protein separation. *ACS Nano*, 1(4), (2007), 293-298.
- [15] Zhang, D.-H.; Li, G.-D.; Li, J.-X.; Chen, J.-S., One-pot synthesis de Ag-Fe₃O₄ nanocomppsite: a magnetically recyclable and efficient catalyst for epoxidation of styrene. *Chem. Commun.*, 29, (2008), 3414-3416.
- [16] Zhu, S.; Fan, C.; Wang, J.; He, J.; Liang, E.; Chao, M., Realization of high sensitive SERS substrates with one-pot fabrication of Ag-Fe₃O₄ nanocomposites. *J. Colloid. Interf. Sci.*, 438, (2015), 116-121.
- [17] Chen, J.; Liu, Y.; Zhu, G.; Yuan, A., Ag@Fe₃O₄ nanowire: Fabrication, characterization and peroxidase-like activity. *Cryst. Res. Technol.*, 49, (2014), 309-314.
- [18] Lopes, G.; Vargas, J.M.; Sharma, S.K.; Béron, F.; Pirota, K.R.; Knobel, M.; Rettori, C.; Zysler, R.D., Ag-Fe₃O₄ Dimer colloidal nanoparticles: Synthesis and enhancement of magnetic properties. *J. Phys. Chem. C*, 114, (2010), 10148-10152.
- [19] Nguyen, N.T.; Tran, D.L.; Nguyen, D.C.; Nguyen, T.L.; Ba, T.C.; Nguyen, B.H.; Ba, T.D.; Pham, N.H. et al., Facile synthesis of multifunctional Ag/Fe₃O₄-CS nanocomposites for antibacterial and hyperthermic applications. *Curr. Appl. Phys.* 15 (2015) 1482-1487.
- [20] Brollo, M.E.F.; Orozco-Henao, J.M.; López-Ruiz, R.; Muraca, D.; Dias, C.S.B.; Pirota, K.R.; Knobel, M., Magnetic hyperthermia in brick-like Ag@Fe₃O₄ core-shell nanoparticles *J. Magn. Magn. Matter.*, 397,(2016),20–27.
- [21] Lee, B.; Koo, S., Silver reduction on the surface of magnetite nanoparticles using a coupling agent. *J.Ind. Eng.Chem.*, 18, (2012), 1191–1195.
- [22] Xia, H.; Cui, B.; Zhou, J.; Zhang, L.; Zhang, J.; Guo, X.; Guo, H., Synthesis and characterization of Fe₃O₄@C@Ag nanocomposites and their antibacterial performance. *Appl. Surf. Sci.*, 257, (2011), 9397– 9402.
- [23] Chudasama, B.; Vala, A.K.; Andhariya, N.; Upadhyay, R.V.; Mehta, R.V. Antifungal activity of multifunctional Fe₃O₄-Ag nanocolloids. *J. Magn. Magn. Mater.*, 323, (2011), 1233–1237.
- [24] Liu, X.-M.; Li, Y.S., One-step facile fabrication of Ag/gamma-Fe₂O₃ composite microspheres. *Mater. Sci. Eng. C*, 29 (4), (2009), 1128-1132.
- [25] Chen, M.; Kim, Y.-N.; Lee, H.-M.; Li, C., Cho, S.-O., Multifunctional magnetic silver nanoshells with sandwich like nanostructures. *J. Phys. Chem. C*, 112, (2008), 8870-8874.
- [26] Ivashchenko, O.; Lewandowski, M.; Peplińska, B.; Jarek, M.; Nowaczyk, G.; Wiesner, M. et.al., Synthesis and characterization of magnetite/silver/antibiotic nanocomposites for targeted antimicrobial therapy. *Mater. Sci. Eng. C*, 55, (2015), 343–359.
- [27] Amarjargal, A.; Tijing, L.; Im, I.-T.; Kim, C., Simultaneous preparation of Ag/Fe₃O₄ core-shell nanocomposites with enhanced magnetic moment and strong antibacterial and catalytic properties. *Chem. Eng. J.*, 226, (2013), 243–254.

