



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN METALURGIA Y MATERIALES

**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN METALURGIA Y
CIENCIAS DE LOS MATERIALES**

**“Síntesis de óxido de grafeno reducido decorado con nanopartículas
de Ag y Cu₂O para aplicaciones antibacteriales”**

**Tesis que para obtener el Grado de
Maestra en Metalurgia y Ciencias de los Materiales presenta:**

IBQ. ANABEL HERRERA RODRÍGUEZ

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. GERARDO ANTONIO ROSAS TREJO

CO-DIRECTOR:

Dr. JUAN CARLOS GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Morelia, Michoacán, México; Enero, 2021

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación lo dedicó a Dios y a mi familia, por darme la vida y brindarme todo su apoyo en los malos y buenos momentos para culminar con éxito esta etapa de mi carrera profesional.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer, primero que nada, a Dios, quien me ha dado la vida y me ha guiado para ser la persona que soy y estar en el lugar que estoy.

Agradezco a mis padres, Hilda Rodríguez Campos y Abel Herrera Hernández, quienes con su ejemplo me han impulsado a superarme cada día y me han apoyado incondicionalmente para poder culminar con éxito esta etapa de mi vida.

A mi hermano Osvaldo Herrera Rodríguez, por ser un ejemplo de vida, siempre junto a mí, que con sus ocurrencias y apoyo me impulsa a seguir adelante siempre.

A mi novio Hugo Eduardo Vega Ayala, por entenderme y apoyarme en todas decisiones que he tomado, además de brindarme su amor y cariño en todo momento.

A mi asesor Dr. Gerardo Antonio Rosas Trejo y coasesor Dr. Juan Carlos González Hernández, por guiarme en este arduo trabajo y compartir sus conocimientos en cada una de sus áreas de trabajo.

Al Comité Tutoral Dr. Ariosto Medina Flores, Dr. Ignacio Mejía Grandados, Dra. Tzarara López Luque y Dr. Juan Zarate Medina, por colaborar en la revisión de este proyecto.

Al Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por abrirme sus puertas y proporcionarme los equipos necesarios para llevar a cabo esta investigación.

Al Laboratorio de Bioquímica del Tecnológico Nacional de México, Campus Morelia, por permitirme realizar diversos experimentos referentes al área biológica.

A mis compañeros de Laboratorio, por su invaluable apoyo cada día de trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico para realizar este trabajo de investigación.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
ÍNDICE.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
GLOSARIO DE TÉRMINOS	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT	xiv
CAPÍTULO 1 . INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Justificación.....	2
1.2 Hipótesis	3
1.3 Objetivo general	3
1.4 Objetivos específicos.....	4
CAPÍTULO 2 . REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Nanotecnología.....	5
2.2 Nanomateriales y su clasificación	5
2.3 Nanopartículas.....	6
2.3.1 Métodos de síntesis de nanopartículas de nanopartículas	6
2.3.1.1 Nucleación y crecimiento de nanopartículas	7
2.3.2 Síntesis verde.....	9
2.3.2.1 Extractos de plantas medicinales.....	9
2.3.2.1.1 <i>Cuphea aequipetala</i> (hierba del cáncer).....	10
2.3.2.1.2 <i>Haematoxylum brasiletto</i> (palo de brasil)	10
2.3.2.1.3 <i>Tamarix gallica</i> (taray).....	11
2.3.3 Síntesis híbrida (verde y química).....	11
2.4 Grafeno	12
2.4.1 Métodos de obtención.....	12
2.4.2 Exfoliación oxidativa y reducción.....	13
2.4.3 Nanocompuestos de grafeno.....	14
2.5 Aplicaciones biológicas.....	15

2.5.1 Agentes antibacteriales	15
2.5.2 Microorganismos patógenos.....	16
2.6 Antecedentes.....	18
2.6.1 Reducción de óxido de grafeno con extractos de plantas	18
2.6.2 Síntesis y actividad antibacterial de nanocompuestos	24
2.6.2.1 Ag/rGO	24
2.6.2.2 Cu ₂ O/rGO	26
2.6.2.3 Ag/Cu ₂ O/rGO	28
CAPÍTULO 3 . METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	34
3.1 Reactivos utilizados para las diferentes etapas del proyecto.....	35
3.2 Primera etapa: Preselección de la planta	35
3.2.1 Preselección, adquisición y molienda de la planta	36
3.2.2 Preparación de extractos.....	36
3.2.3 Determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH.....	36
3.2.4 Determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.....	37
3.3 Segunda etapa: Obtención del óxido de grafeno	38
3.3.1 Obtención de óxido de grafito	38
3.3.2 Exfoliación del óxido de grafito para obtener óxido de grafeno (GO).....	39
3.4 Tercera etapa: Biosíntesis del nanocompuesto Ag/rGO.....	39
3.4.1 <i>Cuphea aequipetala</i> (hierba del cáncer).....	39
3.4.2 <i>Haematoxylum brasiletto</i> (palo de brasil)	40
3.4.2.1 Eliminación del cloro.....	40
3.4.3 <i>Tamarix gallica</i> (taray).....	40
3.5 Cuarta etapa: Síntesis híbrida del nanocompuesto Cu ₂ O/rGO	41
3.6 Caracterización de los nanomateriales	41
3.7 Quinta etapa: Estimación de la concentración de NPs por espectrofotometría de AA ..	43
3.7.1 AgNPs.....	43
3.7.2 Cu ₂ ONPs.....	44
3.8 Sexta etapa: Rendimiento de síntesis por peso seco.....	45
3.9 Séptima etapa: Evaluación antibacterial.....	46
CAPÍTULO 4 . RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47

4.1 Pruebas fitoquímicas de las plantas	47
4.1.1 Determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH.....	47
4.1.2 Determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.....	47
4.2 Obtención de óxido de grafeno.....	49
4.3 Biosíntesis del nanocompuesto Ag/rGO.....	57
4.3.1 <i>Cuphea aequipetala</i> (hierba del cáncer).....	58
4.3.2 <i>Haematoxylum brasiletto</i> (palo de brasil)	59
4.3.2.1 Eliminación del cloro del extracto.....	64
4.3.3 <i>Tamarix gallica</i> (taray).....	66
4.3.3.1 Variación de la relación volumétrica.....	70
4.4 Síntesis híbrida del nanocompuesto Cu ₂ O/rGO	75
4.5 Estimación de la concentración de NPs por espectrofotometría de absorción atómica (AA)	
.....	80
4.5.1 AgNPs.....	81
4.5.2 Cu ₂ ONPs.....	82
4.6 Rendimiento de síntesis por peso seco	83
4.7 Evaluación antibacterial	85
4.8 Sección de discusión del trabajo.....	88
CAPÍTULO 5 . CONCLUSIONES.....	91
5.1 Recomendaciones	92
5.2 Trabajo futuro	93
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1	Esquema de la síntesis de grafeno “de abajo-arriba” y “de arriba-abajo” [56].....	13
Figura 2.2	Las cuatro rutas más destacadas de acción antimicrobiana de las AgNPs [15].....	16
Figura 2.3	Espectro UV-Vis de GO (curva verde) y rGO (curva azul) [76].....	19
Figura 2.4	Patrón de DRX de (a) grafito, (b) rGO-12, (c) rGO-6 y (d) GO [77].....	20
Figura 2.5	Espectro FT-IR de (a) GO, (b) rGO-6 y (c) rGO-12 [77].....	20
Figura 2.6	Análisis MEB-EDS de (a) GO y (b) rGO [78].....	21
Figura 2.7	Imágenes de MFA en modo intermitente (tapping mode) y perfiles de altura de GO (a, GO, 2*2 μm^2), rGO en 1 g de Artemisina en etanol (b, E1, 1*1 μm^2) [79].....	22
Figura 2.8	(a) Espectro UV-Vis de (i) GO y (ii) Ag/rGO, (b) Espectro FT-IR de (i) GO y (ii) Ag/rGO, (c) Espectro Raman de (i) GO y (ii) Ag/rGO y (d) Patrón DRX del nanohíbrido Ag/rGO [82].....	25
Figura 2.9	Pérdida de la viabilidad celular de <i>E. coli</i> al ser incubada con GO y Ag-rGO [83].....	26
Figura 2.10	Espectro de absorción UV-Vis de GO, Cu ₂ ONPs y rGO-Cu ₂ O [84].....	27
Figura 2.11	(a) Patrón de DRX del grafito prístino (PG) y óxido de grafeno (GO) y (b) nanocomposito rGO-Cu ₂ O y Cu ₂ ONPs [84].....	27
Figura 2.12	Fotografías del método de difusión en agar contra (a) <i>Bacillus subtilis</i> y (b) <i>Escherichia coli</i> para rGO (1), Cu ₂ O/rGO (2), estándar (3) y control (4), y (c) zona de inhibición en mm contra las dos bacterias [85].....	28
Figura 2.13	Patrones de DRX de rGO, Cu ₂ O/rGO y Ag-Cu ₂ O/rGO [86].....	29
Figura 2.14	(A-C) Imágenes de MEB y MET del nanocompuesto Ag-Cu ₂ O/rGO y (D) Imagen HRTEM de Ag-Cu ₂ O/rGO que muestra las redes cristalinas de Ag y Cu ₂ O, el recuadro presenta el patrón SAED de Ag-Cu ₂ O/rGO [86].....	30
Figura 2.15	Imágenes de (A) nanocompuesto Ag-rGO y Ag@Cu ₂ O/rGO con diferentes concentraciones de solución de Cu(NO ₃) ₂ ((B-F) 2 mM, 4 mM, 6 mM, 8	

	mM y 10 mM). Las inserciones son las imágenes correspondientes de MET [87].	31
Figura 2.16	Espectro Raman de GO, Cu ₂ O/rGO y Ag-Cu ₂ O/rGO [88].	32
Figura 2.17	(a) Micrografía de MET del nanocomposito GO-Cu-AgNPs, (b) espectro EDS del nanocompuesto GO-Cu-AgNPs; insertado: indicando donde se realizó el análisis, (c) micrografía de MEB del nanocomposito de GO-Cu-AgNPs y (d) curvas de supervivencia de diferentes cepas bacterianas durante un periodo de 6 h empleando el nanocompuesto [89].	33
Figura 2.18	Micrografías de MET de (a) Cu, (b) Ag y (c) Cu-AgNPs. Curvas de supervivencia de diferentes cepas bacterianas durante un periodo de 6 h con (a1) Cu, (b1) Ag y (c1) Cu-AgNPs como agente antibacterial, respectivamente [89].	33
Figura 3.1	Diagrama por etapas (1ra. – 6ta.) de la metodología experimental.	34
Figura 3.2	Mecanismo de reacción del 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) con antioxidante. R: H = eliminador de radicales antioxidantes; R = radical antioxidante. [92].	37
Figura 4.1	Curva de calibración del ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales.	48
Figura 4.2	Mecanismo de síntesis del GO.	50
Figura 4.3	Espectros de UV-Vis de la exfoliación del óxido de grafito a diferentes tiempos.	50
Figura 4.4	Imágenes de MEB: a) grafito, b-c) GO (las flechas indican las capas) y d) análisis químico EDS del GO.	51
Figura 4.5	Micrografías de METB del GO.	52
Figura 4.6	Patrón de difracción de rayos-X de: a) carbón grafito y b) GO.	53
Figura 4.7	Espectros FT-IR de: a) carbón grafito y b) GO.	54
Figura 4.8	Medición de la densidad del GO. Masa del picnómetro: a) solo, b) lleno de agua, c) polvo de GO y d) GO y agua.	55
Figura 4.9	Histograma de la distribución de tamaño de partícula del GO.	57
Figura 4.10	Esquema general del mecanismo de biosíntesis del nanocompuesto Ag/rGO.	58

Figura 4.11	Espectros de UV-Vis correspondientes a la síntesis de AgNPs utilizando el extracto acuoso de <i>Cuphea aequipetala</i> (hierba del cáncer).....	59
Figura 4.12	Espectros de UV-Vis de la síntesis de AgNPs utilizando el extracto acuoso de <i>Haematoxylum brasiletto</i> (palo de brasil).....	60
Figura 4.13	Espectro de UV-Vis del nanocompuesto Ag/rGO sintetizado con <i>Haematoxylum brasiletto</i> (palo de brasil) en relación volumétrica 1:1 con AgNO ₃ 1 mM.....	61
Figura 4.14	Difractograma del nanocompuesto Ag/rGO sintetizado con <i>Haematoxylum brasiletto</i> (palo de brasil).....	62
Figura 4.15	Espectro de FT-IR del extracto acuoso de <i>Haematoxylum brasiletto</i> (palo de brasil).....	63
Figura 4.16	a), d) Primer y segundo tratamiento de lavados del palo de brasil, b), e) Mezcla del extracto acuoso de la planta con la sal, y c), f) cambios de color en la síntesis de AgNPs.....	64
Figura 4.17	Espectros de UV-Vis de la síntesis de AgNPs con los diferentes tratamientos de lavados.....	65
Figura 4.18	Difractogramas de la síntesis de AgNPs con los extractos lavados de <i>Haematoxylum brasiletto</i> (palo de brasil): a) lavado a4, b) lavado b1 y c) b2.....	66
Figura 4.19	a) Cambio de coloración en la síntesis del nanocompuesto Ag/rGO preparado con <i>Tamarix gallica</i> (taray) y b) espectro de UV-Vis.....	67
Figura 4.20	Difractograma del nanocompuesto Ag/rGO sintetizado con AgNO ₃ 5 mM con extracto acuoso de <i>Tamarix gallica</i> (taray).....	68
Figura 4.21	Micrografías obtenidas por MEB del nanocomposito Ag/rGO sintetizado en relación volumétrica 1:1:1 a diferentes ampliaciones: a) 10,000 X, b) 20,000 X, c) 40,000 X y d) 100,000 X.....	69
Figura 4.22	a-c) Micrografías de METB del nanocompuesto Ag/rGO sintetizado en relación volumétrica 1:1:1 con extracto acuoso de <i>Tamarix gallica</i> (taray) y d) análisis químico de Ag/rGO.....	69

Figura 4.23	Espectro de UV-Vis de la síntesis del nanocompuesto Ag/rGO con relaciones volumétricas 5:1:1 y 10:1:1 utilizando el extracto acuoso de <i>Tamarix gallica</i> (taray).....	70
Figura 4.24	Imágenes de MEB registradas con la técnica de LABE a 100,000 X correspondientes a la síntesis de nanocompuestos Ag/rGO a las diferentes relaciones volumétricas: a) 1:1:1, b) 5:1:1 y c) 10:1:1.....	71
Figura 4.25	Mapeo químico de los nanocompuestos sintetizados a diferentes relaciones volumétricas: a-c) 1:1:1, d-f) 5:1:1 y g-i) 10:1:1.....	72
Figura 4.26	Espectros de FT-IR de: a) nanocompuesto Ag/rGO sintetizado extracto acuoso de <i>Tamarix gallica</i> (taray) y b) GO.....	73
Figura 4.27	Espectro de FT-IR del extracto acuoso de <i>Tamarix gallica</i> (taray): a) antes de la bioreducción y b) después de la bioreducción.....	74
Figura 4.28	Esquema general del mecanismo de síntesis del nanocompuesto Cu ₂ O/rGO.....	76
Figura 4.29	Espectro de UV-Vis del nanocompuesto Cu ₂ O/rGO obtenido por síntesis híbrida.....	77
Figura 4.30	Micrografías de MEB registradas con la técnica de LABE del nanocomposito Cu ₂ O/rGO: a) 10,000 X, b) 20,000 X, c) 40,000 X, d) 100,000 X y, e) análisis químico EDS.....	78
Figura 4.31	Difractograma de nanocompuesto Cu ₂ O/rGO obtenido por síntesis híbrida.....	79
Figura 4.32	Espectros de FT-IR de: a) nanocompuesto Cu ₂ O/rGO y b) GO.....	80
Figura 4.33	Curva de calibración para la estimación de AgNPs.....	81
Figura 4.34	Curva de calibración para la estimación de Cu ₂ ONPs.....	82
Figura 4.35	Actividad antibacterial del nanocompuesto Ag/rGO ante a-b) <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, c-d) <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 y e) la zona de inhibición.....	86
Figura 4.36	Actividad antibacterial del nanocompuesto Cu ₂ O/rGO ante a-b) <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, c-d) <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 y e) la zona de inhibición	87

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1	Enfermedades humanas asociadas a las bacterias patógenas <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> [75].....	17
Tabla 2.2	Extractos de plantas usados en la reducción de GO con condiciones del proceso [81].....	23
Tabla 3.1	Datos para la obtención de la curva de calibración de fenoles totales.....	38
Tabla 3.2	Estándares de la curva de calibración para la estimación de AgNPs.....	44
Tabla 3.3	Estándares de la curva de calibración para la estimación de Cu ₂ ONPs.....	45
Tabla 4.1	Porcentajes de inhibición del radical DPPH.....	48
Tabla 4.2	Cuantificación de fenoles totales en los extractos.....	49
Tabla 4.3	Grupos funcionales presentes en el carbón grafito y GO.....	54
Tabla 4.4	Resultados de masas para la determinación de la densidad real del óxido de grafeno.....	55
Tabla 4.5	Grupos funcionales en el extracto acuoso <i>Haematoxylum brasiletto</i> (palo de brasil).....	63
Tabla 4.6	Estimación de AgNPs en el nanocompuesto Ag/rGO.....	82
Tabla 4.7	Estimación de Cu ₂ ONPs en el nanocompuesto Cu ₂ O/rGO.....	83
Tabla 4.8	Estimación de reactivos para obtener 1 g de nanocompuesto Ag/rGO.....	84
Tabla 4.9	Estimación de reactivos para obtener 1 g de nanocompuesto Cu ₂ O/rGO.....	85

GLOSARIO DE TÉRMINOS

AgNPs	Nanopartículas de plata
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo
Cu₂ONPs	Nanopartículas de óxido de cobre
DPPH	2,2 difenil, 1-picrilhidracilo
DRX	Difracción de rayos X
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDS	Energía dispersiva de rayos X
FCC	Cúbica centrada en las caras
FT-IR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
GO	Óxido de grafeno
MEB	Microscopía electrónica de barrido
METB	Microscopía electrónica de transmisión por barrido
MFA	Microscopía de fuerza atómica
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina
NPs	Nanopartículas
rGO	Óxido de grafeno reducido
ROS	Especies reactivas de oxígeno
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SC	Cúbica simple
SPR	Resonancia del plasmón superficial
UV-Vis	Espectroscopía de Ultravioleta-Visible

RESUMEN

Recientemente, el grafeno y sus derivados decorados con nanopartículas de plata (AgNPs) u óxido de cobre (Cu₂ONPs) son de gran interés en el área biomédica, ya que pueden aplicarse como agentes antibacterianos de amplio espectro. En esta investigación, nanocompuestos de óxido de grafeno reducido (rGO) con AgNPs (Ag/rGO) se sintetizaron mediante un método verde empleando biomoléculas del extracto acuoso de *Tamarix gallica* (taray). Además, se sintetizó el nanocompuesto Cu₂O/rGO mediante síntesis híbrida empleando NaBH₄ como agente reductor y *Tamarix gallica* (taray) como agente estabilizador. La caracterización morfológica, estructural y química de los nanocompuestos se realizó por medio de las técnicas de espectroscopía de ultravioleta-visible (UV-Vis) y de infrarrojo (FT-IR), así como mediante difracción de rayos-X (DRX), microscopía electrónica de barrido (MEB) y microscopía electrónica de transmisión por barrido (METB). La técnica de espectroscopía UV-Vis corroboró la síntesis de AgNPs y Cu₂ONPs en rGO por la presencia de bandas de absorción, ubicadas entre 350-500 nm para las NPs y, entre 270-285 nm para rGO. Además, los análisis de MEB y METB confirmaron la depositación en rGO de AgNPs y Cu₂ONPs con morfología esférica y tamaños inferiores a 40 nm. Mediante la técnica de DRX, se demostró que los sólidos tienen estructuras cristalinas tipo fcc y sc, correspondientes a las AgNPs y Cu₂ONPs, respectivamente. Por otra parte, los resultados de espectroscopía FT-IR mostraron después de la reducción una disminución de los grupos funcionales oxigenados del óxido de grafeno (GO), así como de alcanos, alcoholes y compuestos aromáticos en el extracto acuoso de *T. gallica*, indicativo de que actuaron como agentes reductores y estabilizadores durante la síntesis. Mediante estos resultados se demuestra que las biomoléculas del extracto acuoso de *T. gallica* actuaron como agentes reductores y estabilizadores para permitir de manera simultánea la reducción de los iones de Ag para formar AgNPs y la obtención del rGO, además, también actuaron como agentes estabilizadores en la síntesis híbrida de Cu₂ONPs. Mediante el método de difusión en agar, el nanocompuesto Ag/rGO mostró actividad bacteriana contra *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 29213, mientras que, el nanocompuesto Cu₂O/rGO mostró actividad bacteriostática ante *E. coli* ATCC 25922.

Palabras clave: Nanocompuestos, biosíntesis, síntesis híbrida, *Tamarix gallica* y actividad antibacterial.

ABSTRACT

Recently, graphene and its derivatives decorated with silver nanoparticles (AgNPs) or copper oxide (Cu₂ONPs) are of great interest in the biomedical area, since they can be applied as broad-spectrum antibacterial agents. In this research, nanocomposites of reduced graphene oxide (rGO) with AgNPs (Ag/rGO) were synthesized by a green method using biomolecules from the aqueous extract of *Tamarix gallica* (taray). Furthermore, the Cu₂O/rGO nanocomposite was synthesized by hybrid synthesis using NaBH₄ as a reducing agent and *Tamarix gallica* (taray) as a stabilizing agent. The morphological, structural and chemical characterization of the nanocomposites was carried out using ultraviolet-visible (UV-Vis) and infrared (FT-IR) spectroscopy techniques, as well as by X-ray diffraction (XRD), microscopy scanning electron (SEM) and scanning transmission electron microscopy (STEM). The UV-Vis spectroscopy technique corroborated the synthesis of AgNPs and Cu₂ONPs in rGO by the presence of absorption bands, between 350-500 nm for NPs and, between 270-285 nm for rGO. Furthermore, SEM and STEM analysis confirmed the deposition in rGO of AgNPs and Cu₂ONPs with spherical morphology and sizes below 40 nm. Using the XRD technique, it was shown that solids have fcc and sc type crystalline structures, corresponding to AgNPs and Cu₂ONPs, respectively. On the other hand, the FT-IR spectroscopy results showed after reduction a decrease in the oxygenated functional groups of graphene oxide (GO), as well as alkanes, alcohols, and aromatic compounds in the aqueous extract of *T. gallica*, indicative that they acted as reducing and stabilizing agents during synthesis. Through these results, it is demonstrated that the biomolecules of the aqueous extract of *T. gallica* (taray) acted as reducing and stabilizing agents to simultaneously allow the reduction of Ag ions to form AgNPs and the obtaining of rGO, in addition, they also acted as stabilizing agents in the hybrid synthesis of Cu₂ONPs. Through the agar diffusion method, the Ag/rGO nanocomposite showed bacterial activity against *E. coli* ATCC 25922 and *S. aureus* ATCC 29213, while the Cu₂O/rGO nanocomposite showed bacteriostatic activity against *E. coli* ATCC 25922.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

El grafeno es uno de los materiales más interesantes, estudiado ampliamente en la actualidad debido a sus propiedades físicas y químicas únicas. Un estudio reciente muestra que los compuestos a base de grafeno con diferentes nanopartículas muestran un extenso potencial de aplicación en diversas áreas de la ciencia energética, ambiental y biomédica [1].