- [28] Mahmoudi, M.; Serpooshan, V., Silver-coated engineered magnetic nanoparticles are promising for the success in the fight against antibacterial resistance threat. *ACS Nano*, 6, (2012), 2656-2664.
- [29] Mosaiab, T; Jeong, C; Shin, G; Choi, K; Lee, S; Lee, I; In, I; Park, S., Recyclable and stable silver deposited magnetic nanoparticles with poly (vinyl pyrrolidone) catechol coated iron oxide for antimicrobial activity. *Mater. Sci. Eng. C*, 33, (2013), 3786-3794.
- [30] Sureshkumar, M; Siswanto, D; Lee, C., Magnetic antimicrobial nanocomposite based on bacterial cellulose and silver nanoparticles. *J. Mater. Chem.*, 20, (2010), 6948.
- [31] Pucek, R.; Tuček, J.; Kilianová, M.; Panáček, A.; Kvítek, L.; Filip, J.; Kolář, M.; Tománková, K.; Zbořil, R., The targeted antibacterial and antifungal properties of magnetic nanocomposite of iron oxide and silver nanoparticles. *Biomaterials*, 32, (2011), 4704-4713.
- [32] Faraji, M; Yamini, Y.; Tahmasebi, E.; Saleh, A.; Nourmohammadian, F., Cetyltrimethylammonium bromide-coated magnetite nanoparticles as highly efficient adsorbent for rapid removal of reactive dyes from the textile companies wastewaters. *J. Iran. Chem. Soc.*, 7 (1), (2010), S130-S144.
- [33] Haijun Yu, H.; Xu, X, Chen, Lu, T.; Zhang, P.; Jing, X., Preparation and antibacterial effects of PVA-PVP hydrogels containing silver nanoparticles. *J Appl Polym Sci.*, 103, (2007), 125–133.
- [34] Chou, K.-S.; Lai, Y.-S., Effect of polyvinyl pyrrolidone molecular weights on the formation of nanosized silver colloids. *Materials Chemistry and Physics* 83 (2004) 82–88.
- [35] World Health Organization 2016. Preventing disease through healthy environments: A global assessment of the burden of disease from environmental risks. [En Internet] Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204585/1/9789241565196_eng.pdf Consultado el 10.10.16.
- [36] Marchand, E. Microorganismos indicadores de la calidad del agua de consumo humano en Lima Metropolitana. Tesis para el grado de Biólogo con mención en Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, (2002).
- [37] Pierre, C. Introduction to sol-gel processing, Kluwer Academic Publisher, United States of America, (1998).
- [38] Jolivet, J.; Henry, M., Livage, J., Metal oxide chemistry and synthesis. John Wiley and Sons, Inglaterra, (2000).
- [39] Livage, J.; Henry, M.; Sanchez, C., Sol-gel chemistry of transition metal oxides, *Prog. Solid St. Chem.*, 18, (1988), 259-341.
- [40] Regazzoni, A.; Aldabe, S.; Candal, R.; Hernández, C. ‘Escuela de Síntesis de Materiales Avanzados: proceso sol-gel’, Perú, 2007.
- [41] Faraji, M; Yamini, Y.; Rezaee, M., Magnetic nanoparticles: Synthesis, stabilization, functionalization, characterization, and applications. *J. Iran. Chem. Soc.*, 7 (1), (2010), 1-37.

- [42] Kluchova, K.; Zboril, R.; Tucek, J.; Pecova, M.; Zaconcova, L.; Safarik, I .et. al., Superparamagnetic maghemite nanoparticles from solid-state synthesis – Their functionalization towards peroral MRI contrast agent and magnetic carrier for trypsin immobilization. *Biomater.*, 30, (2009), 2855- 2863.
- [43] Umut, E., *Modern Surface Engineering Treatments*. Mahmood Aliofkhaezrai, Intech, (2013), 198.
- [44] Gupta, A; Gupta M., Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomater.*, 26, (2005), 3995–4021.
- [45] Berry, C.C., Curtis, A.S.G., Functionalization of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 36, (2003), R198–206.
- [46] Wu, W.; He, Q; Jiang, C. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and surface functionalization strategies. *Nanoscale Res. Lett.*, 3, (2008), 398,404.
- [47] Lu, A.-H.; Salabas, E. L.; Schüth, F., Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization and application. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 46, (2007), 1222 – 1244.
- [48] Alves, C.; Martins, M.; Ingle, A.; Gupta, I.; Galdiero, E. et al., Silver Nanoparticles: Therapeutical Uses, Toxicity, and Safety Issues. *J. Pharm. Sci.*, 103, (2014), 1931–1944.
- [49] Jalali, S.A.H.; Allafchian, A.R., Assessment of antibacterial properties of novel silver nanocomposite. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, 000, (2015), 1–8.
- [50] Marambio-Jones, C.; Hoek, E.M.V., A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *J. Nanopart. Res.*, 12, (2010), 1531–1551.
- [51] Wang, H.; Qiao, X.; Chen, J.; Ding, S., Mechanisms of PVP in the preparation of silver nanoparticles, *Materials Chemistry and Physics* 94, (2005), 449–453.
- [52] Shameli, K.; Ahmad, M.B.; Jazayeri, S.D.; Sedaghat, S.; Shabanzadeh, P.; Jahangirian, H.; Mahdavi, M.; Abdollahi, Y., Synthesis and Characterization of Polyethylene Glycol Mediated Silver Nanoparticles by the Green Method. *Int. J. Mol. Sci.*, 13, (2012), 6639-6650.
- [53] Jacob, J.A.; Kapoor, S.; Biswas, N.; Mukherjee, T., Size tunable synthesis of silver nanoparticles in water–ethylene glycol mixtures. *Colloids Surf., A: Physicochem. Eng. Aspects*, 301, (2007) 329–334.
- [54] Sun, Y.; Yin, Y.; Mayers B.T.; Herricks, T.; Xia, Y., Uniform silver nanowires synthesis by reducing AgNO₃ with ethylene glycol in the presence of seeds and poly(vinyl pyrrolidone). *Chem. Mater.*, 14, (2002), 4736-4745.
- [55] Luo, C.; Zhang, Y.; Zeng, X.; Zeng, Y.; Wang, Y., The role of poly(ethylene glycol) in the formation of silver nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.*, 288, (2005) 444–448.
- [56] Pillai, Z.S.; Kamat, P.V., What factors control the size and shape of silver nanoparticles in the citrate ion reduction method?. *J. Phys. Chem. B*, 108, (2004), 945-951.

- [57] Martínez-Castañón, G.A.; Niño Martínez, N.; Martínez-Gutierrez, F.; Martínez-Mendoza, J.R. Ruiz, F., Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. *J. Nanopart. Res.*, 10, (2008), 1343–1348.
- [58] Panáček, A.; Kolář, M.; Večeřová, R.; Pucek, R.; Soukupová, J.; Kryštof, V.; Hamal, P.; Zbořil, R.; Kvítek, L., Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomater.*, 30, (2009), 6333-6340.
- [59] Reidy, B.; Haase, A.; Luch, A.; Dawson, K.; Lynch, I., Mechanisms of silver nanoparticle Release, transformation and toxicity: A critical review of current knowledge and recommendations for future studies and applications. *Materials*, 6, (2013), 2295-2350.
- [60] Li, Q.; 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 Res.*, 42, (2008), 4593–4594.
- [61] Cao, H.; Liu, X.; Meng, F.; Chu, P.K., Biological actions of silver nanoparticles embedded in titanium controlled by micro-galvanic effects. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 2, (2010), 670–684.