Con respecto a la ciencia biomédica, uno de los mayores desafíos es la contención de la evolución y adaptación de varias cepas bacterianas. La mejora constante en la resistencia bacteriana a los medicamentos y otros antibióticos ha obligado a los investigadores a buscar nuevos agentes antibacterianos [2]. Una alternativa que se ha abordado, para solucionar este desafío, es utilizar nanocompuestos de grafeno y sus derivados con nanopartículas de: Ag [3], CuO [4], Cu₂O [5], Fe₃O₄ [6], Co₃O₄ [7], TiO₂ [8] y ZnO [9] para inhibir el crecimiento de bacterias gram positivas, *Staphylococcus aureus* [3, 6, 8], *Bacillus cereus* [3, 8], *Bacillus subtilis* [6, 8, 9] y *Enterococcus faecalis* [8], así como, de gram negativas, *Klebsiella pneumoniae* [3, 8], *Escherichia coli* [3-9], *Salmonella typhimurium* [4], *Pseudomona aeruginosa* [8], *Salmonella entérica* [8] y *Serratia marcescens* [9].

Con esa finalidad, existen diferentes métodos químicos y físicos para sintetizar nanocompuestos de grafeno con nanopartículas metálicas. Sin embargo, muchos de ellos son costosos y necesitan la aplicación de productos químicos dañinos, que son inaceptables para la industria farmacéutica y médica. Contrariamente, la síntesis verde es una alternativa viable que utiliza solventes no tóxicos como extractos biológicos, agua y enfoques ambientalmente benignos respecto a los métodos convencionales de reducción química. Los métodos de síntesis verde utilizan microorganismos, tales como bacterias, hongos, levaduras y extractos de plantas. Entre estos métodos, se encuentra que el proceso biológico mediado por extractos de plantas es versátil y simple sin la necesidad del uso de sustancias costosas y tóxicas [10].

En este trabajo, se sintetizaron nanocompuestos de rGO decorados con AgNPs por métodos verdes y de rGO con Cu₂ONPs por síntesis híbrida con el extracto acuoso de *Tamarix gallica* (taray) como agente estabilizador y NaBH₄ como agente reductor. Estos nanocompuestos se caracterizaron por

espectroscopías, tales como UV-Vis y FT-IR, así como DRX, MEB y METB. Además, se determinó su actividad antibacterial ante *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 29213.

1.1 Justificación

Las infecciones bacterianas, como la neumonía, cólera, fiebre tifoidea, disentería, tuberculosis, entre otras, causan 300 millones de casos de enfermedades graves cada año en todo el mundo, con 16 millones de casos de muertes, incluidos 2 millones de niños [11]. Este problema se agrava debido a la rápida aceleración de la resistencia a los medicamentos por las cepas bacterianas, lo cual exacerba aún más esta amenaza para la salud humana [11]. La Organización Mundial de la Salud [12] publicó una lista de patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo (I+D) de nuevos antibióticos, señalando como prioridad 1 (crítica) a *Enterobacteriaceae* (entre las cuales se encuentran *E. coli*) y como prioridad 2 (elevada) a *S. aureus*, es por ello, que los nanocompuestos se aplicarán a estas bacterias patógenas. Uno de los métodos más prometedores contra las bacterias resistentes a los medicamentos pueden ser los materiales modificados en la superficie con nanopartículas biocidas y nanocompuestos [13] (la instalación de este tipo de nanomateriales en el área biomédica podría traer un impacto benéfico a la sociedad al combatir bacterias patógenas). Es bien conocido que agentes antibacterianos inorgánicos tales como las AgNPs y Cu₂ONPs son de gran interés [14], debido a que se adhieren a la superficie celular microbiana, dando como resultados deterioro en la membrana y aumento en su permeabilidad, además, penetran dentro de la célula ocasionando daño de las estructuras intracelulares (mitocondrias, vacuolas, ribosomas) y biomoléculas (proteínas, lípidos y ADN) [15, 16]. Recientemente, se ha demostrado que el grafeno, un alótropo del carbono, tiene igualmente actividad antibacteriana [13], principalmente por el deterioro físico que ocasiona en las membranas microbianas por sus bordes afilados [17] (el implantar un nanomaterial que combine las propiedades antibacterianas tanto de las AgNPs y Cu₂ONPs con el grafeno y sus derivados puede constituirse como un impacto de interés científico y tecnológico). Los nanocompuestos de grafeno con nanopartículas han sido sintetizados por métodos físicos y químicos [10], sin embargo, estos métodos resultan costosos y emplean agentes químicos nocivos para la salud y para el medio ambiente, por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar métodos simples y ecológicos para la síntesis de este tipo de nanocompuestos [18] (lograr la síntesis de estos nanocompuestos por métodos de síntesis verde e híbrida puede

constituirse como un impacto benéfico para el medio ambiente y a su vez más económico que utilizar métodos convencionales).

1.2 Hipótesis

Argumentos: Se han identificado diversas biomoléculas en *Tamarix gallica* (taray), por ejemplo, flavonoides (quercetina, kaempferol, ramnocitrina, flavona, epicatequina y resveratrol 3-O-glucosido) [19], taninos (ácido elágico y ácido gálico), antocianinas, carotenoides y aceites esenciales [20]. Estos compuestos son conocidos por sus propiedades antioxidantes, dada la facilidad que tienen para donar electrones [21], es decir, actúan como agentes reductores. Por otro lado, las actividades antibacterianas de la Ag, el Cu y el grafeno y sus derivados ya han sido demostradas [17, 22].

Proposición: Las biomoléculas presentes en el extracto de la planta medicinal *Tamarix gallica* (taray) actuarán como agentes reductores y estabilizadores que permitirán de manera simultánea la biosíntesis de AgNPs y bioreducción del GO. Por otro lado, ejercerán un poder estabilizante en la síntesis de Cu₂ONPs depositadas en rGO, utilizando NaBH₄ como agente reductor. La capacidad antibacterial individual de cada nanoestructura, aunada a la sinergia entre los nanocompuestos funcionarán como amplios agentes antibacterianos ante *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 29213.

1.3 Objetivo general

Sintetizar, caracterizar y evaluar la actividad antibacteriana de nanocompuestos de óxido de grafeno reducido (rGO) decorados con AgNPs por métodos verdes y de rGO con Cu₂ONPs empleando NaBH₄ como agente reductor y las biomoléculas presentes en el extracto de la planta medicinal *Tamarix gallica* (taray) como agentes estabilizadores.

1.4 Objetivos específicos

- Seleccionar una planta medicinal mediante la determinación de su actividad antioxidante por el método 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) y cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.
- Obtener óxido de grafito por el método de Hummers modificado por Marcano y Col.
- Sintetizar nanocompuestos de óxido de grafeno reducido (rGO) vía *in-situ* decorado con AgNPs por medio de biosíntesis empleando las biomoléculas presentes en el extracto de la planta medicinal *Tamarix gallica* (taray).
- Sintetizar nanocompuestos de rGO vía *in-situ* decorado con Cu₂ONPs mediante síntesis híbrida, empleando NaBH₄ como agente reductor y *Tamarix gallica* (taray) como agente estabilizador.
- Caracterizar morfológica y estructuralmente los nanocompuestos obtenidos por medio de espectroscopías UV-Vis y FT-IR, así como MEB, METB y DRX.
- Estimar el rendimiento de reacción en la síntesis de la AgNPs y Cu₂ONPs en los nanocompuestos mediante espectrofotometría de absorción atómica (AA).
- Evaluar la actividad antibacterial de los nanocompuestos sintetizados ante *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 29213 por el método de difusión en agar.

CAPÍTULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En este capítulo se hace referencia a conceptos fundamentales, así como a antecedentes e investigaciones previas similares a las que se harán en este trabajo, mismas que servirán para hacer una comparación con los resultados que se obtendrán.

2.1 Nanotecnología

La *National Nanotechnology Initiative* (NNI) define la nanotecnología como la investigación y desarrollo a nivel atómico, molecular o macromolecular en el rango inferior a los 100 nm (1-100 nm) para crear estructuras, dispositivos y sistemas que tienen nuevas propiedades funcionales. A esta escala, los científicos pueden manipular átomos para crear materiales más fuertes, más ligeros y más eficientes (nanomateriales) con propiedades individualizadas [23-25]. Hay dos tipos de nanotecnología según la técnica de aplicación: reducción de tamaño o de arriba hacia abajo (*Top-Down*) y aumento de tamaño o de abajo hacia arriba (*Bottom-Up*) [26]. El enfoque de arriba hacia abajo (*Top-Down*) se basa en el ensamblaje de la estructura mediante la manipulación de componentes mucho más grandes a través del procesamiento monolítico, un enfoque que se logra más fácilmente con la tecnología actual. Por otro lado, el enfoque *Bottom-Up* organiza átomos o moléculas en nanoestructuras, implica la fabricación de estructuras de dispositivos a través del autoensamblaje sistemático de moléculas, átomos u otras unidades básicas de materia [27].

2.2 Nanomateriales y su clasificación

Los nanomateriales tienen diferentes formas, tamaños, estructuras y orígenes. Estos pueden ser esféricos, cónicos, cilíndricos, tubulares, planos, huecos o irregulares en forma y su tamaño puede ser desde 1 hasta 100 nm [28]. Actualmente, la forma típica de clasificar los nanomateriales es en base al número de dimensiones que no están confinadas en el rango de la escala nanométrica, teniendo así cuatro categorías [29]:

- Cero-dimensionales (0-D), todas sus dimensiones entran dentro de la escala nanométrica, es el caso de las nanopartículas.
- Uno-dimensional (1-D), dos de sus dimensiones (ancho y alto) entran dentro de la escala nanométrica, pero el largo no, es el caso de los nanoalambres, nanorodillos y nanotubos.

- Dos-dimensional (2-D), solamente el espesor entra dentro de la escala nanométrica, mientras que las otras dos dimensiones no, es el caso de las nanopelículas, como el grafeno.
- Tres-dimensional (3-D), se conocen como materiales a granel, ninguna de sus dimensiones entra en la escala nanométrica, sin embargo, están compuestos por un arreglo múltiple de individuos de tamaño nanométrico [30].

2.3 Nanopartículas

Las nanopartículas tienen tamaño nanométrico (1 a 100 nm) y se caracterizan por sus propiedades poco comunes, que son afectadas por parámetros como el tamaño, forma, área superficial, confinamiento cuántico, composición, cristalinidad y estructura [31].

2.3.1 Métodos de síntesis de nanopartículas de nanopartículas

Se pueden emplear varios métodos para la síntesis de nanopartículas, pero estos métodos se dividen en dos clases principales, es decir (1) enfoque descendente y (2) enfoque ascendente [32]. Estos enfoques se dividen en varias subclases según la operación, la condición de reacción y los protocolos adoptados [33]. En el primero se emplea el enfoque destructivo, partiendo de una molécula más grande, que se descompone en unidades más pequeñas y luego estas unidades se convierten en nanopartículas adecuadas. Ejemplos de este método son la molienda mecánica, evaporación térmica, crecimiento epitaxial, y otras técnicas de descomposición. Mientras que, en el segundo, se emplea a la inversa, ya que las nanopartículas se forman a partir de sustancias relativamente más simples, por lo que este enfoque también se denomina enfoque de construcción. Ejemplos de este caso son las técnicas de sedimentación y reducción; incluye sol gel, síntesis verde, deposición química de vapor, entre otras [32].

En la síntesis química generalmente se emplean tres componentes principales: los precursores metálicos, los agentes reductores y los agentes estabilizantes. Básicamente la reducción de sales de plata implica dos etapas: (1) nucleación y (2) crecimiento [34]. Los métodos químicos son extremadamente caros, aunque tienen altos rendimientos, por ejemplo, los materiales utilizados para la síntesis de AgNPs, como citrato, borohidruro, tioglicerol y 2-mercaptoetanol, son tóxicos y

peligrosos [35]. Es por ello, que los métodos biológicos surgen como una manera viable de sintetizar nanopartículas, utilizando extractos de plantas medicinales o microorganismos.

2.3.1.1 Nucleación y crecimiento de nanopartículas

En la síntesis de NPs a partir de una solución de sobresaturación, el tamaño de radio crítico (r^*) representa el límite de cómo se pueden sintetizar pequeñas NPs. Para reducir el tamaño de radio crítico y la energía libre, es necesario aumentar el cambio de energía libre de Gibbs, (ΔG_v), y reducir la energía superficial de la nueva fase, γ . La siguiente ecuación indica que ΔG_v se puede incrementar significativamente aumentando la sobresaturación, σ , para un sistema dado:

$$\Delta G_v = -kT/\Omega \ln\left(\frac{C}{C_0}\right) = -kT/\Omega \ln(1 + \sigma) \quad (\text{Ecuación 2.1})$$

donde C es la concentración del soluto, C_0 es la concentración de equilibrio o solubilidad, Ω es el volumen atómico y σ es la sobresaturación definida por $(C - C_0/C_0)$. Sin sobresaturación (es decir, $\sigma = 0$), ΔG_v es cero y no se produciría nucleación. Cuando $C - C_0$, ΔG_v es negativo y la nucleación ocurre espontáneamente. Suponiendo que se forma un núcleo esférico con un radio (r), el cambio de energía libre de Gibbs o energía de volumen, $\Delta\mu_v$, se puede describir por:

$$\Delta\mu_v = 4/3\pi r^3 \Delta G_v \quad (\text{Ecuación 2.2})$$

Sin embargo, esta reducción de energía se contrarresta con la introducción de energía superficial, que se acompaña de la formación de una nueva fase. Esto resulta en un aumento de la energía superficial, $\Delta\mu_s$, del sistema:

$$\Delta\mu_s = 4\pi r^2 \gamma \quad (\text{Ecuación 2.3})$$

donde γ es la energía superficial por unidad de área. El cambio total del potencial químico para la formación del núcleo, ΔG , viene dado por:

$$\Delta G = \Delta\mu_v + \Delta\mu_s = \left(\frac{4}{3}\right)\pi r^3 \Delta G_v + 4\pi r^2 \gamma \quad (\text{Ecuación 2.4})$$

El núcleo recién formado es estable solo cuando su radio excede un tamaño crítico, r^* . Un núcleo más pequeño que r^* se disuelve en la solución para reducir la energía libre total, mientras que, un núcleo más grande que r^* es estable y continúa creciendo. En el tamaño crítico $r = r^*$, $d\Delta G/dr = 0$. El tamaño de radio crítico y la energía crítica (ΔG^*), se determina por:

$$r^* = -2\gamma/\Delta G_v \quad (\text{Ecuación 2.5})$$

$$\Delta G^* = 16\pi\gamma/3(\Delta G_v)^2 \quad (\text{Ecuación 2.6})$$

La temperatura también puede influir en la energía de la superficie. La energía superficial del núcleo sólido puede cambiar más significativamente cerca de la temperatura de rugosidad. Otras posibilidades incluyen: (1) uso de diferentes solventes, (2) aditivos en solución, e (3) incorporación de impurezas en fase sólida.

Cuando la concentración de especies de crecimiento se reduce por debajo de la concentración mínima para la nucleación, esta se detiene, mientras que, el crecimiento continúa. Para la formación de NPs monodispersas, se desea un crecimiento limitado por difusión. Hay varias formas de lograr un crecimiento de difusión limitada. Por ejemplo, cuando la concentración de especies de crecimiento se mantiene extremadamente baja, la distancia de difusión sería muy grande y, en consecuencia, la difusión podría convertirse en el paso limitante. Aumentar la viscosidad de la solución es otra posibilidad. La introducción de una barrera de difusión, como una monocapa en la superficie de una partícula en crecimiento, es otro enfoque. El suministro controlado de especies en crecimiento ofrece otro método para manipular el proceso de crecimiento [36, 37].

2.3.2 Síntesis verde

La biosíntesis de nanopartículas metálicas por parte de las plantas se encuentra actualmente en apogeo, especialmente, las nanopartículas de oro y plata utilizando plantas (tejidos de plantas inactivadas, extractos de plantas y plantas vivas) ha recibido más atención como una alternativa adecuada a los procedimientos químicos y métodos físicos [32]. Particularmente, el uso de extractos de plantas es muy rentable y, por lo tanto, puede utilizarse como una alternativa económica y valiosa para la producción a gran escala. Los extractos de las plantas pueden actuar como agentes reductores y estabilizadores en la síntesis de nanopartículas. La bio-reducción por combinaciones de biomoléculas encontradas en extractos de plantas (por ejemplo, enzimas, proteínas, aminoácidos, vitaminas, polisacáridos y ácidos orgánicos como los citratos) es ambientalmente benigna, pero químicamente compleja [32]. Los organismos de prácticamente todos los reinos son bio-fábricas potenciales o fuentes biológicas para moléculas útiles para la producción de nanopartículas, de hecho, las moléculas de una variedad de organismos, incluidos microorganismos y plantas pueden actuar directamente en la reducción química del precursor metálico, en sus etapas de nucleación, crecimiento y estabilización de síntesis verde de AgNPs [38]. Estas biomoléculas suelen clasificarse como metabolitos primarios y secundarios, los primeros se encuentran directamente involucrados en el crecimiento, desarrollo o reproducción de una especie (vitaminas, ácidos nucleicos, polisacáridos, aminoácidos y proteínas), mientras que los segundos pueden ser importantes, pero no están directamente involucrados en dichos procesos esenciales (fenoles, alcaloides, terpenoides y saponinas) [39].

2.3.2.1 Extractos de plantas medicinales

Han sido utilizados extractos de plantas de varias especies para la síntesis de nanopartículas. Una amplia gama de moléculas, que van desde proteínas hasta diversos compuestos de bajo peso molecular, como terpenoides, alcaloides, aminoácidos, compuestos alcohólicos, polifenoles (catequina, flavonas, taxifolina, procianidinas de diversas cadenas formadas por unidades de catequina y epicatequina y ácidos fenólicos), glutatiónes, polisacáridos, antioxidantes, ácidos orgánicos (ácido ascórbico, oxálico, málico, tartárico, entre otros), quinonas, etc., se ha informado que desempeñan un papel en la síntesis verde de nanopartículas. También se ha postulado la

participación de azúcares, terpenoides, polifenoles, alcaloides, ácidos fenólicos y proteínas en la reducción de iones metálicos en nanopartículas y en el apoyo de su estabilidad posterior [40].

2.3.2.1.1 *Cuphea aequipetala* (hierba del cáncer)

Cuphea aequipetala (hierba del cáncer) se agrupa en el orden Myrtales, dentro de la familia Lytraceae, es una hierba perenne de 40 cm y hasta 1 m de altura, aunque comúnmente mide de 30-40 cm, originaria de México [41]. Es una planta medicinal muy apreciada en México, conocida como “hierba del cáncer” para tratar dolencias estomacales como el dolor y la sensación de ardor, infecciones estomacales, úlceras, diarrea, disentería y diferentes tipos de tumores y contusiones [42]. Waizel-Bucay y Col. [41] mostraron la presencia de alcaloides, flavonoides y glucósidos en los extractos metanólicos y de acetato de etilo de la planta, mientras que las lactonas sesquiterpéicas solo se encontraron en la fracción metanólica. Palacios-Espinosa y Col. [42] determinaron el contenido fenólico de extracto acuoso de *Cuphea aequipetala* (hierba del cáncer), siendo de 109.9 ± 10.3 mg EAG/g PS, mientras que el contenido de flavonoides fue de 28.1 ± 3.2 mg EQ/g PS.

2.3.2.1.2 *Haematoxylum brasiletto* (palo de brasil)

Haematoxylum brasiletto (palo de brasil) se agrupa en el orden Fabales, dentro de la familia Fabaceae, es un árbol o arbusto de 2-10 m de alto, tronco profundamente estriado, ramillas frecuentemente espiraladas, armadas con espinas de hasta 2 cm de largo, hojas paripinnadas, 5-8 cm de largo, 3-4 pares de foliolos, obovados a suborbiculares, 5-30 mm de largo, 1-2.5 cm de ancho, ápice emarginado, inflorescencias en racimos axilares de 1.5-3 cm de largo, con pocas flores, pedicelo de 1-2 cm de largo; flores con cáliz un poco campanulado, con 5 lóbulos, 5 mm de largo y 5 pétalos amarillos. Florece de octubre a mayo y fructifica de enero a junio [43]. Es originario de México y se extiende hacia América Central, comúnmente es conocido como “palo de brasil” y es utilizado por las comunidades rurales en el estado de Guerrero, como tratamiento tradicional para la hipertensión, malestar estomacal, infecciones bucales, diarrea, úlceras gástricas y cáncer [44]. Estudios realizados por Heredia y Col. [45] demuestran que el extracto etanólico de la corteza del tallo de *Haematoxylum brasiletto* inhibe el crecimiento de *Escherichia coli* O157:H7 (EHEC). Además, Rivero-Cruz y Col. [46] comprobaron la actividad antibacterial de

Haematoxylum brasiletto contra *Staphylococcus aureus* 375, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecium* 379. Mientras que, Bello-Martínez y Col. [47] evidenciaron la actividad antiproliferativa de la brazilina, un flavonoide aislado de *Haematoxylum brasiletto*, contra células cancerosas humanas.

2.3.2.1.3 *Tamarix gallica* (taray)

Es un arbusto de 1.5-3.0 m de altura, muy ramoso, cuya corteza es oscura en lo viejo, y rojiza en los ramos nuevos. Sus hojas son muy pequeñas, puntiagudas, alternas y empizarradas. Las flores forman espigas cilíndricas, de 2.5-5.0 cm, delgadas y situadas en las extremidades de los ramos. Las semillas son bermejas, menudas, terminadas por una colita ramosa blanca. Crece en las orillas de los ríos [48]. Boulaaba y Col. [19] identificaron mediante pruebas fitoquímicas realizadas por LC-ESI-TOF-MS (cromatografía líquida – ionización por electrospray – frecuencia de rotación – espectrometría de masas) la presencia de cinco flavonoides en extractos metanólicos de flores de *Tamarix gallica* (quercetina 3-O-glucurónido, quercetina, kaempferol, ramnocitrina), y en el extracto metanólico de las hojas de *Tamarix gallica* mostraron la existencia de 6 compuestos (quercetina, quercetina 3-O-glucurónido, kaempferol 3-O-β-D-glucurónido, flavona, epicatequina y resveratrol 3-O-glucosido). Además, demostraron que los extractos de las hojas y las flores de *Tamarix gallica* (taray) exhibieron altas actividades antibacterianas y antifúngicas *in vitro* por lo que sugirieron, podría ser una fuente prometedora de productos naturales. Es utilizada tradicionalmente en leucoderma, enfermedades oculares, reumatismo y gingivitis [20].

2.3.3 Síntesis híbrida (verde y química)

Existen múltiples investigaciones acerca de la síntesis verde de diferentes tipos de nanopartículas metálicas y de óxidos metálicos [49, 50]. Sin embargo, hay pocas investigaciones que durante la síntesis de nanopartículas por reducción química han empleado una combinación de las sustancias utilizadas por la reducción química convencional y las biomoléculas de los extractos de plantas. Algunas biomoléculas en los extractos de plantas pueden desempeñar un papel esencial como estabilizadores, modificadores de la morfología y agentes oxidantes [51].