- [62] Lee, Y.J.; Kim, J.; Oh, J.; Bae, S.; Lee, S.; Hong, I.S.; Kim, S.H., Ion-release kinetics and ecotoxicity effects of silver nanoparticles. *Environ. Toxicol. Chem.*, 31, (2012), 155–159.
- [63] Samberg, M.E.; Orndorff, P.E.; Monteiro-Riviere, N.A., Antibacterial efficacy of silver nanoparticles of different sizes, surface conditions and synthesis methods. *Nanotoxicology*, 5, (2011), 244–253.
- [64] Wong, K.K.Y.; Liu, X., Silver nanoparticles—the real “silver bullet” in clinical medicine?. *Med. Chem. Commun*, 1, (2010), 125–131.
- [65] Pal, S.; Tak, Y.K.; Song, J.M., Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microb.*, 73, (2007), 1712–1720.
- [66] Diversidad Microbiana- Tipos de Microorganismos. *Microbiología*. [En Internet] Disponible en: http://datateca.unad.edu.co/contenidos/201504/micro/bact_clasif.htm Consultado el 30.12.16.
- [67] Generalidades de bacterias. [En Internet] Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/generalidades.html> Consultado el 30.12.16.
- [68] La Batalla de los microorganismos. [En Internet] Disponible en: <http://microbiologiaujap2012.blogspot.pe/2012/03/la-tincion-de-gram-normal-0-21-false.html> Consultado el 30.12.16.
- [69] Chandra Parija, S.C. *Textbook of Microbiology and Immunology*, 2nd Edition. Elsevier, (2012).
- [70] Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Parker, J., *Brock Biología de los microorganismos*, 10. Ed., Pearson, Madrid, (2003).

- [71] Allen, M. La importancia para la salud pública de los indicadores bacterianos que se encuentran en el agua potable. Reunión sobre la calidad del agua potable. CEIPS.OPS.OMS. Lima, Perú, (1996).
- [72] Cabelli, V.J.; Dufour, A.P.; Levin, M.A.; McCabe, L.J.; Hberman, P.W. The impact of pollution on marine bathing beaches. An epidemiological study. *Linnology and Oceanography, Special Symp*, (2), (1975), 424.
- [73] Vergaray, G.; Méndez, C.R.; Morante, H.Y.; Heredia, V.I.; Béjar, V.R. *Enterococcus* y *Escherichia coli* como indicadores de contaminación fecal en playas costeras de Lima. *Revista del Instituto de Investigación de la Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica*, 10, (20), (2007), 6-82.
- [74] Flores, J.; Suárez, G.; Franco, M.; Heredia, M.; Vivas, M. Calidad bacteriológica del agua potable de la ciudad de Mérida, México. *Salud Pública de México*, 37(3), (1995), 236-239.
- [75] Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A., *Principios de análisis instrumental*. Sexta edición, Cengage Learning Editores, México D.F, (2008), 1-1047.
- [76] Resonancia del plasmón de la superficie (RPS); propiedades optoelectrónicas. Nuevas tecnologías y materiales. [En Internet] Disponible en: <http://nuevatecnologiasymateriales.com/resonancia-del-plasmon-de-la-superficie-rps-propiedades-optoelectronicas/> Consultado el 30.12.16.
- [77] Stuart, B., *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and applications*, Sydney, John Wiley & Sons. Lt., (2004), 18-19.
- [78] Ferraro, J.R., Nakamoto, K, Brown, C.W., *Introductory Raman Spectroscopy*. Second edition, Academic Press, Amsterdam, (2003), 1-434.
- [79] Raman spectroscopy. [En internet] Disponible en: <http://www.sciencefacts.net/raman-spectroscopy.html> Consultado el 20.10.16.
- [80] Sorescu, M., Introducción a la Espectroscopía Mössbauer. *J. Mater. Educ.*, 25, (4-6), (2003), 145-154.