2.4 Grafeno

El grafeno se exfolió por primera vez mecánicamente del grafito en 2004 por Geim y Novoselov, por lo que más tarde compartieron el Premio Nobel de Física en 2010 [52]. El grafeno es considerado como el nanomaterial 2D más representativo y ha despertado una atención considerable. El grafeno es uno de los alótopos del carbono y consiste en una sola capa de átomos de carbono en un arreglo hexagonal [53]. El grafeno consiste de átomos de carbono posicionados en una red hexagonal con enlaces C-C de 1.42 Å, un átomo de carbono se une con tres átomos de carbono vecinos, compartiendo enlaces hibridados sp^2 , debido a los fuertes enlaces covalentes, el grafeno exhibe un alto módulo de Young (1 TPa) y una alta fuerza intrínseca (130 GPa) [54]. Los orbitales p_z restantes forman enlaces π , lo que contribuye a la estructura de resonancia del grafeno, ya que estos electrones π están deslocalizados en toda la estructura, por eso el grafeno tiene una buena movilidad electrónica [54].

2.4.1 Métodos de obtención

La síntesis de grafeno se puede realizar mediante dos enfoques principales: métodos de arriba-abajo y de abajo-arriba, como se muestra en la Figura 2.1. En los métodos de arriba-abajo, como la exfoliación mecánica, descarga de arco eléctrico, exfoliación oxidativa y reducción del óxido de grafeno (reducción química, térmica, electroquímica, entre otras), exfoliación en fase líquida y descompresión de nanotubos de carbono, generalmente se aíslan y deslaminan las capas de grafito en grafeno de una, dos y pocas capas. Estos métodos destruyen precursores más grandes como el grafito y otros precursores basados en carbono para formar grafeno de tamaño nanométrico. En general, algunos métodos descendentes son altamente escalables y producen productos de alta calidad, pero tienen dificultades para formar productos con propiedades consistentes, bajo rendimiento y depende en gran medida del precursor de grafito [55]. Los métodos de abajo-arriba sintetizan el grafeno y sus derivados utilizando otras fuentes de carbono además del grafito, estos métodos construyen materiales de grafeno a partir de precursores de tamaño atómico, estos incluyen la deposición química de vapor, el crecimiento epitaxial, la síntesis de fase gaseosa sin sustrato, la ruta de plantilla y la síntesis orgánica total, a pesar de que estos métodos producen productos de grafeno con una gran superficie casi libre de defectos, a menudo implican un alto

costo de producción y equipos sofisticados [55]. Es por ello, que el método de obtención de grafeno que ha recibido la mayor atención es la exfoliación y reducción del óxido de grafito.



Figura 2.1 Esquema de la síntesis de grafeno “de abajo-arriba” y “de arriba-abajo” [56].

2.4.2 Exfoliación oxidativa y reducción

En 1859, Benjamín C. Brodie [57] sintetizó GO por primera vez, mediante la oxidación del grafito al agregar KClO_3 a una suspensión de grafito en HNO_3 . En 1898, Staudenmaier [58] realizó una mejora a este proceso, que consistió en agregar el KClO_3 en múltiples alícuotas y usar H_2SO_4 concentrado para mejorar la acidez de la mezcla. Aunque, el uso de KClO_3 y su adición a la mezcla de ácidos (HNO_3 y H_2SO_4) hizo que la producción de GO fuera más práctica, plantea un riesgo constante de explosión, además de requerir días o semanas. Este método fue modificado por Hummers y Offeman en 1958 [59], el método más usado actualmente, que consiste en reemplazar el KClO_3 con KMnO_4 y NaNO_3 , y oxidar el grafito en H_2SO_4 , la reacción requiere de 2 h y una temperatura de $45\text{ }^\circ\text{C}$. Sin embargo, estos tres procedimientos mencionados implican la generación de gases tóxicos, como NO_2 , N_2O_4 y/o ClO_2 . Por lo anterior, en 2010, Marcano y Col. [60] modificaron el método de Hummers mediante un aumento en la proporción de KMnO_4 y sustituyendo NaNO_3 por una relación 9:1 de H_2SO_4 : H_3PO_4 , señalando que esta modificación proporciona una mayor cantidad de material de grafito oxidado hidrófilo en relación con los procedimientos anteriores, además, presenta una estructura más regular al preservar los planos basales del grafito y evita el desprendimiento de gases tóxicos.

El grafeno se obtiene por exfoliación del óxido de grafito en óxido de grafeno (GO), seguido de una reducción del óxido de grafeno para producir grafeno. El material resultante generalmente se

denomina "óxido de grafeno reducido" (rGO) o "grafeno funcionalizado" en lugar de "grafeno", ya que aún no se ha logrado una reducción completa. El óxido de grafito se exfolia más fácilmente que el grafito, utilizando tratamientos térmicos o por sonicación en agua, obteniendo así óxido de grafeno [61], y el óxido de grafeno producido puede reducirse utilizando métodos térmicos o químicos [62]. Sin embargo, un aspecto negativo al utilizar la reducción química es la alta naturaleza tóxica de los agentes reductores (hidracina, dimetilhidracina, borohidruro de sodio, hidroquinona, etc.), ya que la existencia de cantidades mínimas de dichos agentes tóxicos podría tener un efecto perjudicial, especialmente en casos de aplicaciones relacionadas con la biología, como la catálisis y la administración de medicamentos, es por ello que mediante el empleo de nanotecnología verde se pretende superar dicho problema mediante el uso de agentes reductores como la reducción con biomoléculas, microorganismos y fitoextractos [63]. El enfoque biológico para la bio-reducción de GO para obtener rGO se ha considerado respetuoso con el medio ambiente, barato, con un alto rendimiento de producto resultante, desprovisto de productos químicos nocivos y tóxicos y fácil de manejar [64].

2.4.3 Nanocompuestos de grafeno

Los nanocompuestos de grafeno son aquellos en donde se incorpora una segunda fase sobre la superficie del grafeno que le confiere novedosas propiedades ópticas, magnéticas, eléctricas o catalíticas [65]. Los métodos de síntesis para la obtención de nanocompuestos de grafeno se pueden clasificar en métodos *ex-situ* e *in-situ*. En el caso de los métodos *ex-situ* la síntesis de las nanopartículas se lleva a cabo de forma independiente, para después depositar dichas nanopartículas sobre el grafeno. En general, en este tipo de síntesis las nanopartículas se obtienen químicamente, luego se dispersan en GO y finalmente se lleva a cabo la reducción química del óxido de grafeno. Los métodos *in-situ* consisten en la preparación de las nanopartículas y el grafeno simultáneamente, en general se usan sales metálicas como precursores, las cuales se solubilizan en una solución acuosa de GO, para finalmente llevar a cabo una reducción química o térmica, en donde ambos componentes (GO y sales metálicas) se reducen, de esta manera, se obtienen los nanocompuestos de rGO con nanopartículas [66].

2.5 Aplicaciones biológicas

Debido a sus propiedades únicas, las AgNPs se han utilizado ampliamente en utensilios domésticos, en la industria del cuidado de la salud y en aplicaciones de almacenamiento de alimentos, medioambientales y biomédicas. En el caso de las aplicaciones biológicas y biomédicas, se han utilizado como antibacterianos, antifúngicos, antivíricos, antiinflamatorios, anticancerosos y antiangiogénicos [67].

Las nanopartículas de óxido de Cu, el óxido cúprico (CuO) y el óxido cuproso (Cu₂O), se encuentran entre las más utilizados como agentes antimicrobianos por su alta eficacia para un amplio espectro de microorganismos [68]. Las propiedades antibacterianas de CuO se pueden inducir y mejorar a través de algunos procedimientos de modificación. Se ha encontrado que las combinaciones de CuO con metales u óxidos metálicos como CuO-SnO₂, Ag/CuO y CuO-ZnO muestran actividad contra bacterias gram negativas, y la incorporación de nanopartículas metálicas como la plata ahora es reconocida por inducir actividad antimicrobiana [69, 70].

El grafeno y sus derivados (GO y rGO) se han utilizado en biomedicina como: agente antibacterial, liberación de fármacos, tratamiento contra el cáncer, biosensores e imagenología médica [71].

2.5.1 Agentes antibacteriales

La acción antimicrobiana de las AgNPs está vinculada con cuatro mecanismos bien definidos (Figura 2.2): (1) adhesión de AgNPs en la superficie celular microbiana, dando como resultado daños en la membrana y una actividad de transporte alterada; (2) penetración de AgNPs dentro de la célula ocasionando daño de las estructuras intracelulares (mitocondrias, vacuolas, ribosomas) y biomoléculas (proteínas, lípidos y ADN) y, por lo tanto, afectan la maquinaria celular; (3) la toxicidad celular inducida por AgNPs y el estrés oxidativo (desequilibrio entre la producción de radicales libres y la capacidad de la célula para contrarrestar sus efectos) causados por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y radicales libres; y (4) modulación de las vías de transducción de señales, que finalmente, causan la muerte celular [15].

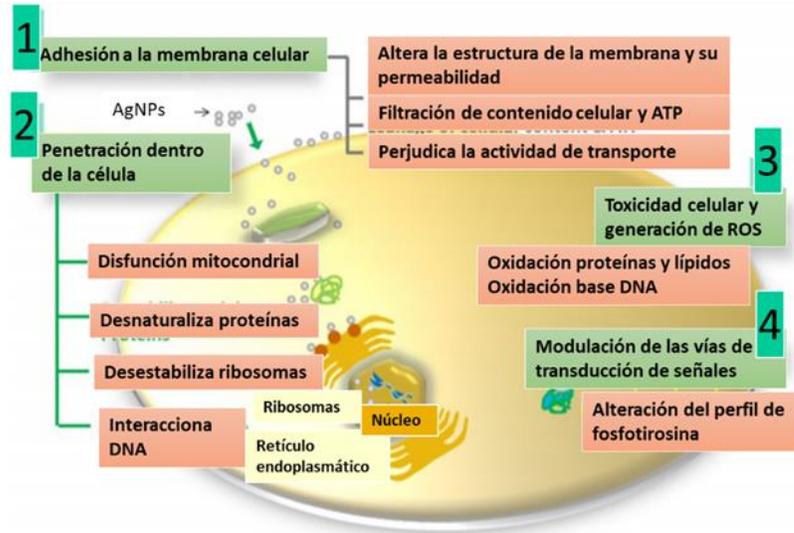


Figura 2.2 Las cuatro rutas más destacadas de acción antimicrobiana de las AgNPs [15].

En el caso de las Cu_2ONPs , el mecanismo de acción inhibitoria de estos nanosólidos sobre microorganismos es parcialmente conocido. El posible mecanismo antibacteriano es el siguiente: las Cu_2ONPs se absorben en la superficie celular, deterioran la pared celular y luego dañan la membrana celular, aumentando la permeabilidad de la membrana celular y disminuyendo la viabilidad de las bacterias en la solución de Cu_2O [16].

La acción antibacteriana del grafeno y sus derivados es tanto física como química. El mecanismo más importante de la acción antibacteriana está representado por el deterioro físico de las membranas microbianas por sus bordes afilados, seguido de la extracción de moléculas de lípidos [17]. La influencia antibacteriana química está representada principalmente por el estrés oxidativo producido por las especies reactivas de oxígeno [72].

2.5.2 Microorganismos patógenos

La Organización Mundial de la Salud [12] publicó una lista de patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos, en la cual señala como prioridad 1 (crítica) a *Enterobacteriaceae* (*E. coli*) debido a su resistencia a carbapenémicos y como prioridad 2 a *S. aureus*, debido a su resistencia a meticilina.

E. coli es una bacteria gram negativa con forma de bacilo de la familia de las enterobacterias que se encuentra en el tracto gastrointestinal de humanos y animales, es la bacteria anaerobia facultativa más abundante de la microbiota, así mismo es uno de los organismos patógenos más relevantes en el humano, tanto en la producción de infecciones gastrointestinales como de otros sistemas (urinario, sanguíneo y nervioso) [73].

S. aureus es una bacteria gram positiva de 0.8 a 1.0 mm de diámetro, aerobia facultativa. La acción patógena de este microorganismo se concentra en la piel, fosas nasales y garganta de los animales y el hombre, sus efectos son agudos y se manifiestan rápidamente, los cuadros clínicos característicos son: lesiones en la piel y mucosas, infecciones generalizadas y localizadas en las vísceras [74]. La Tabla 2.1 muestra un resumen de las enfermedades asociadas a las bacterias patógenas mencionadas.

Tabla 2.1 Enfermedades humanas asociadas a las bacterias patógenas *E. coli* y *S. aureus* [75].

Sistema afectado	Bacteria patógena		Sistema afectado	Bacteria patógena	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Infecciones de la piel y de los tejidos blandos					
Impétigo		X	Foliculitis		X
Paroniquia		X	Forúnculos		X
Celulitis		X	Celulitis y fascitis necrosante		
Infecciones de quemaduras		X	Heridas de mordeduras		X
Heridas quirúrgicas		X	Heridas traumáticas		X
Infecciones respiratorias superiores			Infecciones óticas		
Sinusitis		X	Otitis externa		X
Epiglotitis		X	Otitis media		X
Infecciones pleuropulmonares y bronquiales			Infecciones cardiovasculares		
Empiema		X	Endocarditis		X
Neumonía		X	Micoraditis		X
Infecciones óseas y articulares			Pericarditis		
Osteomielitis	X	X	Infecciones gastrointestinales		
Artritis		X	Gastroenteritis	X	
Infecciones asociadas con prótesis		X	Intoxicación alimentaria		X
Infecciones del sistema nervioso central					
Absceso cerebral		X	Empiema subdural		X
Meningitis	X	X			

2.6 Antecedentes

En este apartado se muestran trabajos recientes similares a este proyecto de investigación, dividiéndose en dos apartados principales, el primero referente a la reducción de GO con extractos de plantas, mientras que el segundo aborda la síntesis de nanocompuestos (Ag/rGO, Cu₂O/rGO y Ag/Cu₂O/rGO) y su actividad antibacterial.

2.6.1 Reducción de óxido de grafeno con extractos de plantas

Maddinedi y Col. [76] utilizaron extracto de semillas de *Terminalia chebula* (haritaki) para reducir GO. Mezclaron 200 mL de solución de GO con 200 mL de extracto acuoso de la planta (3.5 g de semillas en 200 mL de agua a 90 °C por 1 h) mediante agitación manual, se ajustó el pH a 12 con NH₄OH y la suspensión resultante se sometió a reflujo en un baño de agua a 90 °C por 24 h, confirmando la reducción del GO por un cambio de color de marrón amarillento a negro, además, de un análisis de UV-Vis, como se muestra en la Figura 2.3, en la cual se observa un pico de absorción máxima a 232 nm del GO que se atribuyó a las transiciones Π - Π^* de los enlaces aromáticos C-C y un hombro débil a 300 nm debido a las transiciones n- Π^* de los enlaces C=O, la finalización de la reducción se confirmó por el establecimiento de un nuevo pico y un corrimiento hacia el rojo desde 232 nm hasta 275 nm. Además, utilizaron las técnicas de MEB y MET. Identificaron mediante cromatografía líquida de alta resolución, que los compuestos polifenólicos presentes en el extracto acuoso de semillas de *T. chebula* (haritaki) son ácido gálico, pirogalol, ácido ascórbico y galato de metilo, los cuales contienen átomos de hidrógeno otorgando un carácter altamente ácido, que los disocia fácilmente en sus formas aniónicas. Por lo que propusieron, como mecanismo de reducción, que las formas aniónicas de los polifenoles reaccionan con el resto hidroxilo de GO a través de un mecanismo de sustitución nucleofílica tipo 2 (SN 2), aunque el GO debe estar en condiciones básicas para que los grupos epóxido y carbonilo se conviertan en grupos hidroxilo.

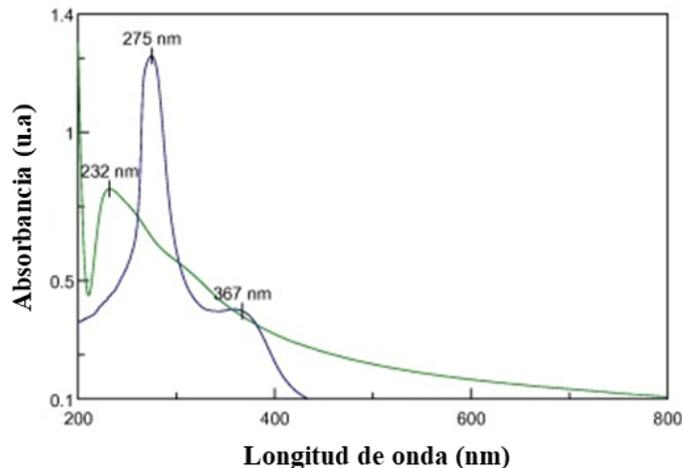


Figura 2.3 Espectro UV-Vis de GO (curva verde) y rGO (curva azul) [76].

Chettri y Col. [77] utilizaron extracto acuoso de *Artemisia vulgaris* (hierba de San Juan) para desoxigenar el GO, encontraron que el tiempo idóneo de biorreducción fue de 6 h de reflujo. Caracterizaron el nanomaterial por DRX, FT-IR y espectroscopía Raman. En la Figura 2.4 se muestra el patrón de DRX del (a) grafito, (b) rGO-12, (c) rGO-6 y (d) GO. Observaron un pico intenso para el grafito a $2\theta = 26.57^\circ$ correspondiente a los planos (002) de la estructura cristalina hcp con una distancia interplanar de 3.38 Å. El patrón de difracción del GO muestra un pico ancho a $2\theta = 9.81^\circ$ correspondiente a una distancia interplanar de 9.01 Å del plano (002), mostrando un aumento en comparación con el grafito. Mientras que, en el patrón de DRX del rGO-6 los picos se centraron a $2\theta = 26.68$ y 28.33° atribuidos al plano (002) cuyas distancias interplanares son más pequeñas que GO (3.34 y 3.15 Å), debido a la eliminación de los grupos funcionales oxigenados, además, observaron picos adicionales atribuidos a la naturaleza altamente cristalina de la muestra, comparado con el patrón de DRX del rGO-12, en el que observaron picos débiles y anchos a $2\theta = 25.17$ y 26.84° , mismos que son débiles y anchos en comparación con los de rGO-6, también observaron picos adicionales a $2\theta = 5.48, 6.28$ y 8.86° , sugirieron que la interacción prolongada con los compuestos fitoquímicos aumenta el espaciado de la capa de rGO, debido a la intercalación de moléculas de agua o fitomoléculas dentro de los planos grafiticos.

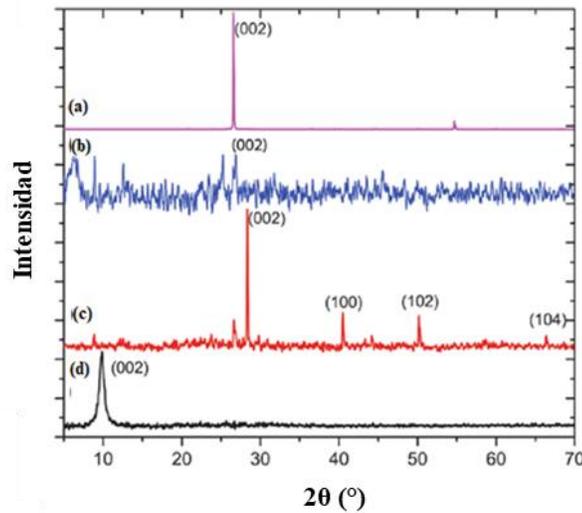


Figura 2.4 Patrón de DRX de (a) grafito, (b) rGO-12, (c) rGO-6 y (d) GO [77].

Mediante espectroscopía FT-IR corroboraron la eliminación de grupos funcionales oxigenados, como se muestra en la Figura 2.5. En el espectro del GO observaron picos centrados a 1068, 1233, 1369, 1637, 2117, 2335 y 3293 cm^{-1} , correspondientes a C-O, C-O-C, C-OH, C=C, hibridación C, C=C y grupos OH, respectivamente. El espectro FT-IR del rGO-6 mostró una disminución en la intensidad de los picos correspondientes a los grupos funcionales C-O, C-OH y OH en comparación con GO y finalmente, el espectro FT-IR del rGO-12 mostró que el pico correspondiente a C-O-C desapareció. Atribuyeron estos cambios a la eliminación eficiente de estos grupos funcionales por el extracto de la planta medicinal.

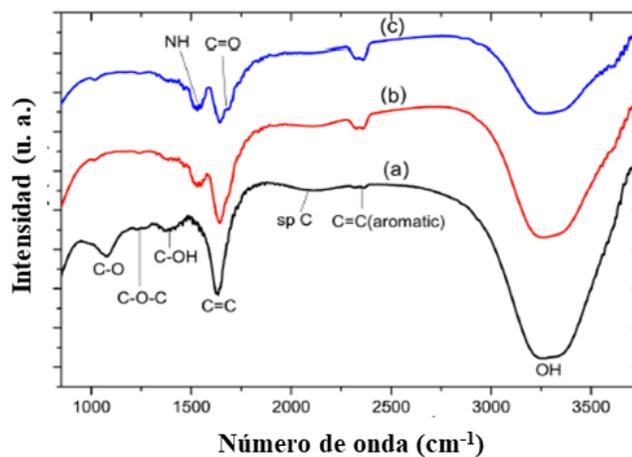


Figura 2.5 Espectro FT-IR de (a) GO, (b) rGO-6 y (c) rGO-12 [77].

Jin y Col. [78] redujeron el GO con extracto de hojas de *Eucalyptus* (eucalipto), las condiciones óptimas de bioreducción fueron en relación al volumen de extracto de la hoja (10 g/L) a la solución de GO (0.5 g/L) igual a 1:4 durante 8 h a 80 °C. Caracterizaron el rGO con MEB, espectroscopía de rayos-X de energía dispersiva (EDS), MET y FT-IR, los resultados de dichas caracterizaciones confirmaron que los grupos que contenían oxígeno en GO se eliminaron de manera eficiente, se formó una capa protectora en la superficie del rGO y una buena dispersión de rGO en solución acuosa. En la Figura 2.6 se muestran los resultados que obtuvieron por MEB-EDS para comparar las características morfológicas de GO y rGO, observaron pliegues en la superficie de GO (a), mientras que la superficie de rGO se restauró (b), debido a la eliminación de un gran número de grupos funcionales que contienen oxígeno durante la reducción del GO obteniendo un estiramiento y relajación natural del material, además, a través de los resultados EDS observaron que el contenido de oxígeno en rGO disminuyó significativamente de 34.20% a 22.91%. Además, identificaron mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas los eucaliptoles, aldehídos, terpineoles, alcoholes, amidas y éteres del extracto de la hoja de *Eucalyptus* (eucalipto) que pueden actuar como agentes reductores y estabilizantes para la formación de rGO.

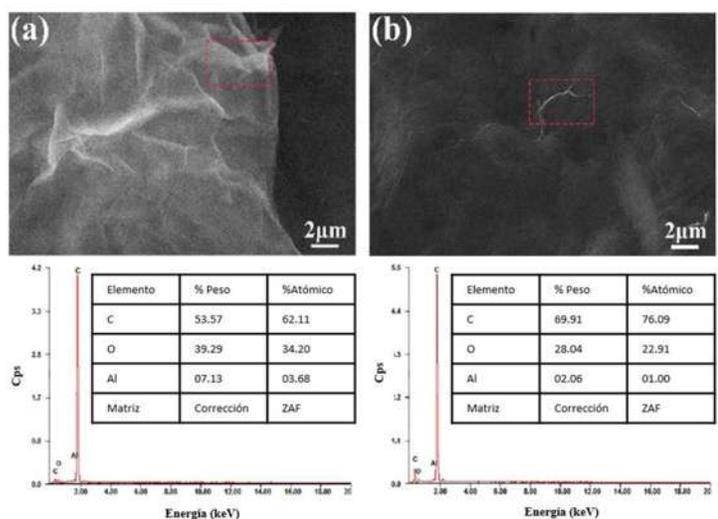


Figura 2.6 Análisis MEB-EDS de (a) GO y (b) rGO [78].

Hou y Col. [79] prepararon rGO a partir de GO con Artemisina extraída del extracto de la planta *Artemisia annua* (ajeno chino) y caracterizaron la morfología y la eficiencia de la desoxidación por DRX, MEB, MET, microscopía de fuerza atómica (MFA) y espectroscopía fotoelectrónica de rayos-X. Para lo cual, dispersaron el GO en una concentración de 1 mg/mL en etanol con

sonicación durante 1 h. Posteriormente agregaron 0.2, 0.4, 0.6, 0.08 y 1 g de artemisina en 100 mL del GO dispersado, sonicaron durante 1 h y se colocaron en baño de agua termostático calentado a 95 °C por 24 h, observando un cambio de color de marrón oscuro, a amarillo-naranja-rojo-vino con un poco de precipitado después de la reducción. Mediante MFA cuantificaron el grado de exfoliación o aglomeración de nanohojas de GO y rGO, ya que ésta técnica permite obtener una caracterización definitiva del grosor de la nanhoja a escala nanométrica. En la Figura 2.7 se muestran las imágenes de MFA en contacto intermitente (*tapping mode*) y perfiles de altura de (a) GO y (b) rGO con 1g de Artemisina en etanol, determinaron que el tamaño lateral de las hojas de GO es de $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ y de la curva de perfil del GO determinaron el grosor típico de GO de $\sim 0.8 \text{ nm}$, pero el tamaño típico del grafeno monocapa es de 0.34 nm , atribuyendo el aumento en el grosor a la existencia de grupos funcionales que contienen oxígeno, mientras que en rGO muestra un tamaño lateral relativamente más pequeño de $1 \times 1 \mu\text{m}^2$, mientras que un grosor mayor de $\sim 1.2 \text{ nm}$, correspondiente a 2-3 capas, considerando la morfología de rizado y errores de medición, además observaron la superficie más plana y suave que la de GO, lo cual atribuyeron a la eliminación de grupos funcionales que contiene oxígeno.

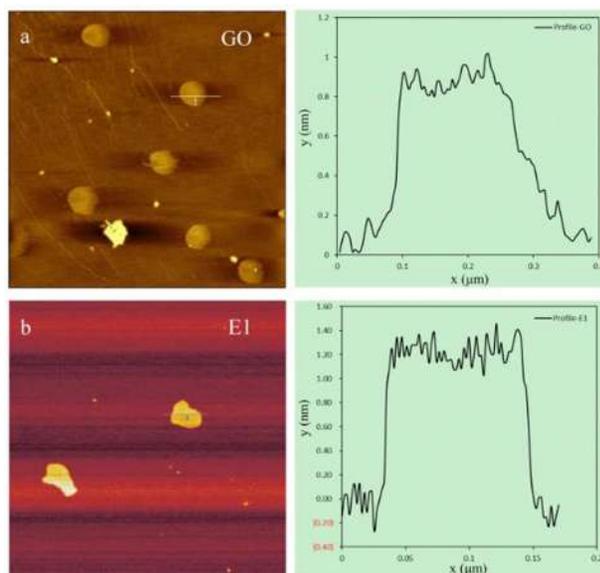


Figura 2.7 Imágenes de MFA en modo intermitente (*tapping mode*) y perfiles de altura de GO (a, $GO, 2 \times 2 \mu\text{m}^2$), rGO en 1 g de Artemisina en etanol (b, E1, $1 \times 1 \mu\text{m}^2$) [79].

De Silva y Col. [80] señalaron que con el desarrollo de la reducción verde, muchos investigadores han encontrado nuevos agentes reductores. De esta forma, muchos informes sobre extractos de

plantas se han publicado y siguen aumentando, incluidas las diferentes partes, como hojas, frutas y flores. Extractos de hongos, té verde, extracto de *Salvadora persica* (árbol cepillo de dientes), jugo de zanahoria, extractos de hoja de *Colocasia esculenta* (madumbe), cáscara de naranja, agua de coco, jugo de granada y agua de rosas, son algunos ejemplos. El objetivo principal de utilizar estos extractos, para reducir GO, es hacer dispersiones estables de hojas rGO biocompatibles. Actualmente, han sido reportados varios trabajos para la reducción de GO utilizando extractos de plantas, tal como se muestra en la Tabla 2.2 [81].

Tabla 2.2 Extractos de plantas usados en la reducción de GO con condiciones del proceso [81].

Planta	Parte de la planta usada para el extracto	Condiciones
Té	Hoja	90 °C, 2.5 h
Té verde	Hoja	80-86 °C, 10 min
<i>Colocasia esculenta</i> (madumbe)	Hoja	RT, 8h; 100 °C, 5h
<i>Mesua ferrea</i> Linn (penaga)	Hoja	RT, 10h; 100 °C, 8h
<i>Citrus sinensis</i> (naranja)	Hoja	RT, 10h; 100 °C, 8h
<i>Colocasia esculenta</i> , Fe^{3+} (madumbe)	Hoja	RT, sonicación, 3 min
<i>Rosa damascene</i> (rosa)	Hoja	95 °C, 5.5h
Ácido tánico	Hoja	80 °C, 10 h
<i>Potamogeton pectinatus</i> (espiga de agua)	Planta	90 °C, 24 h
<i>Ceratophyllum demersum</i> (cola de zorrillo)	Planta	90 °C, 24 h
<i>Lemna gibba</i> (lenteja de agua)	Planta	90 °C, 24 h
<i>Cyperus diformis</i> (tule)	Planta	90 °C, 24 h
<i>Gingko biloba</i> (árbol de los 40 escudos)	Hoja	30 °C, 12 y 24h
<i>Cocos nucifera</i> L. (cocotero)	Agua de coco	RT
<i>Prunus serrulata</i> (cereza)	Hoja	90 °C, 12 h
<i>Phaseolus aureus</i> L. (frijol mungo)	Agua	RT, 24h
<i>Syzygium aromaticum</i> (clavos de olor)	Botón floral	100 °C, 30 min
<i>Hibiscus sabdariffa</i> L. (flor de Jamaica)	Flor	--
<i>Spinacia oleracea</i> (espinaca)	Hoja	100 °C, 30 min

RT: temperatura ambiente

2.6.2 Síntesis y actividad antibacteriana de nanocompuestos

En esta sección se presenta la información referente a la síntesis y aplicación antibacteriana de diferentes tipos de nanocompuestos similares a los sintetizados en este trabajo.

2.6.2.1 Ag/rGO

Barua y Col. [82] sintetizaron un nanohíbrido de Ag/rGO por reducción simultánea de GO e iones Ag, usando extracto acuoso de *Colosia esculenta* (madumbe). Dispersaron 50 mg de GO en 100 mL de agua destilada con ultrasonido por 20 min, agregaron 10 mL del extracto con agitación constante, pasados 10 min agregaron AgNO_3 0.01 M y agitaron por 8 h.

En la Figura 2.8a se muestra el espectro de UV-Vis del GO observándose bandas a 228 nm y 302 nm, debido a las transiciones π - π^* y π - n^* de los enlaces C-C y C=O, respectivamente, mientras que, para el nanohíbrido Ag/rGO observaron un desplazamiento hacia el rojo del primer pico a 265 nm por la formación de rGO, y, otra banda a 429 nm, indicativo de la formación de AgNPs.

La Figura 2.8b registrada mediante espectroscopía FT-IR muestra la presencia de bandas a 1049 (tensión C-O), 1224 (tensión C-O-C) y 1720 cm^{-1} (tensión C=O), además, una banda ancha a 3400 cm^{-1} (tensión -OH) en el GO, mientras que, en el nanocompuesto Ag/rGO, notaron la eliminación de dichas bandas y la disminución de la banda a 3400 cm^{-1} .

En el espectro Raman (Figura 2.8c) correspondiente a GO y Ag/rGO observaron dos vibraciones fundamentales a ≈ 1600 y ≈ 1350 cm^{-1} correspondientes a las bandas G y D, respectivamente. El patrón DRX (Figura 2.8d) del nanohíbrido Ag/rGO mostró picos de reflexión a $2\theta = 38.4, 44.2, 64.4$ y 74.3° correspondientes a los planos (111), (200), (220) y (311) de la estructura cristalina cúbica centrada en las caras (fcc) de la Ag. Demostraron que el nanohíbrido tiene mejor actividad antibacteriana que los nanomateriales individuales contra *S. aureus* y *E. coli*.

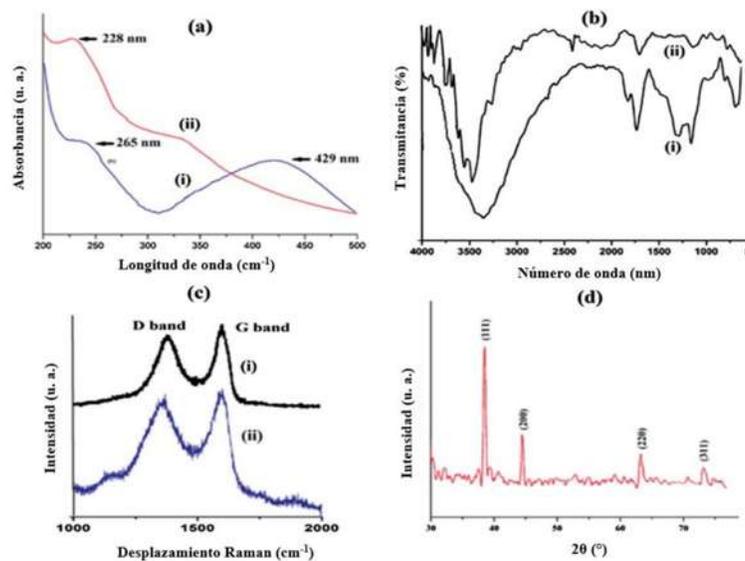


Figura 2.8 (a) Espectro UV-Vis de (i) GO y (ii) Ag/rGO, (b) Espectro FT-IR de (i) GO y (ii) Ag/rGO, (c) Espectro Raman de (i) GO y (ii) Ag/rGO y (d) Patrón DRX del nanohíbrido Ag/rGO [82].

Sedki y Col. [83] biosintetizaron un nanocompuesto Ag/rGO mediante el extracto acuoso de *Potamogeton pectinatus* (espiga de agua), usando como precursores GO (sintetizado por el método de Hummers modificado por Marcano y Col.), AgNO_3 0.1 M y el extracto acuoso de la hierba medicinal. Caracterizaron el nanocompuesto por espectroscopías UV-Vis, FT-IR y Raman, así como por las técnicas de DRX y MET, además, evaluaron su actividad antibacterial por el método de conteo de colonias ante *E. coli* 107.

En la Figura 2.9 se muestra la gráfica de tiempo de incubación contra el porcentaje de viabilidad celular para la evaluación antibacterial de los nanomateriales ante *E. coli*, observaron que la pérdida de la viabilidad celular aumentó gradualmente con el aumento del tiempo de incubación. La pérdida de viabilidad celular para *E. coli* 107 al incubarse con GO fue de $54 \pm 4.2\%$, aumentando gradualmente en la segunda y tercera hora a $68 \pm 3.9\%$ y $79 \pm 4.5\%$, respectivamente, alcanzando su máximo $87 \pm 5.1\%$ a la cuarta hora. Mientras que, Ag-rGO, exhibió un efecto antibacteriano más fuerte, la pérdida en la viabilidad celular en la primera hora de incubación fue de $48 \pm 3.5\%$, la segunda y tercera hora, fueron de $73 \pm 5.2\%$ y $85 \pm 4.7\%$, respectivamente, y en la cuarta hora observaron un efecto más fuerte de $92 \pm 4.1\%$.

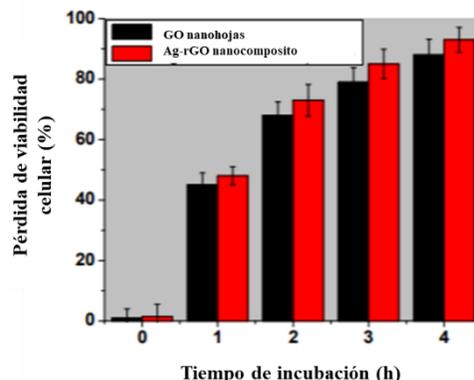


Figura 2.9 Pérdida de la viabilidad celular de *E. coli* al ser incubada con GO y Ag-rGO [83].

2.6.2.2 Cu₂O/rGO

Yang y Col. [84] sintetizaron un nanocompuesto Cu₂O/rGO, reduciendo Cu₂SO₄ en GO con ácido ascórbico como agente reductor en presencia de polietilenglicol (PEG) y NaOH a temperatura ambiente. Observaron que la gran área superficial específica de rGO mejoró la dispersibilidad de Cu₂ONPs. Caracterizaron los nanomateriales obtenidos por DRX, MET y espectroscopías UV-Vis, FT-IR y fotoelectrónica de rayos-X (XPS). La Figura 2.10 muestra los espectros de absorción UV-Vis de rGO-Cu₂O, Cu₂O y GO. Observaron un pico de absorción característico en el espectro UV-Vis a 236 nm aproximadamente por las transiciones electrónicas π - π^* del GO y un pico de absorción amplio a 480 nm para Cu₂ONPs, el pico de absorción de los nanocompuestos rGO-Cu₂O fue similar al de las Cu₂ONPs solas, además, observaron que el pico de absorción característico del GO cambió de 236 a 270 nm, confirmando que la conjugación electrónica dentro de las nanohojas cambió por la reducción.

Además, la Figura 2.11a muestra los patrones DRX del grafito prístino (PG) y GO. En comparación con el PG, el pico de rayos-X correspondiente a los planos (002) de la estructura hexagonal de GO cambió de 26.7° a 11.4°, lo que indica el aumento en la distancia interplanar por la inserción de grupos funcionales oxigenados. La Figura 2.11b muestra los patrones de DRX de Cu₂ONPs y el nanocompuesto rGO-Cu₂O, identificaron picos de difracción de las Cu₂ONPs sintetizadas a $2\theta = 29.65, 36.52, 42.42, 61.54, 73.72$ y 77.61° pertenecientes a los planos (110), (111), (200), (220), (311) y (222) de cristales de Cu₂O en fase cúbica (JCPDS No. 05-0667). Para el nanocompuesto

Cu₂O-rGO, obtuvieron todos los picos de difracción similares a los de Cu₂ONPs (JCPDS No. 05-0667), mientras que, no observaron los picos característicos correspondientes a la estructura gráfica. Además, notaron un efecto sinérgico de la liberación sostenida de iones de cobre, la capacidad de producción de ROS elevada y la dispersión uniforme del nanocompuesto, que dieron como resultado excelentes actividades antibacterianas contra *E. coli* y *S. aureus*.

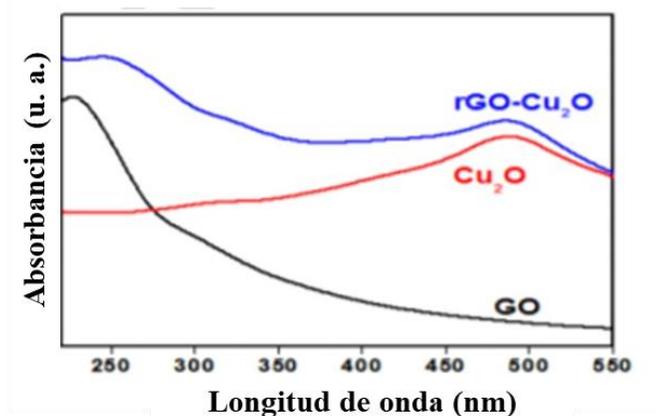


Figura 2.10 Espectro de absorción UV-Vis de GO, Cu₂ONPs y rGO-Cu₂O [84].

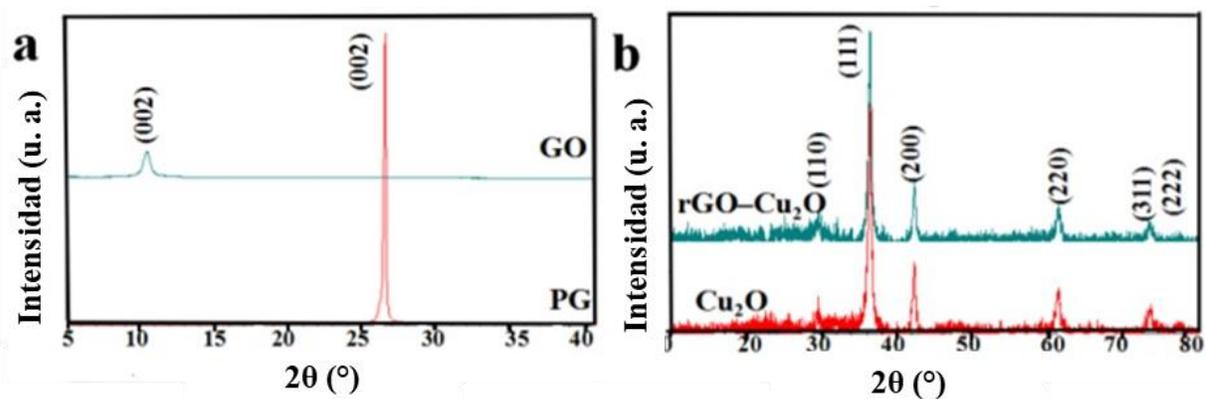


Figura 2.11 (a) Patrón de DRX del grafito prístino (PG) y óxido de grafeno (GO) y (b) nanocomposito rGO-Cu₂O y Cu₂ONPs [84].

Navya y Col. [85] sintetizaron un nanocompuesto Cu₂O/rGO por una ruta fitoquímica simple usando el extracto de flor de *Tagetes erecta* (caléndula) vía *in-situ*, observaron un cambio de coloración de marrón rojizo a negro, indicativo de la reducción de GO y formación de Cu₂ONPs. Los resultados de DRX confirmaron la formación de Cu₂ONPs en rGO con un tamaño promedio

de 22 nm. El nanomaterial híbrido Cu₂O/rGO mostró una mayor actividad antibacterial que el rGO solo contra *B. subtilis* (gram positiva) y *E. coli* (gram negativa), utilizando el método de difusión en agar, la zona de inhibición resultó comparable con el antibiótico comercial ampicilina (Figura 2.12).

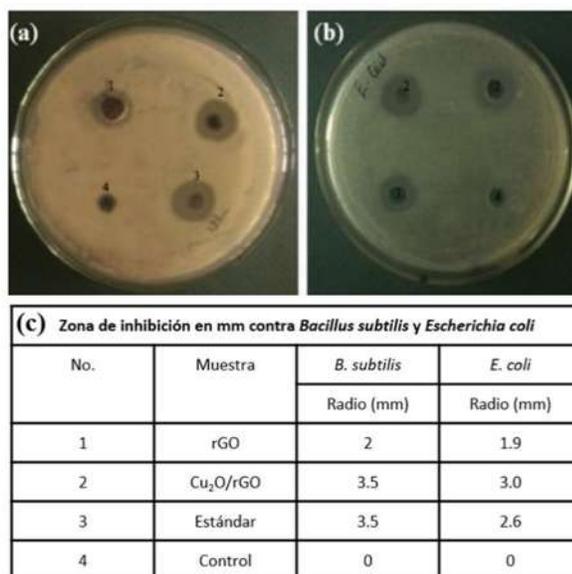


Figura 2.12 Fotografías del método de difusión en agar contra (a) *Bacillus subtilis* y (b) *Escherichia coli* para rGO (1), Cu₂O/rGO (2), estándar (3) y control (4), y (c) zona de inhibición en mm contra las dos bacterias [85].

2.6.2.3 Ag/Cu₂O/rGO

Sharma y Col. [86] sintetizaron un nanocompuesto ternario Ag-Cu₂O/rGO mediante un enfoque fácil y verde usando solución de Benedict y glucosa a temperatura ambiente. Primero, sintetizaron el nanocompuesto Cu₂O/rGO con GO (0.5 mg/mL), la solución de Benedict (0.04 M) y glucosa (0.5 M), recuperaron los sólidos obtenidos y los lavaron con agua desionizada y etanol. La muestra la pusieron a secar a 60 °C. El nanocompuesto ternario lo obtuvieron adicionando 1 mL de AgNO₃ (0.1 M) a la dispersión acuosa de Cu₂O/rGO, y repitieron el proceso de lavado y secado. Caracterizaron los nanocompuestos obtenidos por espectroscopía UV-Vis, FT-IR y Raman, así como por las técnicas de DRX, MEB y MET. En la Figura 2.13 se muestran los patrones de DRX de GO, Cu₂O/rGO y Ag-Cu₂O/rGO, el difractograma de GO exhibió un pico agudo a 10.5° indexado al plano (001) de su estructura hexagonal, que desapareció en el patrón de Cu₂O/rGO y

Ag-Cu₂O/rGO, lo cual atribuyeron a su reducción. El patrón de Cu₂O/rGO mostró picos centrados a $2\theta = 29.8, 36.5, 42.2, 61.3, 73.6$ y 76.5° indexados a los planos (110), (111), (200), (220) y (311) de la estructura cristalina cúbica simple del Cu₂O. Para el nanocompuesto Ag-Cu₂O/rGO notaron la presencia de picos adicionales a $2\theta = 38, 44.1, 64.5$ y 77.5° correspondientes a los planos (111), (200), (220) y (311) de la estructura cristalina fcc de las AgNPs, atribuyendo la débil intensidad de estos picos a la baja cantidad de Ag, además, no observaron el pico de rGO por su bajo porcentaje y la depositación de AgNPs y Cu₂ONPs en su superficie.

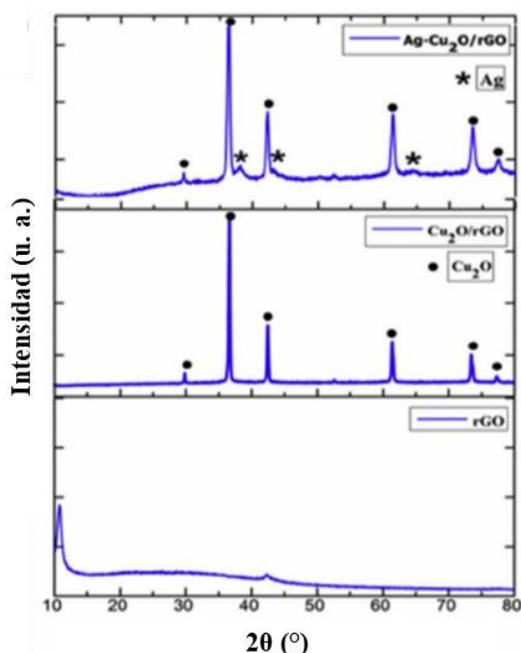


Figura 2.13 Patrones de DRX de rGO, Cu₂O/rGO y Ag-Cu₂O/rGO [86].