- [81] Stanjek, H.; Häusler, W., *Basics of X-ray Diffraction, Hyperfine Interact.*, 154, (2004), 109–110.
- [82] *Instruction Manual for 90Plus/BI-MAS Multi Angle Particle Sizing Option Sizing Option*. Brookhaven Instruments Corporation, (1995), 30-31.
- [83] Cuadros, A.; Casañas, R.; San Martín, E.; Yañes, J., *Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas* *Lat. Am. J. Phys. Educ.*, 8, (4), (2014), 4314-1.
- [84] Zhou, W.; Wang, Z. L., *Scanning microscopy for nanotechnology: Techniques and applications*, In W. Zhou & Z.L. Wang (Eds), New York, (2007), NY: Springer. ISBN 9780387333250.

- [85] Rivas, M., Introducción a las técnicas microscópicas- Microanálisis de rayos X en microscopía electrónica de barrido (SEM). Unidad de Microscopía electrónica, Universidad de Santiago de Compostela, (2008).
- [86] Friel, J. F., X-ray and Image Analysis in Electron Microscopy, Princeton Gamma-Tech., United States of America, (2003), 9-10.
- [87] Microscopia electrónica de barrido con detector EDS (SEM-EDS)- Fundamentos teóricos, Laboratorio de análisis de suelos de la Universidad Andrés Bello. [En internet] Disponible en:
<http://quimica.unab.cl/laboratorio-de-analisis-de-solidos-las/informacion/fundamentos-teoricos/microscopia-electronica-de-barrido-con-detector-eds-sem-eds/> Consultado el 15.04.16.
- [88] Hafner, B., Energy Dispersive Spectroscopy on the SEM: A Primer, Characterization Facility, University of Minnesota. [En internet] Disponible en:
http://www.charfac.umn.edu/instruments/eds_on_sem_primer.pdf Consultado el 15.04.16
- [89] Hui, C.; Shen, C.; Yang, T.; Bao, L.; Tian, J.; Ding, H.; Li, C.; Gao, H. J., Large-scale Fe₃O₄ nanoparticles soluble in water synthesized by a facile method, J. Phys. Chem. C, 112, (2008), 11336–11339.
- [90] Wang, H.; Qiao, X.; Chen, J.; Ding, S., Preparation of silver nanoparticles by chemical reduction method, Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects, 256, (2005), 111–115.
- [91] Sugimoto, T.; Matijevic, E., Formation of uniform spherical magnetite particles by crystallization from ferrous hydroxide gels. J. Colloid Interf. Sci., 74 (1), (1980), 227–243.
- [92] Garcell, L.; Morales, M. P., Vergés, M., Tartaj, P.; Serna, C. J., Interfacial and Rheological Characteristics of Maghemite Aqueous Suspensions. J. Colloid Interface Sci., 205, (1998), 470-475.
- [93] Tahmasebi, E.; Yamini, Y., Facile synthesis of new nano sorbent for magnetic solid-phase extraction by self assembling of bis-(2,4,4-trimethyl pentyl)-dithiophosphinic acid on Fe₃O₄@Ag core@shell nanoparticles: Characterization and application, Analytica Chimica Acta 756, (2012), 13– 22.
- [94] Viana, R.B.; B.F da Silva, A.; Pimentel, A.S., Infrared spectroscopy of anionic, cationic, and zwitterionic surfactants. Adv. Phys. Chem., (2012), 1-14.
- [95] Chacón, Z.; Lavarde, D., Interacción de bromuro cetiltrimetilamonio con los sitios superficiales activos de la caolinita durante la flotación. Dyna, 75(154), (2007), 73-80.
- [96] Cortés, M. S.; Montemayor, S. M.; Osuna-Alarcón, J. G.; Fuentes, A.F. Estudio y preparación de CoFe₂O₄ por la técnica de electrospinning. Afinidad LXX, 563, (2013), 195-200.