Mediante MEB y MET determinaron la morfología de los nanocompuestos. La Figura 2.14A-C muestra la presencia de AgNPs esféricas de tamaño ~60 nm depositadas en el Cu₂O situado en la superficie de las láminas de rGO, sin embargo, también observaron AgNPs directamente en el rGO. La imagen de alta resolución (HRTEM) del nanocompuesto ternario mostró franjas con un espaciado de 0.23 y 0.24 nm, correspondientes a los planos (111) de Ag y Cu₂O, respectivamente (Figura 2.14D).

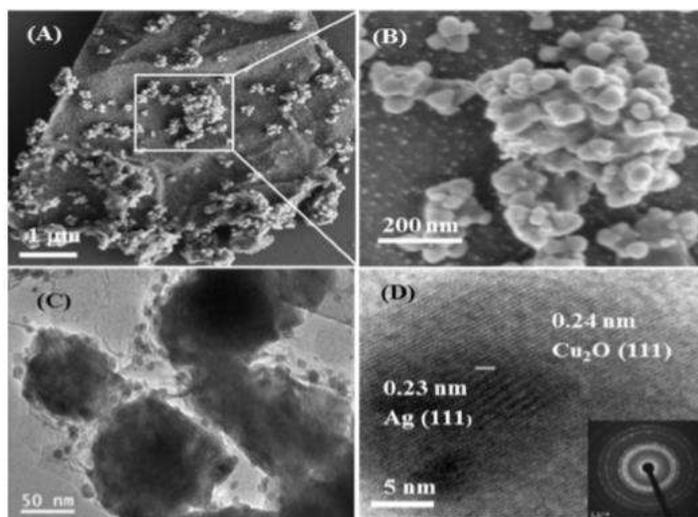


Figura 2.14 (A-C) Imágenes de MEB y MET del nanocompuesto Ag-Cu₂O/rGO y (D) Imagen HRTEM de Ag-Cu₂O/rGO que muestra las redes cristalinas de Ag y Cu₂O, el recuadro presenta el patrón SAED de Ag-Cu₂O/rGO [86].

Guo y Col. [87] sintetizaron un nanocompuesto Ag@Cu₂O-rGO para lo cual primero obtuvieron Ag-rGO. A una solución de GO añadieron AgNO₃ y lo mantuvieron a 90 °C por 30 min, después añadieron 4 mL de citrato de sodio (C₆H₅-Na₃O₇·2H₂O, 1%) e incubaron la solución a 85 °C por 30 min hasta apreciar un cambio de coloración a verde oscuro. Para el nanocompuesto ternario dispersaron 20 mL de la solución de Ag-rGO en 50 mL de Cu(NO₃)₂ con 1 g de PVP y añadieron 45 mL de H₄N₂·2H₂O bajo agitación magnética a 90 °C (variaron la concentración de Cu(NO₃)₂ y volumen de H₄N₂·2H₂O), recuperaron, lavaron y almacenaron los nanosólidos a 4 °C. Obtuvieron nanopartículas núcleo-coraza de Ag@Cu₂O. Caracterizaron los nanocompuesto por MEB, MET, espectroscopía Raman y XPS. La Figura 2.15 A-F muestra las imágenes de MEB de Ag@Cu₂O/rGO preparadas mediante la reducción de Cu(NO₃)₂ con diferentes concentraciones: 0, 2, 4, 6, 8 y 10 mM, respectivamente, observaron que todas las plataformas fueron decoradas por nanopartículas núcleo-coraza Ag@Cu₂O distribuidas sin aglomeración evidente. Observaron que los tamaños de Ag@Cu₂O aumentan gradualmente a medida que aumentaban la concentración de Cu(NO₃)₂. Mediante las imágenes de MET mostraron Cu₂ONPs en la superficie de Ag cuando se agrega Cu(NO₃)₂ y la estructura perfecta de la coraza la encontraron cuando la concentración de Cu(NO₃)₂ fue mayor a 6 mM, además, notaron un aumento en el grosor de la cubierta de 10 ± 2 nm para 6 mM a 13 ± 2 nm para 10 mM, respectivamente, pero el tamaño del núcleo permaneció constante (14 ± 3 nm).

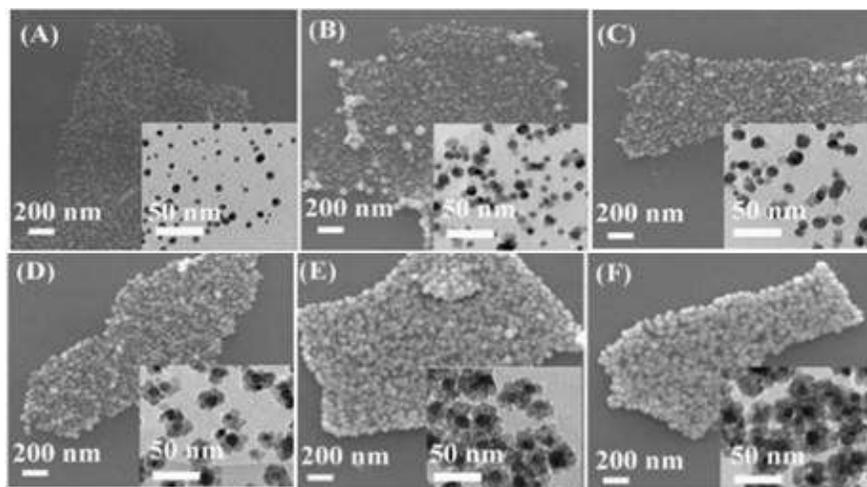


Figura 2.15 Imágenes de (A) nanocompuesto Ag-rGO y Ag@Cu₂O/rGO con diferentes concentraciones de solución de Cu(NO₃)₂ ((B-F) 2 mM, 4 mM, 6 mM, 8 mM y 10 mM). Las inserciones son las imágenes correspondientes de MET [87].

Guo y Col. [88] sintetizaron un nanocompuesto Ag-Cu₂O/rGO mediante un procedimiento de reducción *in-situ* de dos pasos a temperatura ambiente. Primero, sintetizaron el nanocompuesto Cu₂O/rGO con GO, Cu(NO₃)₂·3H₂O y N₂H₄·3H₂O mediante agitación, el sólido obtenido se recuperó, lavó y secó al vacío. Para el nanocompuesto Ag-Cu₂O/rGO, dispersaron el nanocompuesto binario, lo pusieron en agitación constante y agregaron AgNO₃ (5 mM) y repitieron el proceso de recuperación, lavado y secado. Caracterizaron los nanocompuestos por MEB, DRX y espectroscopías Raman, FT-IR y XPS. La Figura 2.16 muestra los espectros Raman de GO, Cu₂O/rGO y Ag-Cu₂O/rGO. Observaron una banda G a 1604 cm⁻¹ y una banda D a 1349 cm⁻¹ para GO. Después de la reducción con hidracina, la banda G de rGO cambió de 1604 a 1601 cm⁻¹ debido a la conversión de los dobles enlaces aislados en GO en enlaces dobles conjugados en rGO. Las relaciones de intensidad I_D/I_G de Cu₂O/rGO (0.92) y Ag-Cu₂O/rGO (0.94) fueron mayores que las de GO (0.70), lo cual atribuyeron a que la reducción con hidracina disminuye el número de grupos funcionales oxigenados. Además, observaron que la reducción directa de AgNO₃ dio como resultado el depósito selectivo de AgNPs en la superficie de Cu₂O.

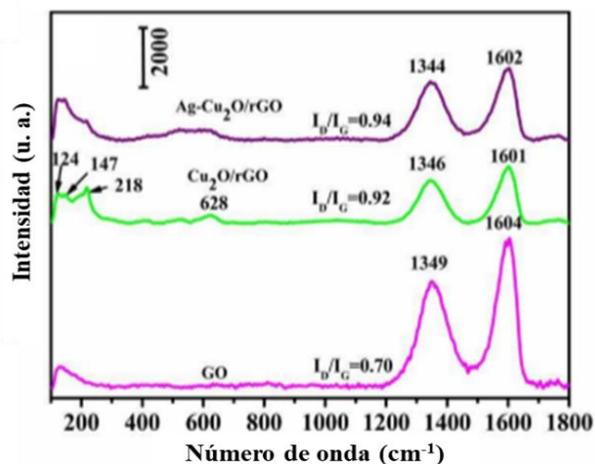


Figura 2.16 Espectro Raman de GO, Cu₂O/rGO y Ag-Cu₂O/rGO [88].

Jankauskaite y Col. [89], realizaron un análisis sistemático de la actividad antibacteriana de nanoderivados individuales, nanohojas de GO, AgNPs y CuNPs, así como combinaciones de Cu-AgNPs y nanocompuestos GO-Cu-Ag, es decir vía *ex-situ*, contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* y *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA). La síntesis asistida por microondas de las AgNPs usando benzo-18-crown-6 como agente reductor, mientras que las CuNPs usando ácido ascórbico. Determinaron las propiedades químicas de GO, CuNPs y AgNPs mediante espectroscopía fotoelectrónica de rayos-X y espectroscopía electrónica Auger. Además, estudiaron la morfología de los nanoderivados correspondientes empleando MEB y MET, como se muestra en la Figura 2.17 (a, c) y Figura 2.18 (a, b, c). La Figura 2.17b presenta el análisis químico EDS del nanocompuesto ternario GO-Cu-Ag, mediante el cual comprobaron la presencia de carbono, plata y cobre, elementos que constituyen el nanomaterial.

Demostraron que la combinación de CuNPs y AgNPs, así como el material nanocompuesto GO-Cu-Ag posee una actividad antibacteriana mejorada a través de una posible sinergia entre múltiples mecanismos de toxicidad, pero la MRSA mostró mayor resistencia en todos los casos, como se muestra en las curvas de supervivencia de tiempo vs unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL) de la Figura 2.17d y Figura 2.18 (a₁, b₁, c₁).

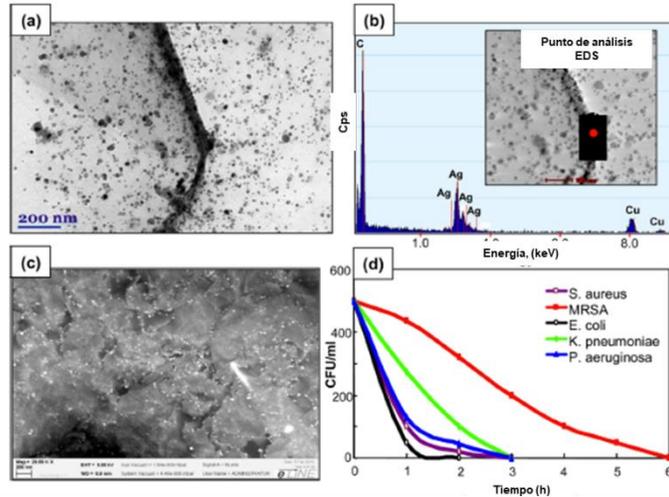


Figura 2.17 (a) Micrografía de MET del nanocompuesto GO-Cu-AgNPs, (b) espectro EDS del nanocompuesto GO-Cu-AgNPs; insertado: indicando donde se realizó el análisis, (c) micrografía de MEB del nanocompuesto de GO-Cu-AgNPs y (d) curvas de supervivencia de diferentes cepas bacterianas durante un periodo de 6 h empleando el nanocompuesto [89].

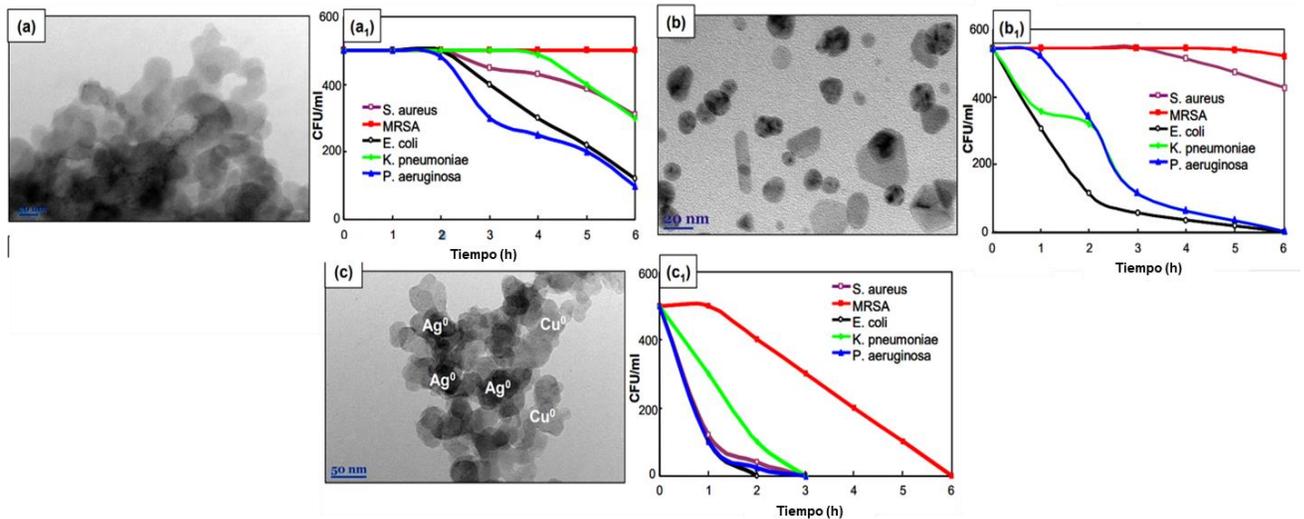
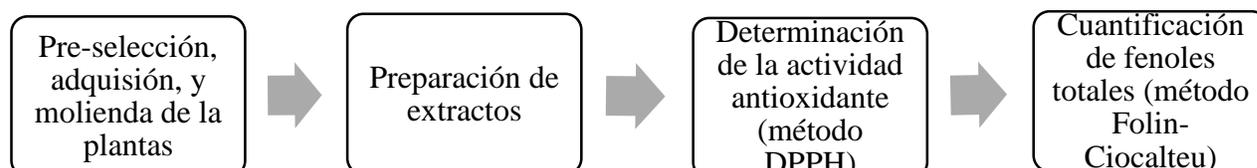


Figura 2.18 Micrografías de MET de (a) Cu, (b) Ag y (c) Cu-AgNPs. Curvas de supervivencia de diferentes cepas bacterianas durante un periodo de 6 h con (a1) Cu, (b1) Ag y (c1) Cu-AgNPs como agente antibacterial, respectivamente [89].

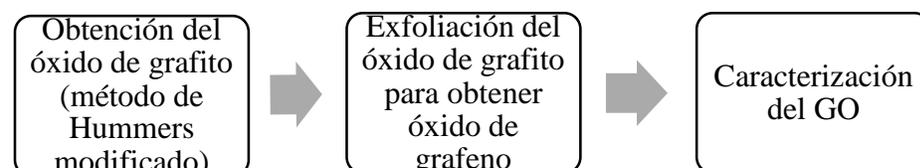
CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En la Figura 3.1 se muestra un diagrama de la metodología experimental general seguida para la síntesis y caracterización de los nanocompuestos Ag/rGO y Cu₂O/rGO.

Primera etapa: Preselección de la planta



Segunda etapa: Obtención del óxido de grafeno



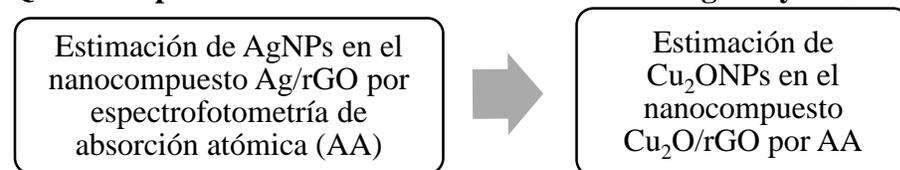
Tercera etapa: Biosíntesis del nanocompuesto Ag/rGO



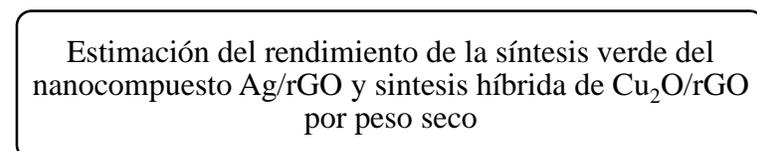
Cuarta etapa: Síntesis híbrida del nanocompuesto Cu₂O/rGO



Quinta etapa: Estimación de la concentración de AgNPs y Cu₂ONPs



Sexta etapa: Rendimiento de síntesis por peso seco



Séptima etapa: Evaluación antibacteriana

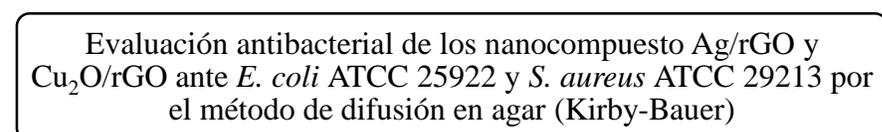


Figura 3.1 Diagrama por etapas (1ra. – 7ma.) de la metodología experimental.

3.1 Reactivos utilizados para las diferentes etapas del proyecto

A continuación, se enlistan los reactivos utilizados para el desarrollo de este proyecto:

- DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo), pureza 97%, grado ACS, Sigma Aldrich.
- Reactivo de Folin-Ciocalteu, grado ACS, Sigma Aldrich.
- Ácido gálico, pureza 97.5%, grado ACS, Sigma Aldrich.
- Na_2CO_3 , grado ACS, Sigma Aldrich.
- Polvo de Grafito, pureza >99%, Lote #592, Leco.
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado, 95-98%, grado ACS, Lote #C0918610, Meyer.
- Ácido fosfórico (H_3PO_4), pureza $\geq 85\%$, grado ACS, Lote #C0918600, Meyer.
- Permanganato de potasio (KMnO_4), pureza $\geq 99.0\%$, grado ACS, Lote #M0618372, Meyer.
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) concentración al 30%, grado ACS.
- Alcohol etílico ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$), pureza $\geq 99.5\%$, grado ACS, Lote #B0918603, Meyer.
- Ácido clorhídrico (HCl) concentrado al 37%.
- Éter etílico ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$), pureza $\geq 99\%$, grado ACS, Lote #Z1118745, Meyer.
- Nitrato de plata (AgNO_3), pureza $\geq 98\%$, grado ACS, Lote M1011617.
- Cloruro de cobre ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), pureza 99.4%, grado ACS, J. T. Baker.
- Agar Muller Hinton, Lote #8138616, BD Bioxon.
- Cloruro de sodio NaCl , grado ACS, Lote #0901114, Meyer.

3.2 Primera etapa: Preselección de la planta

Esta etapa comprende la adquisición y molienda de las plantas, la preparación de los extractos, así como, las pruebas fitoquímicas de la determinación de la capacidad antioxidante por el método 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) y la cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.

3.2.1 Preselección, adquisición y molienda de la planta

Las plantas preseleccionadas como candidatas para la síntesis verde de nanocompuestos de grafeno decorados con nanopartículas fueron: *Cuphea aequipetala* (hierba del cáncer), *Oenothera rosea* L'Hér. ex Aiton (hierba del golpe), *Gentiana spathacea* Kunth (flor de hielo), *Zornia thymifolia* Kunth (hierba de la víbora) y *Haematoxylum brasiletto* (palo de brasil), fueron pre-seleccionadas principalmente porque no han sido utilizadas anteriormente tanto para la reducción del GO como para la síntesis verde de nanopartículas en base a lo reportado en la literatura. Estas plantas fueron adquiridas en el mercado Independencia de la ciudad de Morelia, Michoacán. Las plantas tal como se adquirieron fueron sometidas a trituración mediante un mortero, para lograr un polvo fino que permita realizar una extracción mayor de biomoléculas presentes en ellas al momento de preparar el extracto que a continuación se menciona.

3.2.2 Preparación de extractos

Se utilizó 1 g de las plantas previamente trituradas que se colocó en un matraz Erlenmeyer, al cual se le agregó 50 mL de agua desionizada y se mantuvo a 60 °C bajo agitación por 20 min en un termoagitador de la marca Thermo Scientific. Posteriormente, se filtró mediante un papel filtro Whatman No. 4, en donde el sólido se desechó y el líquido fue filtrado y utilizado para realizar las pruebas de determinación de potencial antioxidante por medio del método de DPPH y cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. Se pretendió que el extracto de la planta seleccionada, cuyos valores más altos en estas dos pruebas, fuera un criterio para realizar exitosamente la síntesis de los nanocompuestos Ag/rGO y Cu₂O/rGO.

3.2.3 Determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH

Para la determinación de actividad antioxidante de los extractos de las plantas, objeto de estudio, se utilizó el método de radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), el cual consiste en la reducción del radical en 2,2-difenil-1-picrilhidrazina, por la acción antioxidante de compuestos que contengan grupos –OH que provocan la decoloración del reactivo [90], como se muestra en la Figura 3.2. Para lo cual se tomaron 100 µL del extracto mezclados con 900 µL de agua desionizada,

a los cuales se les adicionaron 1000 μL de DPPH 0.2 mM. Se empleó como blanco 100 μL de etanol, 900 μL de agua desionizada y 1000 μL de DPPH. Todo el estudio se realizó por duplicado. Las reacciones fueron llevadas a cabo a temperatura ambiente durante 20 min protegidas de la luz. Posteriormente, se midió la absorbancia a 517 nm [91] en un espectrofotómetro UV/Vis Perkin Elmer Lambda 18.

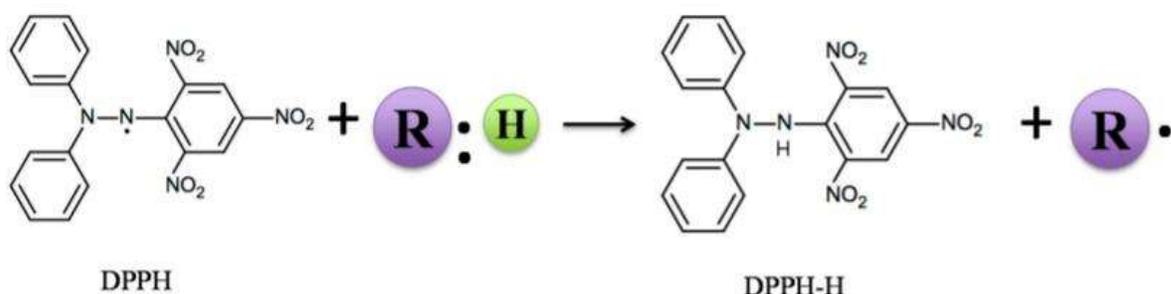


Figura 3.2 Mecanismo de reacción del 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) con antioxidante. R: H = eliminador de radicales antioxidantes; R = radical antioxidante. [92].

La actividad antioxidante se expresa como porcentaje de inhibición lo cual corresponde a la cantidad de radical libre (DPPH) neutralizado por el extracto a una determinada concentración, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\%Inhibición = \%I = \frac{Abs_{blanco} - Abs_{muestra}}{Abs_{blanco}} * 100 \quad (\text{Ecuación 3.1})$$

3.2.4 Determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

Se cuantificaron los compuestos fenólicos totales en las plantas, objetos de estudio, por el método de Folin-Ciocalteu. El cual se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes, el reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungsteno sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico [93]. La curva de calibración de ácido gálico se realizó en base a la preparación de los reactivos correspondientes, es decir reactivo de Folin-Ciocalteu 10% v/v y Na_2CO_3 al 700 mM, se prepararon estándares de ácido gálico mediante una solución stock 1 mg/mL, que se adicionó a cada tubo en la cantidad correspondiente de solución de ácido gálico, agua desionizada, reactivo de Folin y carbonato de

sodio (Tabla 3.1), posteriormente se midieron los datos para la curva de calibración estándar del ácido gálico a 765 nm.