- [97] Franco, P.Q.; Silva, J.C.; Borges, J.P., Produção de fibras de hidroxiapatite porelectrofição. Ciência & Tecnologia dos Materiais, 22, (1/2), (2010), 57-64.

- [98] Vandenberghe, R.E.; Barrero, C.A, Da Costac, G.M.; Van San, E.; De Grave, E., Mössbauer characterization of iron oxides and (oxy)hydroxides: the present state of the art. *Hyperfine Interact.*, 126, (2000), 247–259.
- [99] Coey, J.M.D.; Morrish, A.H.; Zawatzky, G.A., A Mössbauer study of conduction in magnetite. *J. Phys. Colloq.*, 1971, 32 (C1), C1-271-C1-273.
- [100] Gorski, C.A., Redox behavior of magnetite in the environment: moving towards a semiconductor model. Thesis for the Doctor of Philosophy degree in Civil and Environmental Engineering, University of Iowa, (2009).
- [101] Murugappan, K.; Silvester, D.S.; Chaudhary, D.; Arrigan, D. W. M., Electrochemical characterization of an oleyl-coated magnetite nanoparticle-modified electrode. *ChemElectroChem*, 1, (2014), 1211 – 1218.
- [102] Shebanova, O.N., Lazor, P., Raman spectroscopic study of magnetite (FeFe₂O₄): a new assignment for the vibrational spectrum. *J. Solid State Chem.*, 174, (2003), 424–430.
- [103] Kumar, P.R.; Jung, Y.H.; Bharathi, K.K.; Lim, C.H.; Kim, D.K., High capacity and low cost spinel Fe₃O₄ for the Na-ion battery negative electrode materials. *Electrochim. Acta*, 146, (2014), 503–510.
- [104] Raman spectroscopy for nanomaterials characterization. Challa S.S.R. Kumar, Berlin, (2012) Springer. ISBN 9783642206191, 645 p.
- [105] Legodi, M.A.; De Waal, D., The preparation of magnetite, goethite, hematite and maghemite of pigment quality from mill scale iron waste. *Dyes Pigm.*, 74, (2007), 161-168.
- [106] Uysal, M.; Akbulut, H.; Tokur, M.; Algül, H.; Çetinkaya, T., Structural and sliding wear properties of Ag/Graphene/WC hybrid nanocomposites produced by electroless co-deposition. *J. Alloy. Compd.*, 654, (2016), 185-195.
- [107] Biswas, N.; Kapoor, S.; Mahal, H.S.; Mukherjee, T., Adsorption of CGA on colloidal silver particles: DFT and SERS study. *Chem. Phys. Lett.*, 444, (2007), 338–345.
- [108] Kora, A.J.; Arunachalam, J., Green fabrication of silver nanoparticles by GumTragacanth (*Astragalus gummifer*): A dual functional reductant and stabilizer. *J.Nanomater.*, 2012, (2012), Article ID 869765, 8 p.
- [109] Manivasagan, P.; Venkatesan, J.; Senthilkumar, K.; Sivakumar, K.; Kim, S.-K., Biosynthesis, antimicrobial and cytotoxic effect of silver nanoparticles using a novel *Nocardia* sp. MBRC-1. *BioMed. Res. Int.*, (2013), 1-9.
- [110] Geethalakshmi, R.; Sarada, D.V.L., Characterization and antimicrobial activity of gold and silver nanoparticles synthesized using saponin isolated from *Trianthemadecandra* L. *Ind. Crop. Prod.*, 51, (2013), 107– 115.
- [111] Panáček, A.; Kvítek, L.; Pucek, R.; Kolář, M.; Večeřová, R.; Pizúrová, N.; Sharma, V.K.; Nevěčná, T.; Zbořil, R., Silver colloid nanoparticles: Synthesis, characterization, and their antibacterial activity, *J. Phys. Chem. B*, 110, (2006), 16248-16253.

[112] Valls, M.; De Lorenzo, V., Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiol. Rev.*, 26, (2002), 327-338