Tabla 3.1 Datos para la obtención de la curva de calibración de fenoles totales.

No. de tubo	Solución de ácido gálico (μL)	Agua desionizada (μL)	Reactivo Folin (μL)	Solución Na ₂ CO ₃ (μL)
Blanco	0.00	200.00	200.00	800.00
1	6.25	193.75		
2	12.50	187.5		
3	25.00	175		

Se cuantificó la cantidad de fenoles totales presentes en la muestra de cada extracto de planta. Para ello se tomaron 100 μL del extracto previamente preparado, se le agregaron 100 μL de agua desionizada, 200 μL de reactivo de Folin y 800 μL de Na₂CO₃ de acuerdo a lo señalado en [94] y se determinó la cantidad total de fenoles de cada uno de los extractos en base a la curva de calibración con ácido gálico, teniendo así cantidades de equivalentes de ácido gálico por mL (EAG/mL).

3.3 Segunda etapa: Obtención del óxido de grafeno

La síntesis de los nanocompuestos se realizó en distintas etapas, para lo cual primero se preparó el óxido de grafito mediante el método de Hummers modificado por Marcano y Col. [60], mismo que se exfolió para obtener el óxido de grafeno (GO).

3.3.1 Obtención de óxido de grafito

Para la obtención del óxido de grafito se siguió el método Hummers modificado por Marcano y Col. [60], el cual consiste en añadir lentamente 1.8 g de KMnO₄ en seis porciones iguales a una mezcla 9:1 de H₂SO₄ y H₃PO₄ (36:4 mL) y polvo de grafito (0.3 g) produciéndose una ligera reacción exotérmica de 35-40 °C. Posteriormente, se calentó la reacción hasta 50°C bajo agitación

constante por un periodo de 12 h, en seguida, la reacción fue enfriada hasta temperatura ambiente y vertida en hielo (40 mL) con H₂O₂ 30% (0.3 mL), reactivo que se encarga de reducir el exceso de permanganato y dióxido de manganeso que no participaron en la reacción. Posteriormente, la solución fue centrifugada a 4000 rpm por 4 h y el sobrenadante desechado. El material sólido se purificó mediante una serie de lavados subsecuentes con 20 mL de agua, 20 mL de HCl 30%, 20 mL de etanol (dos veces), para cada lavado las soluciones fueron centrifugadas a 4000 rpm por 4 h y se desechó el sobrenadante. El material obtenido coaguló en 20 mL de éter y la suspensión resultante se filtró por medio de una membrana Whatman No. 42 dejándola secar en un horno por una noche a 50 °C.

3.3.2 Exfoliación del óxido de grafito para obtener óxido de grafeno (GO)

Se exfolió el óxido de grafito obtenido en un baño de ultrasonido Branson modelo 1510 a una concentración de 0.08 mg/mL por intervalos de 5 min y se midió la absorbancia en espectroscopía UV-Vis.

3.4 Tercera etapa: Biosíntesis del nanocompuesto Ag/rGO

Posteriormente, la tercera etapa del proyecto consistió en realizar la reducción del óxido de grafeno con las biomoléculas presentes en el extracto de la planta seleccionada (en base a los estudios de capacidad antioxidante y cantidad de fenoles totales) en presencia de la sal metálica precursora (AgNO₃) para depositar AgNPs y de manera simultánea reducir el GO, es decir utilizando el método *in-situ*. Primeramente, se hicieron unas pruebas de síntesis de AgNPs con la hierba medicinal preseleccionada en la etapa 1 de la metodología experimental de este proyecto.

3.4.1 *Cuphea aequipetala* (hierba del cáncer)

Se biosintetizaron AgNPs con el extracto acuoso de la planta medicinal hierba del Cáncer (*Cuphea aequipetala*) preparado a 60 °C por 20 min con una concentración 0.02 mg/mL. Se utilizó una relación volumétrica 1:1 de extracto acuoso y sal precursora AgNO₃ y se varió la concentración de sal precursora (1, 3 y 5 mM).

3.4.2 *Haematoxylum brasiletto* (palo de brasil)

De manera análoga a señalado en la sección 3.4.1, se utilizaron las mismas condiciones para sintetizar AgNPs variando ahora la planta utilizada para la preparación del extracto acuoso, siendo *Haematoxylum brasiletto* (palo de brasil).

Posteriormente, se utilizó el mismo extracto acuoso de *Haematoxylum brasiletto* (palo de brasil) para la biosíntesis del nanocomposito Ag/rGO. Se utilizó una relación volumétrica 1:1:1 de GO, extracto acuoso de la planta y AgNO₃ 1 mM bajo agitación constante de 6 STIR y adición de la sal precursora por goteo con una bureta.

3.4.2.1 Eliminación del cloro

Con el propósito de eliminar el cloro presente en el extracto acuoso de *Haematoxylum brasiletto* (palo de brasil) se hicieron una serie de ensayos. Para el primer ensayo se utilizó 1 g de la planta con 50 mL de agua desionizada, se hicieron tres lavados consecutivos por 20 min bajo agitación constante de 10 STIR, para cada lavado se separó el sobrenadante y el sólido restante se utilizó para los lavados posteriores, finalmente se preparó la infusión con el sólido proveniente del tercer lavado a 60 °C por un período de 20 min bajo agitación constante de 6 STIR. Mientras que, para el segundo ensayo, se utilizó la misma concentración de 0.02 g/mL, se preparó una infusión a 60 °C por 20 min bajo agitación constante de 10 STIR, se separó el sobrenadante y el sedimento, con el sedimento se preparó una nueva infusión bajo las mismas condiciones. Con los diferentes sobrenadantes obtenidos de cada uno de los lavados y de las infusiones se sintetizaron AgNPs, se utilizó una relación volumétrica 1:1 de extracto y sal precursora AgNO₃ 1 mM.

3.4.3 *Tamarix gallica* (taray)

El extracto acuoso de *Tamarix gallica* (taray) ha sido utilizado por López-Miranda y Col. [95] para la síntesis exitosa de AgNPs, quienes obtuvieron los mejores resultados de síntesis para la muestra de concentración de extracto 0.15 mg/mL y AgNO₃ 5 mM. En base a lo anterior, se biosintetizó el nanocompuesto Ag/rGO, se preparó el extracto acuoso de manera análoga a lo señalado en la

sección 3.2.2. Se utilizó una relación volumétrica 1:1:1 de GO, extracto acuoso de *Tamarix gallica* (taray) y AgNO_3 5 mM, la cual se añadió por goteo por medio de una bureta, manteniendo la solución bajo agitación constante 6 STIR. Posteriormente, se varió la relación volumétrica a 5:1:1 y 10:1:1, manteniendo constantes todos los demás parámetros. Los sólidos fueron recuperados por centrifugación a 12,000 rpm y lavados cinco veces con agua desionizada por centrifugación.

3.5 Cuarta etapa: Síntesis híbrida del nanocompuesto $\text{Cu}_2\text{O}/\text{rGO}$

La síntesis híbrida del nanocompuesto $\text{Cu}_2\text{O}/\text{rGO}$ se basó en la metodología señalada por Aguilar y Col. [96], quienes sintetizaron Cu_2ONPs con NaBH_4 26 mM, CuCl_2 15 mM y extracto acuoso de *Origanum vulgare* (orégano). Para el nanocompuesto $\text{Cu}_2\text{O}/\text{rGO}$ se exfoliaron 0.004 g de GO en 12 mL de NaBH_4 (26 mM), posteriormente, se agitó a 6 STIR y se agregaron 2.5 mL de extracto acuoso de *Tamarix gallica* (taray) como agente estabilizador, finalmente por goteo se añadió la sal precursora CuCl_2 15 mM. Los sólidos fueron recuperados por centrifugación a 12,000 rpm y lavados cinco veces con agua desionizada por un proceso de centrifugación.

3.6 Caracterización de los nanomateriales

La caracterización de los nanomateriales obtenidos se realizó mediante la aplicación de distintas técnicas, que son complementarias entre sí, mismas que se señalan a continuación.

Para el análisis de espectroscopía UV-Vis se utilizaron un espectrómetro Perkin Elmer 18, otro Ocean Optics USB 4000 y finalmente, un Perkin Elmer Lambda 35, mediante esta técnica se comprobó la formación de GO, así como de las NPs depositadas en el rGO, debido a que estas NPs presentan el fenómeno de resonancia de plasmón superficial, que es típico de estos nanosólidos, con lo cual, además, se obtuvo información del tamaño, forma y cantidad de las NPs, además, se comprobó la reducción del GO.

Mediante estudios de microscopía electrónica de barrido (MEB) se observaron y caracterizaron morfológicamente los nanocompuestos, además, de que éstos cuentan con la técnica de espectroscopía de dispersión de energía (EDS) para realizar un análisis químico. Se utilizó un

microscopio electrónico de barrido de emisión de campo con efecto Schottky marca JEOL JSM-7600F.

La técnica de microscopía electrónica de transmisión por barrido (METB), la cual combina los principios de microscopía electrónica de transmisión y microscopía electrónica de barrido, se utilizó para analizar la diferencia de contraste entre las NPs y el rGO, así como comprobar la síntesis de los nanocompuestos. Se utilizó un microscopio Hitachi SU8230, instalado en el Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA, Juriquilla, Qro.), que trabaja a 30 kV con una resolución de 0.7 nm. Las muestras se prepararon colocando una gota de las soluciones de los nanomateriales sintetizados directamente sobre las rejillas de cobre.

Por medio de difracción de rayos-X (DRX) se determinó la estructura cristalina de los nanocompuestos sintetizados, además, se comprobó la reducción del GO. Se utilizó un difractómetro Bruker modelo D8-Advance que trabaja a 40 kV. Los nanomateriales se secaron en un horno a 50 °C para obtener así polvos. Se analizaron en un rango angular de 5-80°, a un tiempo por paso de 0.6 s y un incremento de 0.020°.

Con la espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR) se realizó un análisis químico para identificar los grupos funcionales presentes en el extracto de la planta medicinal, antes y después de la bio-reducción, así como el GO y los nanocompuestos. Se utilizó un espectrofotómetro infrarrojo Bruker Tensor 27. Se elaboraron pastillas con las muestras secas y KBr.

Adicionalmente, se determinó la densidad real del GO sintetizado por medio del método de las cuatro masas, para lo cual primero se determinó la masa del picnómetro seco y vacío (M_0), después se llenó de agua destilada, así se obtuvo la segunda masa (M_1). Se agregó la muestra en polvo (óxido de grafeno) al picnómetro seco y vacío y se determinó la tercera masa (m_s), finalmente se aforo el picnómetro con agua destilada dejando ahí el polvo y se determinó la cuarta masa (M_2). Se midió la temperatura del ambiente. Se hicieron los cálculos correspondientes para determinar la densidad real del GO en base a la siguiente ecuación [97]:

$$\rho_s = \rho_L \frac{m_s}{[(M_1 - M_0) + m_s - (M_2 - M_0)]} \quad (\text{Ecuación 3.2})$$

donde:

ρ_s = densidad del sólido

ρ_L = densidad del líquido

M_0 = masa del picnómetro vacío

m_s = masa del sólido

M_1 = masa del picnómetro lleno de agua

M_2 = masa del picnómetro con el sólido lleno de agua

Finalmente, se determinó la distribución del tamaño de las películas del GO con un analizador de partícula automático centrífugo Horiba CAPA-300, con los datos de la densidad verdadera del GO (1.4572 g/mL), viscosidad y densidad del disolvente que se utilizó para dispersar la muestra ($\mu_{H_2O@20^\circ C} = 1.0020 \text{ cP} \sim 1.0 \text{ cP}$, $\rho_{H_2O@20^\circ C} = 0.9982 \frac{\text{g}}{\text{mL}} \sim 1.0 \frac{\text{g}}{\text{mL}}$), se utilizó un rango de diámetro máximo a mínimo de 10-1 μm con una división de 1 μm .

3.7 Quinta etapa: Estimación de la concentración de NPs por espectrofotometría de AA

Para conocer la concentración de Ag y Cu₂O presente en los nanocompuestos sintetizados, se empleó la técnica de espectrofotometría de absorción atómica, la cual por un cálculo indirecto brinda una aproximación de dicha concentración.

3.7.1 AgNPs

La espectrofotometría de absorción atómica (AA) es un método para la detección y la determinación de elementos químicos, particularmente de elementos metálicos. Los compuestos, para su análisis elemental, se tienen que separar en los átomos que los constituyen [98]. Para la estimación de AgNPs presentes en los nanocompuestos sintetizados, se prepararon estándares de concentraciones de Ag definidas, a partir de un estándar de Ag marca Perkin Elmer, en HNO₃ al 2%, como se muestra en la Tabla 3.2, donde C₁ representa las diferentes concentraciones de Ag a obtener en base al rango de detección del equipo, V₁ es el volumen de aforo, C₂ es la concentración del estándar conocido (1000 mg/mL) y V₂ representa el volumen del estándar necesario para

obtener la concentración de Ag deseada. Se utilizó un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer modelo 3100.

Para la estimación de AgNPs en los nanocompuestos sintetizados se recuperaron los sólidos por centrifugación a 12,000 rpm y se midió el sobrenadante en espectroscopía UV-Vis hasta la nula aparición de la banda de absorción de estos nanosólidos.

Tabla 3.2 Estándares de la curva de calibración para la estimación de AgNPs.

C₁ (ppm)	V₁ (mL)	C₂ (ppm)	V₂ (mL)
0.2	25	1000	0.005
1.0			0.025
2.0			0.050
4.0			0.100

La sal precursora AgNO₃ (5 mM) y el sobrenadante se analizaron por espectroscopía AA y la diferencia entre ambas concentraciones representa la cantidad de AgNPs sintetizadas, en base a la siguiente ecuación:

$$C_{AgNPs} = C_{sal\ precursora} - C_{sobrenadante} \quad (\text{Ecuación 3.3})$$

Aunado a lo anterior, también se calculó el porcentaje de rendimiento de la reacción, en base a la siguiente ecuación:

$$\%Rendimiento = \frac{C_{sal\ precursora} - C_{sobrenadante}}{C_{sal\ precursora}} * 100\% = \frac{C_{AgNPs}}{C_{sal\ precursora}} * 100\% \quad (\text{Ecuación 3.4})$$

3.7.2 Cu₂ONPs

Para la estimación de la concentración de Cu₂ONPs presentes en el nanocompuesto Cu₂O/rGO se realizó un procedimiento análogo al señalado en la sección 3.7.1. Se prepararon estándares de concentraciones de Cu definidas, a partir de un estándar de Cu marca Perkin Elmer, en HNO₃ al 2%, como se muestra en la Tabla 3.3, donde C₁ representa las diferentes concentraciones de Cu,

V_1 es el volumen de aforo, C_2 es la concentración del estándar (1000 mg/mL) y V_2 representa el volumen del estándar necesario para obtener la concentración de Cu deseada. Se recuperaron los sólidos por centrifugación a 12,000 rpm y se midió el sobrenadante en espectroscopía UV-Vis hasta la nula aparición de la banda de absorción de estos nanosólidos. Además, se midió la concentración de la sal precursora CuCl_2 15 mM y acorde a las ecuaciones 3.3 y 3.4 se realizaron los cálculos.

Tabla 3.3 Estándares de la curva de calibración para la estimación de Cu_2ONPs .

C_1 (ppm)	V_1 (mL)	C_2 (ppm)	V_2 (mL)
1.0	25	1000	0.025
2.0			0.050
3.0			0.075
4.0			0.100
5.0			0.125

3.8 Sexta etapa: Rendimiento de síntesis por peso seco

Se determinó el rendimiento de síntesis por peso seco para la síntesis verde del nanocompuesto Ag/rGO y la síntesis híbrida de $\text{Cu}_2\text{O}/\text{rGO}$. Primero, se calculó la cantidad de extracto acuoso obtenido por 1 g de *Tamarix gallica* (taray) a una concentración de 0.02 g/mL.

Se colocaron dos charolas para pesaje en un horno a 50° C por 24 h. Transcurrido el tiempo se pesaron. Se preparó el nanocompuesto Ag/rGO con una relación volumétrica 5:1:1 de GO, extracto acuoso de *Tamarix gallica* (taray) y sal precursora AgNO_3 5 mM, una vez completada la reacción, los sólidos se recuperación por centrifugación a 12,000 rpm y se lavaron. Se colocaron en una de las charolas y se pusieron a secar bajo las mismas condiciones. Transcurridas las 24 h se pesó nuevamente.

Para el nanocompuesto $\text{Cu}_2\text{O}/\text{rGO}$, se utilizaron 12 mL de NaBH_4 26 mM, 10 mL de CuCl_2 15 mM, 2.5 mL de extracto acuoso de *Tamarix gallica* (taray) y 0.004 g de GO. Completada la reacción, los sólidos se recuperaron por centrifugación a 12,000 rpm y se lavaron. Se realizó el mismo procedimiento para la determinación del peso seco que con el nanocompuesto Ag/rGO. Los

sólidos obtenidos se colocaron en la charola de pesaje y por diferencias de pesos se determinó la cantidad de nanocompuesto sintetizado, como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento por peso seco} = m_{\text{charola+sólidos}} - m_{\text{charola}} \quad (\text{Ecuación 3.5})$$

3.9 Séptima etapa: Evaluación antibacterial

La actividad antibacterial de los nanocompuestos se determinó por el método de difusión en disco (Kirby-Bauer) de acuerdo a lo señalado en [99], para lo cual las cepas seleccionadas (*E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 29213) se cultivaron agar Muller-Hinton con la técnica de estría cruzada por 24 h a 37 °C, temperatura idónea para el crecimiento bacteriano. Posteriormente, se preparó el inóculo, se tomó con el asa bacteriológica una cantidad media de las bacterias de cada caja Petri y se sumergieron en 15 mL de solución salina 4%, agitándose hasta disolverse por completo, se verificó con la absorbancia a 625 nm en espectroscopía UV-Vis con valores entre 0.08 a 0.1 unidades. Después, con un hisopo estéril se sembró la solución de bacterias preparada en agar Müller Hinton y se dejó secar. Se impregnaron los sensidiscos con los nanocompuestos sintetizados, el control negativo (agua desionizada) y el control positivo (eritromicina) y se colocaron sobre la superficie de la placa de agar inoculada. Finalmente, se midieron los halos de inhibición con un Vernier incluyendo el diámetro de los discos después de un tiempo de incubación de 48 h a 37 °C.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se muestran los resultados obtenidos de todo el proyecto de investigación, así como, la discusión de los mismos.

4.1 Pruebas fitoquímicas de las plantas

La primera etapa para el desarrollo de este proyecto consistió en el análisis previo de los extractos de la hierba del cáncer (*Cuphea aequipetala*), hierba del golpe (*Oenothera rosea L'Hér. ex Aiton*), flor de hielo (*Gentiana spathacea Kunth*), hierba de la víbora (*Zornia thymifolia Kunth*) y palo de brasil (*Haematoxylum brasiletto*), mediante dos pruebas fitoquímicas, la determinación de la actividad antioxidante por el método 2,2 difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) y la cuantificación de los fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. La selección de la planta a utilizar para la síntesis verde de nanopartículas y la reducción de óxido de grafeno, se basó en los resultados obtenidos a partir de las dos pruebas fitoquímicas mencionadas, como se muestra a continuación.

4.1.1 Determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH

Las sustancias reductoras en los extractos contribuyen significativamente al potencial antioxidante de las especies vegetales, y las plantas con una alta capacidad reductora son excelentes fuentes para la síntesis verde de nanopartículas metálicas [100]. La actividad antioxidante se realizó para las plantas *Cuphea aequipetala* (hierba del cáncer), *Oenothera rosea L'Hér. ex Aiton* (hierba del golpe), *Gentiana spathacea Kunth* (flor de hielo), *Zornia thymifolia Kunth* (hierba de la víbora) y *Haematoxylum brasiletto* (palo de brasil), para cuantificar su poder reductor. En la Tabla 4.1 se muestran los porcentajes de inhibición del radical 2,2 difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) por cada uno de los extractos utilizados, el valor más alto lo obtuvo el extracto de *Cuphea aequipetala* (hierba del cáncer), con un porcentaje del 89.50%.

4.1.2 Determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

Se ha informado que los compuestos fenólicos presentes en los extractos actúan como los precursores principales para la formación y estabilidad de las nanopartículas [101], es por ello que

se cuantificaron la cantidad de fenoles totales presentes en cada uno de los extractos. Primeramente, con los datos obtenidos de la absorbancia a partir de los estándares preparados de ácido gálico se realizó la curva de calibración mostrada en la Figura 4.1.

Tabla 4.1 Porcentajes de inhibición del radical DPPH.

No.	Planta	% de inhibición
1	<i>Cuphea aequipetala</i> (hierba del cáncer)	89.5%
2	<i>Oenothera rosea</i> L'Hér. ex Aiton (hierba del golpe)	89.4%
3	<i>Gentiana spathacea</i> Kunth (flor de hielo)	87.8%
4	<i>Haematoxylum brasiletto</i> (palo de brasil)	76.0%
5	<i>Zornia thymifolia</i> Kunth (hierba de la víbora)	63.4%

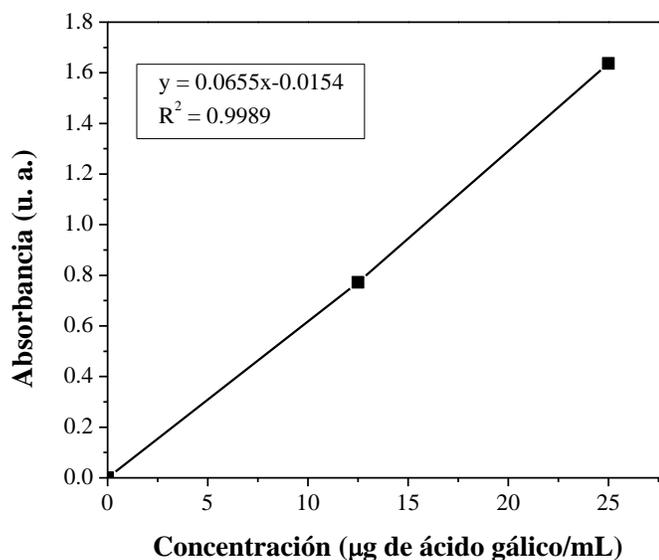


Figura 4.1 Curva de calibración del ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales.

Los datos obtenidos de la curva de calibración indican una buena linealidad ($R^2=0.9989$), lo cual permite hacer una buena cuantificación de fenoles totales presentes en cada muestra, utilizando como referencia la curva de calibración del ácido gálico, como se muestra en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2 Cuantificación de fenoles totales en los extractos.

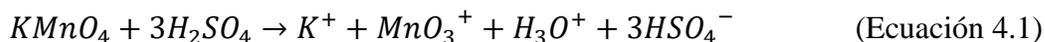
No.	Planta	Concentración (μg EAG/mL)
1	<i>Cuphea aequipetala</i> (hierba del cáncer)	29.3
2	<i>Oenothera rosea</i> L'Hér. ex Aiton (hierba del golpe)	28.6
3	<i>Haematoxylum brasiletto</i> (palo de brasil)	27.5
4	<i>Gentiana spathacea</i> Kunth (flor de hielo)	23.4
5	<i>Zornia thymifolia</i> Kunth (hierba de la víbora)	16.2

De acuerdo a los resultados obtenidos, mostrados en la Tabla 4.1 y Tabla 4.2, la planta que presenta mayor actividad antioxidante y mayor concentración de fenoles totales es *Cuphea aequipetala* (hierba del cáncer), por lo tanto, resulta lógico que sea la planta preseleccionada para la biosíntesis de los nanocompuestos propuestos en este proyecto.

4.2 Obtención de óxido de grafeno

La síntesis del óxido de grafeno se realizó en dos etapas, primero, se oxidó el grafito por medio de los reactivos, KMnO_4 , H_2SO_4 y H_3PO_4 que se utilizan en el método de Hummers modificado [60], posteriormente, se exfolió en agua desionizada por ultrasonido para obtener óxido de grafeno (GO), tal como se muestra en la Figura 4.2.

Aunque, el KMnO_4 es un oxidante comúnmente utilizado, la especie activa es, el heptóxido de dimanganeso. Esta especie se forma a partir de la siguiente reacción [61]:



El heptóxido bimetálico tiene la capacidad de oxidar selectivamente enlaces alifáticos insaturados sobre dobles enlaces aromáticos, lo cual puede tener implicaciones importantes para la estructura del grafito y las vías de reacción que ocurren durante la oxidación [61].

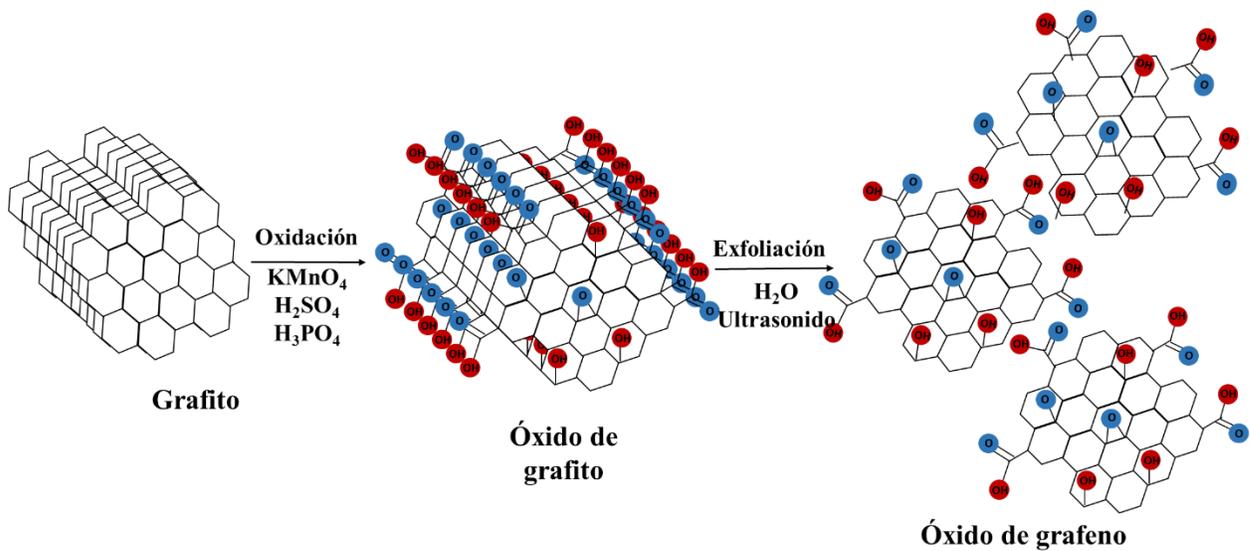


Figura 4.2 Mecanismo de síntesis del GO.

El óxido de grafito se exfolió en intervalos de 5 min por un tiempo de 30 min, en agua desionizada a una concentración de 0.08 mg/mL en baño ultrasónico para obtener el tiempo de exfoliación más adecuado, por medio de espectroscopía UV-Vis (Figura 4.3) se midió la absorbancia y se comprobó la formación de GO debido a la presencia de dos bandas de absorción, la primera ubicada aproximadamente a 222 nm, debido a las transiciones $\pi-\pi^*$ de los enlaces aromáticos C-C [60, 76] y la segunda a 300 nm, debido a las transiciones $n-\pi^*$ de los enlaces C=O [60, 76]. La máxima absorbancia se presentó a los 25 min de exfoliación.

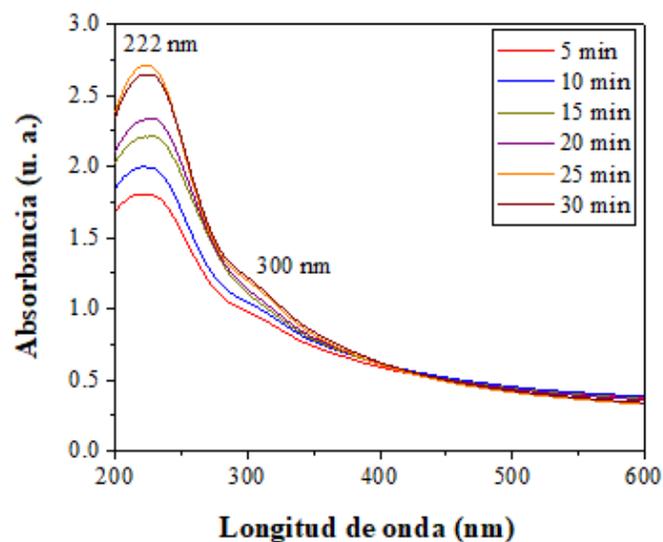


Figura 4.3 Espectros de UV-Vis de la exfoliación del óxido de grafito a diferentes tiempos.

Por medio de la técnica de MEB se analizó la morfología del grafito como material precursor y del GO sintetizado. En la Figura 4.4a se muestra una micrografía del grafito precursor observándose hojuelas de diferentes tamaños micrométricos. Mientras que, la Figura 4.4b muestra que el GO sintetizado presenta una morfología arrugada, con diferentes bordes y pliegues, debido a la presencia de los grupos funcionales que contienen oxígeno, similar al resultado reportado por Jin y Col [78]. En la Figura 4.4c se observa que se trata de GO multicapa (indicando con flechas las diferentes capas). En la Figura 4.4d se muestra el análisis químico EDS, mediante el cual se comprobó la presencia de oxígeno y carbono, así como, de Cu proveniente del portamuestras.

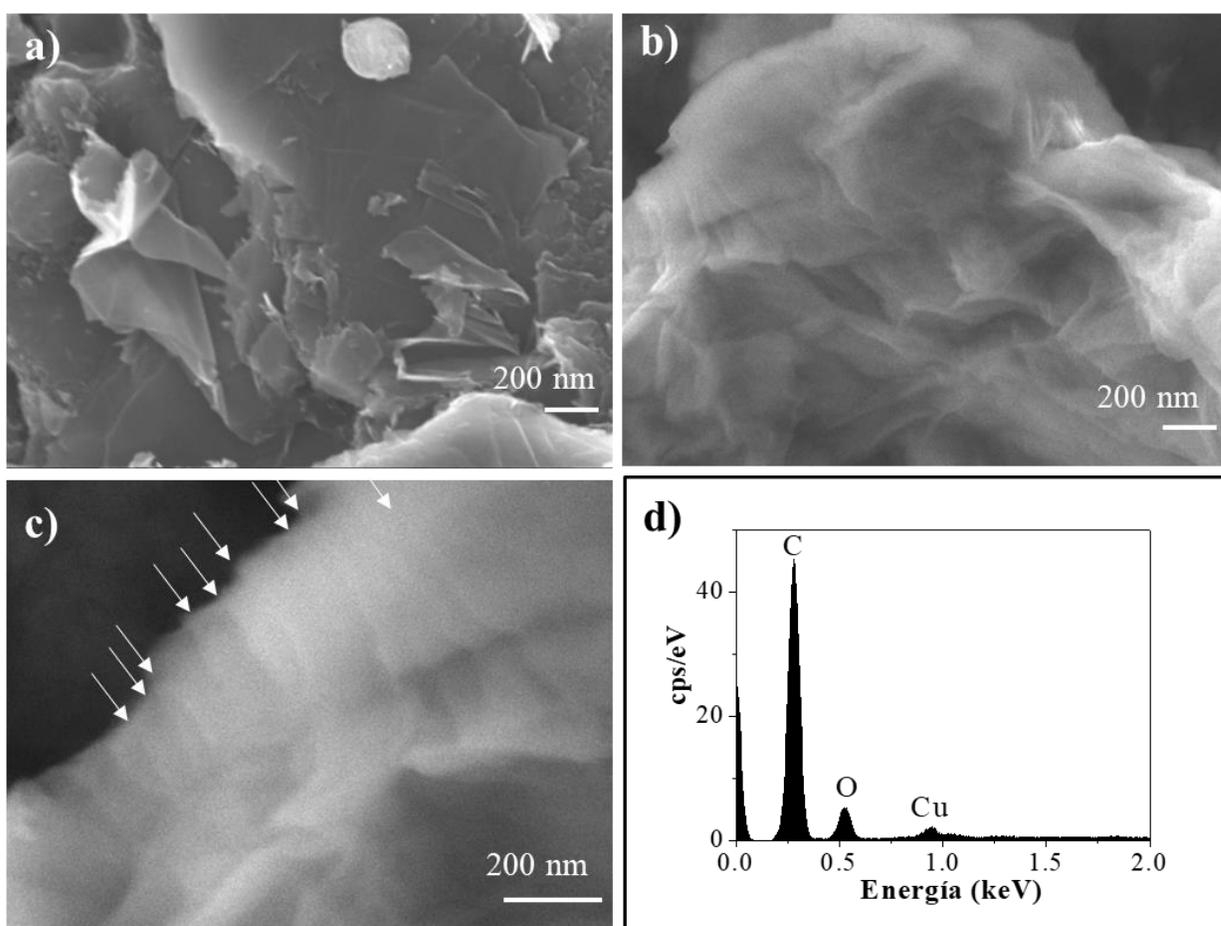


Figura 4.4 Imágenes de MEB: a) grafito, b-c) GO (las flechas indican las capas) y d) análisis químico EDS del GO.

A través de microscopía electrónica de transmisión por barrido (METB) se observaron las capas del GO exfoliadas. En la Figura 4.5a se observa que el nanomaterial 2D obtenido tiene tamaño de

aproximadamente 5 micrómetros y presenta bordes y pliegues en su superficie atribuidos a la presencia de los diversos grupos funcionales. Además, en la Figura 4.5b-d, se aprecian con mayor claridad las diferencias de contraste que presenta el nanomaterial, debido a que se trata de GO multicapa, puesto que, en algunas zonas de los bordes se observa terminantemente una monocapa de GO (indicadas en la Figura 4.5b), sin embargo, se comprueba que se obtuvo GO multicapa.

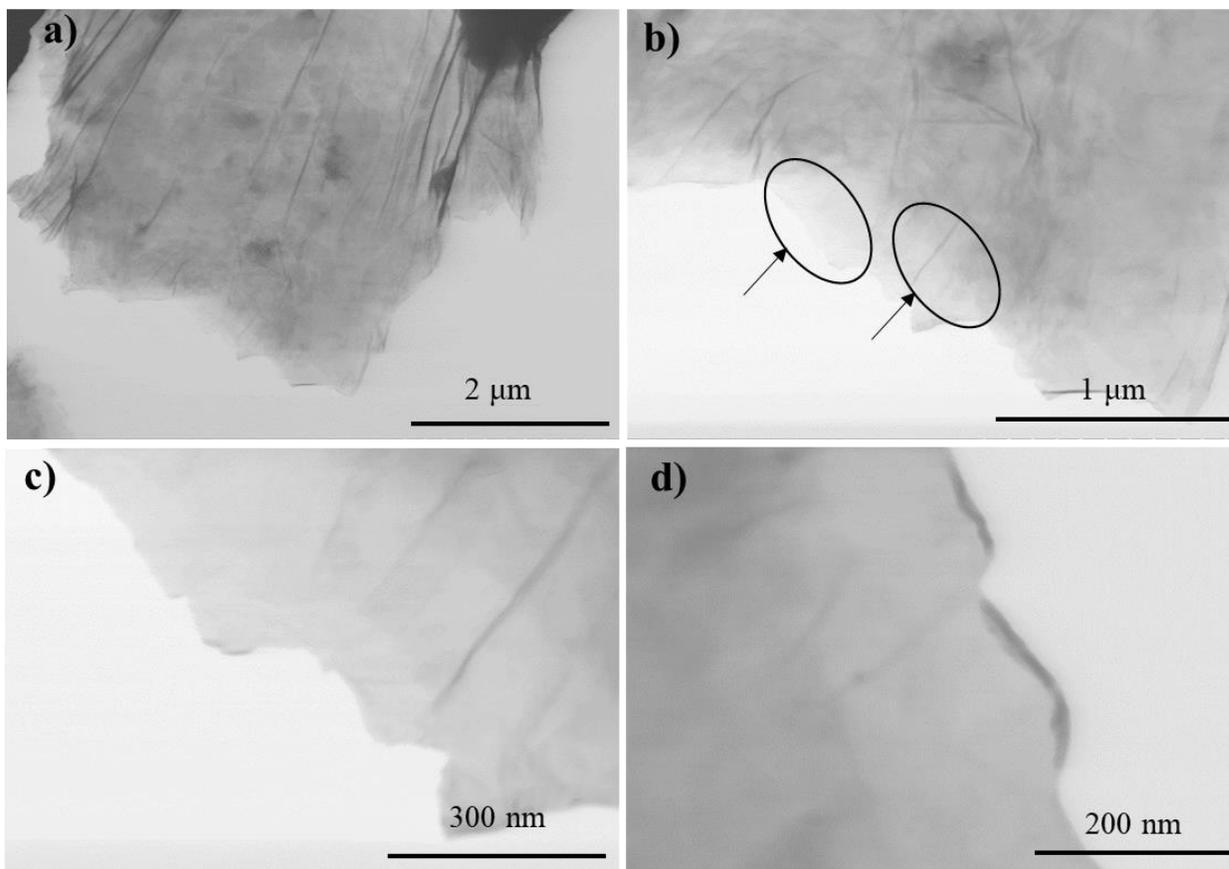


Figura 4.5 Micrografías de METB del GO.

Por medio de los estudios de DRX mostrados en la Figura 4.6a, se obtuvo el patrón de grafito que fue el material precursor para la síntesis de GO. Se observa un pico intenso a $2\theta=26.4^\circ$ correspondiente a la distancia interplanar de 3.38 \AA que corresponde a los planos (002) de su estructura hexagonal indexada con la tarjeta [99-101-2030].

Por otro lado, en el patrón de DRX correspondiente al GO (Figura 4.6b) se aprecia un pico a $2\theta = 10.4^\circ$ que representa la distancia interplanar de 8.50 \AA de los planos (002) de su estructura

hexagonal indexado con la tarjeta [00-065-1528]. Se observa que ese pico se recorre con respecto al del grafito, hacia la izquierda, que es indicativo de la oxidación del grafito y su posterior exfoliación para obtener el GO, lo cual fue similar a lo reportado por Chettri y Col [77].

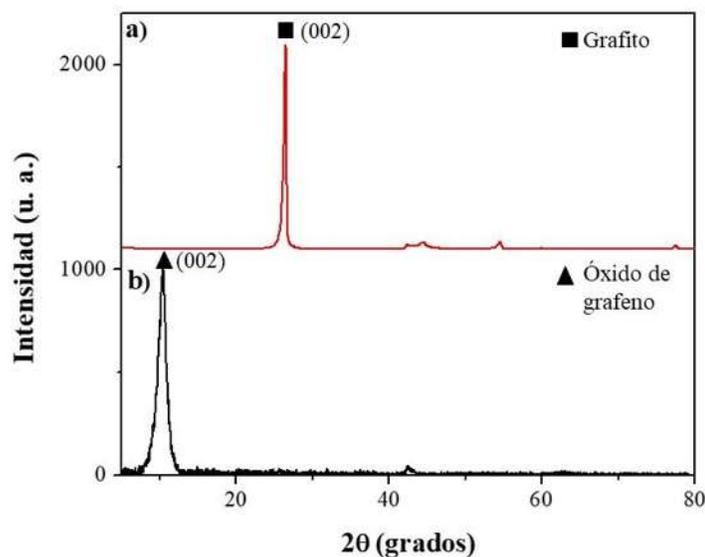


Figura 4.6 Patrón de difracción de rayos-X de: a) carbón grafito y b) GO.

Además, la anchura a altura media del pico correspondiente a los planos (002) del grafito y GO, abreviada como FWHM (por sus siglas en inglés *Full Width at Half Maximum*), se amplió de 0.38 a 1.22°, indicio de la formación de un nanomaterial. El ancho promedio del cristal, es decir, la dimensión perpendicular dentro de la cual se mantiene el orden grafítico, se puede calcular por la ecuación de Debye-Scherrer [102], obteniéndose un valor de 6.5 nm. Mientras que, el número promedio de las capas de grafeno y sus derivados (N), se puede calcular a partir de la mencionada ampliación del pico, combinando las ecuaciones de Debye-Scherrer y Bragg, que da la expresión para N [102]:

$$N = \frac{D}{d} + 1 \quad (\text{Ecuación 4.3})$$

Donde D es el ancho promedio de cristal y d representa la distancia interplanar. Al sustituir los valores en la ecuación anterior, se calculó que el número de capas del GO sintetizado es de 9.

Mediante espectroscopía FT-IR se identificaron los grupos funcionales presentes en el carbón grafito precursor y en el GO, como se muestra en la Figura 4.7. En la Tabla 4.3 se exponen los diversos grupos funcionales encontrados en el carbón grafito y en GO, se aprecia claramente la inserción de diversos grupos funcionales oxigenados por la oxidación del grafito y su posterior exfoliación (-OH, C=O, C-O-C). Dichas bandas son similares a las que obtuvieron Osssonon y Col. [103] quienes sintetizaron GO por el método de Hummers.

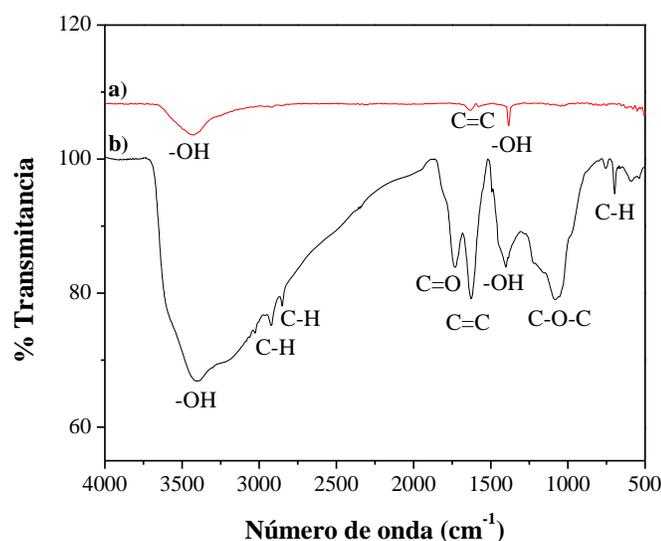


Figura 4.7 Espectros FT-IR de: a) carbón grafito y b) GO.

Tabla 4.3 Grupos funcionales presentes en el carbón grafito y GO.

Carbón grafito			GO		
Número de onda (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Compuesto	Número de onda (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Compuesto
3426	-OH	Alcoholes/Agua	3446	-OH	Alcoholes/Agua
1642	C=C	Aromáticos	2921 y 2850	C-H	Alcanos
1381	-OH	Ácidos carboxílicos	1728	C=O	Ácidos carboxílicos
			1627	C=C	Aromáticos
			1402	-OH	Ácidos carboxílicos
			1081	C-O-C	Éteres
			755 y 697	C-H	Aromáticos

Adicionalmente, se determinó la densidad real del GO sintetizado por el método de las cuatro masas, como se aprecia en la Figura 4.8a-d, en las cuales se muestra la medición de la masa del picnómetro; solo (M_0), lleno de agua desionizada (M_1), conteniendo el polvo de GO (m_s) y el mismo conteniendo polvo y agua desionizada (M_2), respectivamente.

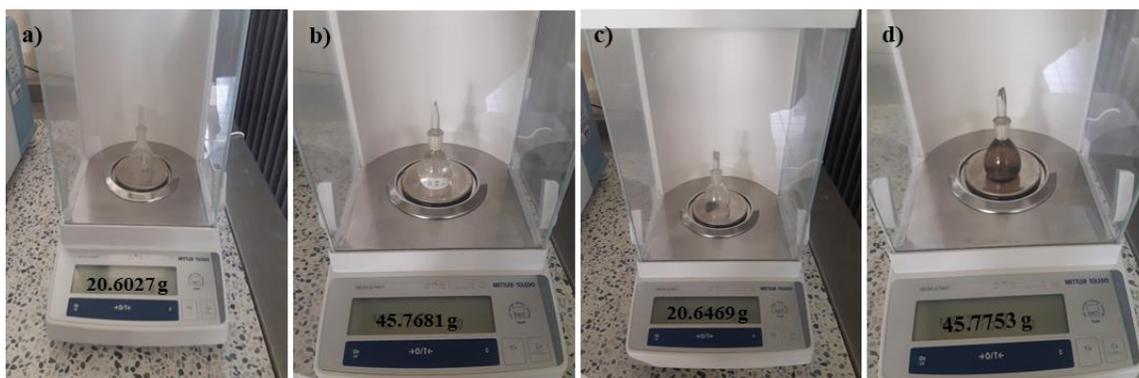


Figura 4.8 Medición de la densidad del GO. Masa del picnómetro: a) solo, b) lleno de agua, c) polvo de GO y d) GO y agua.

La Tabla 4.4 muestra las mediciones de cada una de las masas que se realizaron por triplicado, además, el promedio y la desviación estándar de cada una de ellas para la determinación de la densidad real del GO.

Tabla 4.4 Resultados de masas para la determinación de la densidad real del óxido de grafeno.

No. Experimento	M_0 (g)	M_1 (g)	m_s (g)	M_2 (g)
1	20.6027	45.7681	20.6469	45.7740
2	20.6027	45.7679	20.6470	45.7850
3	20.6027	45.7565	20.6471	45.7753
Promedio	$\bar{x} = 20.6027$	$\bar{x} = 45.7642$	$\bar{x} = 20.6470$	$\bar{x} = 45.7781$
Desviación estándar	$\sigma = 0$	$\sigma = 0.0054$	$\sigma = 8.1650 \times 10^{-5}$	$\sigma = 0.0049$

De acuerdo a los resultados obtenidos en la Tabla 4.4, a partir de la Ecuación 3.2 se determinó la densidad real del óxido de grafeno:

$$\rho_s = 0.9978 \text{ g/mL} \frac{0.0443 \text{ g}}{[(45.7642 \text{ g} - 20.6027 \text{ g}) + 0.0443 - (45.7781 - 20.6027)]}$$

$$\rho_s = 1.4572 \text{ g/mL}$$

El resultado obtenido de la densidad real del GO está de acuerdo con el producto de GO comercializado por *Sigma Aldrich* (796034) [104], cuyo valor de densidad conteniendo entre 15-20 capas es de 1.8 g/mL. Por otro lado, el GO monocapa comercializado por *Advanced Chemicals Supplier* (ACS) [105] tiene una densidad de 0.26 g/mL (CAS No.: 7782-42-5). En base a estos dos datos se puede determinar que el GO sintetizado tiene entre 12-16 capas, considerando que la densidad obtenida por el método del picnómetro, está entre los valores reportados por las comercializadoras de este producto. Cabe señalar que esta estimación es mayor que la obtenida por DRX, sin embargo, al utilizar la Ley de Bragg y ecuación de Debye-Scherrer, el valor de la constante de Scherrer que depende de la estructura cristalina (k), no se consideró para la estructura hexagonal del GO, sino la correspondiente a cristales con simetría cúbica (0.89), no obstante, trabajos anteriores reportan cálculos similares, inclusive obteniendo número de capas superiores [102].

En la Figura 4.9 se muestra la distribución de tamaño de partícula del GO obtenida con el analizador de partícula automático centrífugo Horiba CAPA-300, en la que se aprecia que el rango de tamaño está entre 1-10 μm , además, se obtuvo un diámetro promedio de 4.62 μm , mientras que de acuerdo al producto de GO comercializado por *SkySpring Nanomaterials, Inc.* (0591CA) [106] el diámetro de partícula está en el rango de 1-5 μm , con un espesor de 1-2 nm y con un número de capas menor a 3.

Por otro lado, el GO monocapa comercializado por *US Research Nanomaterial Inc.* (US7906) [107] tiene un diámetro de partícula que oscila entre 1.5-5.5 μm con un espesor de 0.43-1.23 nm. De acuerdo a estos resultados el GO sintetizado por el Método de Hummers modificado por Marcano y Col. [60] coincide con el rango reportado por los proveedores que comercializan este nanomaterial, además, se obtuvieron partículas incluso más grandes a las comercializadas.

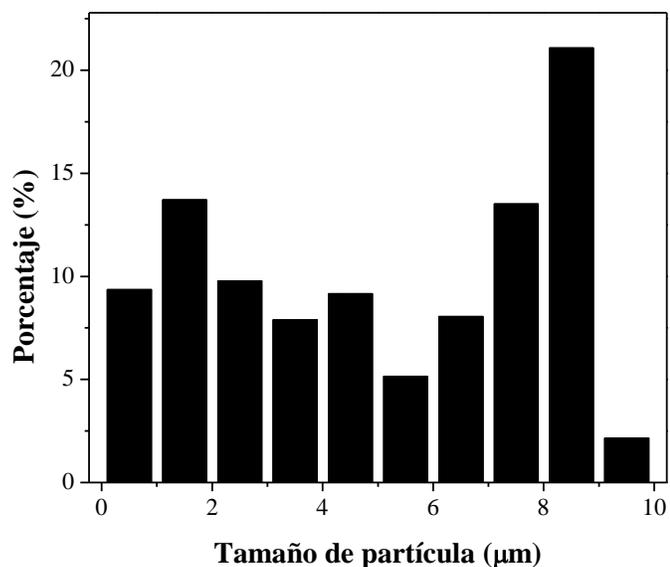


Figura 4.9 Histograma de la distribución de tamaño de partícula del GO.

4.3 Biosíntesis del nanocompuesto Ag/rGO

Para la biosíntesis de los nanocompuestos Ag/rGO, se utilizaron tres extractos acuosos diferentes. Mediante *Cuphea aequipetala* (hierba del cáncer) se sintetizaron AgNPs, de igual forma por medio de *Haematoxylum brasiletto* (palo de brasil) se obtuvieron AgNPs y el nanocompuesto, finalmente usando *Tamarix gallica* (taray) se derivaron los mejores resultados para Ag/rGO. A continuación, se analizan con mayor profundidad cada resultado.

La Figura 4.10 muestra un mecanismo general de biosíntesis para el nanocompuesto Ag/rGO. Las biomoléculas presentes en el extracto acuoso de la planta actúan como agentes reductores y estabilizadores. Cabe señalar que los agentes reductores en las reacciones, son precisamente esas biomoléculas que se combinan con el AgNO_3 como sal precursora para la síntesis de AgNPs. Para la reducción de los iones de Ag^+ se requieren electrones para convertirla a Ag^0 , y así empieza el proceso de nucleación y crecimiento de las AgNPs, seguido de la estabilización estérica mediada también por las biomoléculas, mientras que, en el caso de los diversos grupos funcionales oxigenados (carboxilo, éter y alcohol) presentes en el GO, material de soporte, se requieren H^+ para reducirlos, que también son proporcionados por el extracto, principalmente, por los compuestos fenólicos, debido a los grupos hidroxilo ($-\text{OH}$) expuestos que presentan en sus estructuras.

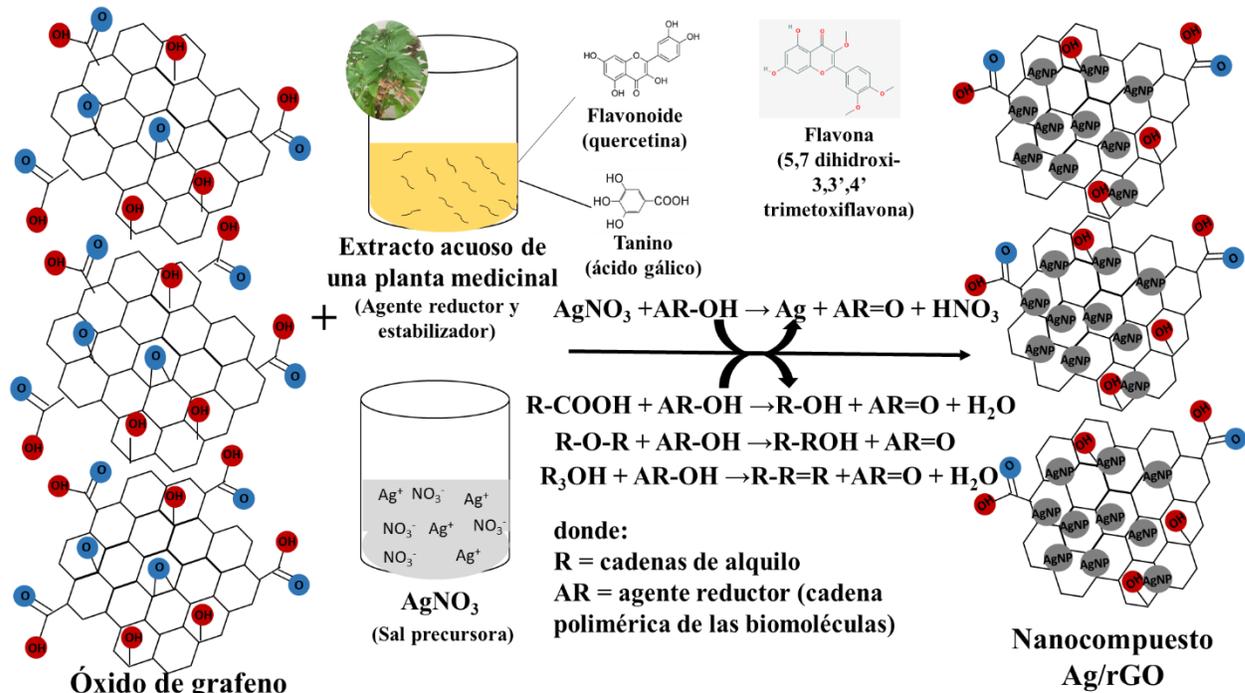


Figura 4.10 Esquema general del mecanismo de biosíntesis del nanocompuesto Ag/rGO.

4.3.1 *Cuphea aequipetala* (hierba del cáncer)

Para la biosíntesis del nanocompuesto Ag/rGO, primeramente, se utilizó el extracto acuoso de la planta *Cuphea aequipetala* (hierba del cáncer) preparado con una concentración de 0.02 g/mL utilizando agua desionizada como solvente a 60 °C por 20 min. Para la síntesis de AgNPs se utilizó una relación volumétrica de 1:1 respecto a la sal precursora de AgNO₃, en donde ésta se empleó a diferentes concentraciones molares de 1, 3 y 5 mM. Durante la reacción, se monitoreo el cambio de color del original amarillo a marrón oscuro, siendo el primer indicativo de la formación de AgNPs después de mezclar el extracto acuoso con la sal precursora [108, 109].

Debido a que las AgNPs presentan el fenómeno de resonancia del plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés *Surface Plasmon Resonance*) se monitoreo la formación de las AgNPs mediante la técnica de espectroscopía UV-Vis, como se muestra en la Figura 4.11. Se observa que para la concentración de 1 mM no se presentó banda de plasmón, mientras que, para las concentraciones de 3 y 5 mM exhiben doble banda ubicadas en 442 y 485 nm, lo cual puede ser interpretado como una doble distribución de tamaño de las AgNPs [110], o a formas distintas a AgNPs esféricas, por

ejemplo, nanocubos (~415 y ~450 nm) [111], mismo que es indeseable para este tipo de síntesis, lo que sugirió descartar el uso del extracto acuoso de *Cuphea aequipetala* (hierba del cáncer) para la biosíntesis del nanocompuesto Ag/rGO.

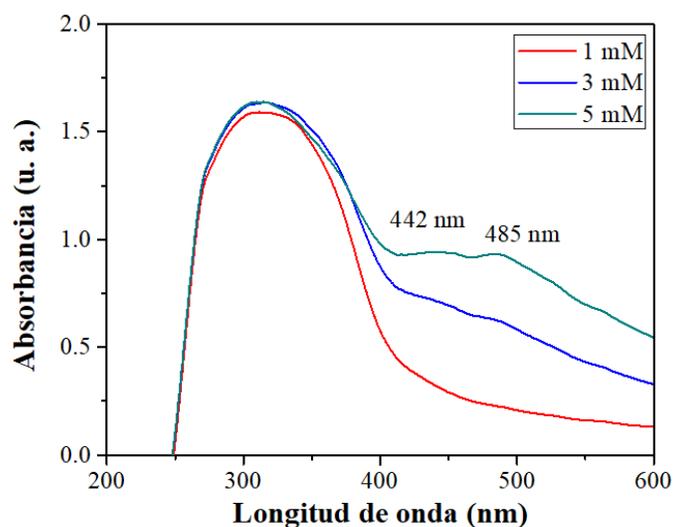


Figura 4.11 Espectros de UV-Vis correspondientes a la síntesis de AgNPs utilizando el extracto acuoso de *Cuphea aequipetala* (hierba del cáncer).

4.3.2 *Haematoxylum brasiletto* (palo de brasil)

Al descartar el extracto anterior, se decidió utilizar *Haematoxylum brasiletto* (palo de brasil), dado que inhibe el crecimiento bacteriano de cepas de *E. coli* [45]. Se sintetizaron AgNPs preparando el extracto acuoso a una concentración de 0.02 g/mL empleando una temperatura de 60 °C por 20 min. Al igual que el caso anterior se empleó una relación volumétrica 1:1 con respecto a la sal precursora, de la que se usaron 1, 3 y 5 mM. Un cambio de color de naranja a verde olivo, fue indicativo de la formación de AgNPs, mismo que se monitoreo mediante espectroscopía UV-Vis como se muestra en la Figura 4.12. Se observan bandas de absorción con un máximo a 440 y 450 nm, indicativo de la formación de estos nanosólidos [112], para las concentraciones 1 y 3 mM, respectivamente, mientras que para la concentración de 5 mM no hay evidencia del plasmón. De la misma forma, se observa que para la concentración de 1 mM se tiene una banda más definida y menos ancha respecto a la de 3 mM. El corrimiento hacia el rojo con el incremento en la concentración indica un crecimiento en el tamaño de las AgNPs, razón por la cual la banda de

AgNPs no aparece en la concentración de 5 mM. De igual forma, el ensanchamiento de las bandas se atribuye a una mayor distribución de tamaños, lo que confirma el crecimiento de las partículas. Este comportamiento se puede atribuir a que el extracto de la planta tiene una gran cantidad de agentes reductores, dado que al aumentar la concentración de la sal sigue habiendo una reducción de los iones de Ag^+ a AgNPs, sin embargo, debido al crecimiento de las partículas, denota una cantidad de agentes estabilizadores insuficiente, a este proceso se le conoce como la maduración de *Ostwald-Ripening* [113].

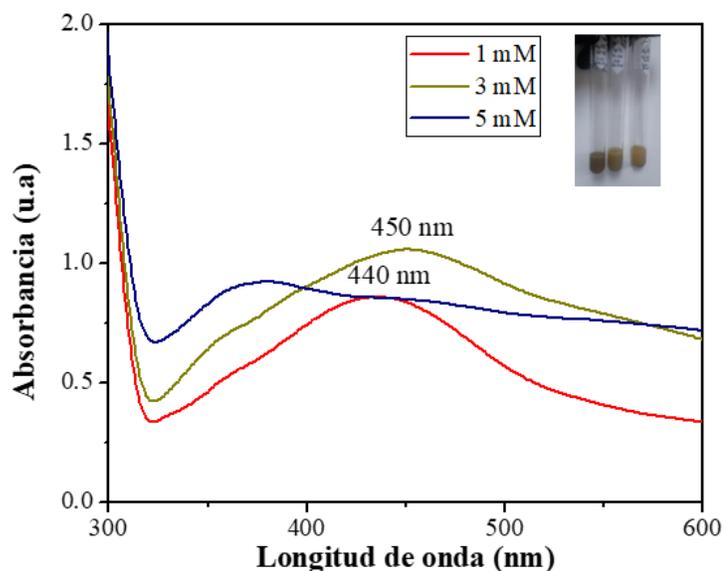


Figura 4.12 Espectros de UV-Vis de la síntesis de AgNPs utilizando el extracto acuoso de *Haematoxylum brasiletto* (palo de brasil).

De acuerdo a los resultados discutidos en el párrafo anterior, se utilizó la concentración de 1 mM para la biosíntesis del nanocompuesto Ag/rGO empleando una relación volumétrica 1:1:1 de GO/extracto/sal sometida a una agitación constante. Por lo que se mezclaron 10 mL de GO con 10 mL de extracto que se mantuvieron en agitación constante y se agregó 10 mL de la solución de AgNO_3 1 mM. Se observó un cambio de coloración en la solución de naranja a verde olivo, indicativo de la formación de AgNPs y, además, de la posible reducción del GO. La reacción también fue monitoreada mediante espectroscopía UV-Vis cada 30 min como se muestra en la Figura 4.13. Se observa que respecto al pico del GO hubo un desplazamiento hacia la derecha a 280 nm, indicativo de la reducción del GO, tal y como lo señala Barua y Col. [82] quienes biosintetizaron un

nanocompuesto Ag/rGO y observaron un desplazamiento de 228 a 265 nm, además, se observa una pequeña banda a 440 nm debido al fenómeno SPR de las AgNPs, esta banda es más pequeña que la de las AgNPs en concentración 1 mM mostrada en la Figura 4.12, debido a la menor superficie expuesta de las AgNPs soportadas en el rGO para que suceda el fenómeno SPR, de igual manera de la cinética de reacción, se observa que el tiempo idóneo de reacción fue de 90 min, ya que para intervalos mayores y menores la banda de las AgNPs es menor, lo que indica una menor cantidad.

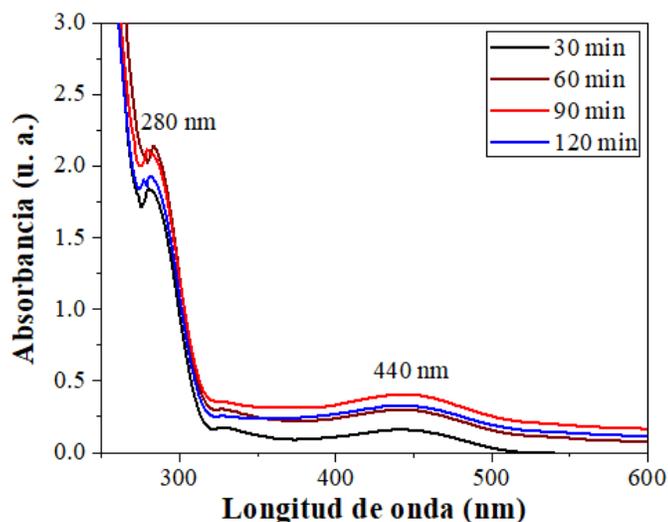


Figura 4.13 Espectro de UV-Vis del nanocompuesto Ag/rGO sintetizado con *Haematoxylum brasiletto* (palo de brasil) en relación volumétrica 1:1 con AgNO_3 1 mM.

Se analizó el patrón de DRX para confirmar la estructura cristalina de las AgNPs, así como del rGO, como se muestra en la Figura 4.14, en la cual se identificaron picos centrados a $2\theta = 38.24$, 44.39 , 64.37 y 77.34° correspondientes a los planos (111), (200), (220) y (311) de la estructura fcc de la Ag (Fm-3m 225), indexados con la tarjeta de difracción [99-101-3078], con lo cual se confirmó la estructura cristalina de las AgNPs depositadas en el rGO similar a lo reportado por Barua y Col. [82] quienes prepararon un nanohíbrido de Ag/rGO mediante una reducción simultánea de GO e iones Ag, usando extracto acuoso de la planta *Colosia esculenta* (madumbe).

Además, los picos correspondientes a $2\theta = 27.82$, 32.44 , 46.27 , 54.64 y 57.54° se atribuyeron a la formación de AgCl durante la reacción indexados con la tarjeta de difracción [00-031-1238], lo cual resulta indeseable por el consumo excesivo de Ag durante la síntesis de este nanocompuesto.

Por otro lado, el patrón de DRX no presentó pico de rGO, debido a que la proporción de cada componente puede afectar el patrón de DRX [114] similar a lo reportado por Xu y Col. [115] quienes sintetizaron un nanocomposito Ag/rGO y notaron un contenido de óxido de grafito relativamente bajo (alrededor del 20% en peso), y señalan que es posible que las señales de difracción de la plata puedan cubrir las de las láminas del carbono.

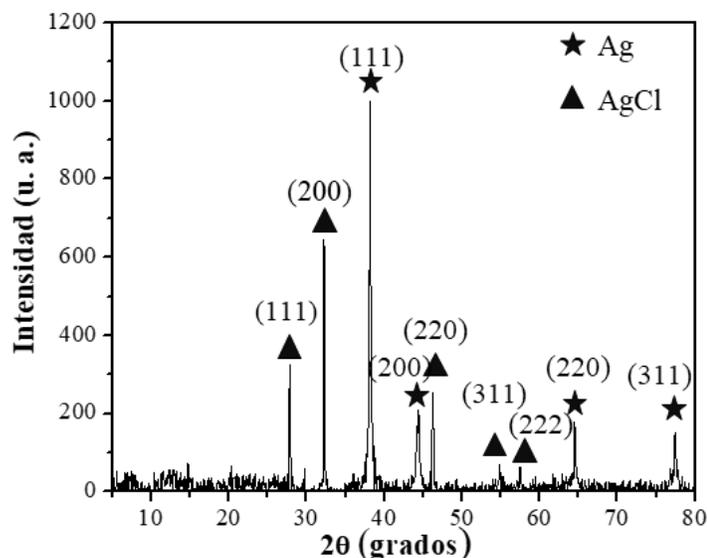


Figura 4.14 Difractograma del nanocompuesto Ag/rGO sintetizado con *Haematoxylum brasiletto* (palo de brasil).

Para identificar posibles grupos funcionales que contienen Cl^- , se analizó el extracto acuoso de *Haematoxylum brasiletto* (palo de brasil) mediante espectroscopía FT-IR. En la Figura 4.15 se muestra el espectro FT-IR del extracto acuoso del palo de brasil, en el cual se identificaron a los picos resumidos en la Tabla 4.5. La presencia de haluros de alquilo (C-Cl) presente a través de la banda de absorción a 548.16 cm^{-1} , comprueba que el Cl proveniente del extracto causa la formación de AgCl durante la biosíntesis del nanocomposito Ag/rGO, similar a lo reportado por López-Miranda y Col. [116] quienes muestran una banda de absorción a 615 cm^{-1} correspondiente al mismo grupo funcional.

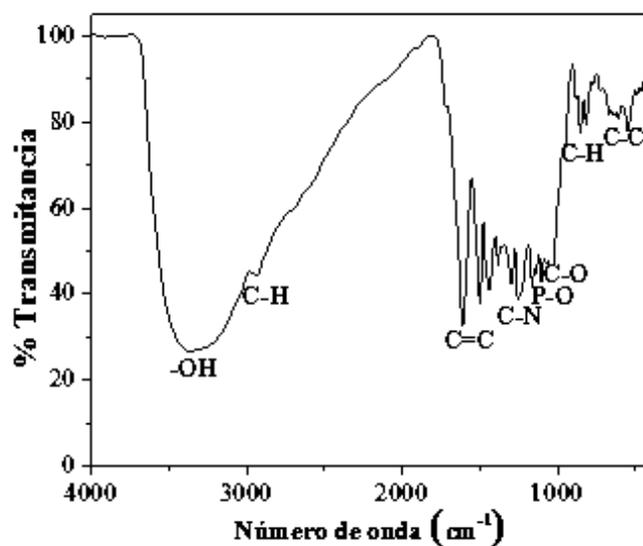


Figura 4.15 Espectro de FT-IR del extracto acuoso de *Haematoxylum brasiletto* (palo de brasil).

Tabla 4.5 Grupos funcionales en el extracto acuoso *Haematoxylum brasiletto* (palo de brasil)

Número de onda (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Compuesto
3356.84	-OH	Agua y alcoholes
2932.84	C-H	Alcanos
1612.92	C=C	Alquenos
1499.89	C=C	Compuestos aromáticos
1384.10	C=C	Compuestos aromáticos
1257.24	C-N	Aminas
1164.55	C-N	Aminas
1105.74	P-O	Óxidos de fosfina
854.68	C-O	Alcoholes
816.38	C-H	Compuestos aromáticos
548.16	C-Cl	Halógenos

4.3.2.1 Eliminación del cloro del extracto

Dada la presencia de cloro en el extracto acuoso de *Haematoxylum brasiletto* (palo de brasil) se realizaron una serie de lavados para intentar eliminar ese ion y de esa manera evitar la formación de AgCl con dos tratamientos diferentes. El primero, utilizó 1 g de la planta *Haematoxylum brasiletto* (palo de brasil) en 50 mL de agua desionizada, se realizaron tres lavados consecutivos bajo agitación constante de 10 STIR durante 20 min, para cada lavado se separó el sobrenadante y se identificaron como a1, a2 y a3, finalmente el sólido del tercer lavado se calentó a 60 °C con agitación de 10 STIR por 20 min, se filtró e identificó como a4. Para el segundo tratamiento, se utilizó 1 g de la planta *Haematoxylum brasiletto* (palo de brasil) molida con 50 mL de agua desionizada, se calentó a 60 °C por 20 min con agitación constante de 10 STIR, posteriormente, se filtró y el líquido recuperado se identificó como b1, el residuo se calentó nuevamente con agua desionizada a 60 °C por 20 min con agitación constante de 10 STIR, se filtró y el líquido se identificó como b2. Estos lavados del extracto se utilizaron para hacer una prueba de formación de AgNPs y evaluar si se eliminaba la formación de AgCl, se utilizó una relación volumétrica 1:1 de extracto y sal precursora 1 mM de AgNO₃ y se observó cambio de color de naranja a marrón en las muestras identificadas como a4, b1 y b2 como se muestra en la Figura 4.16.

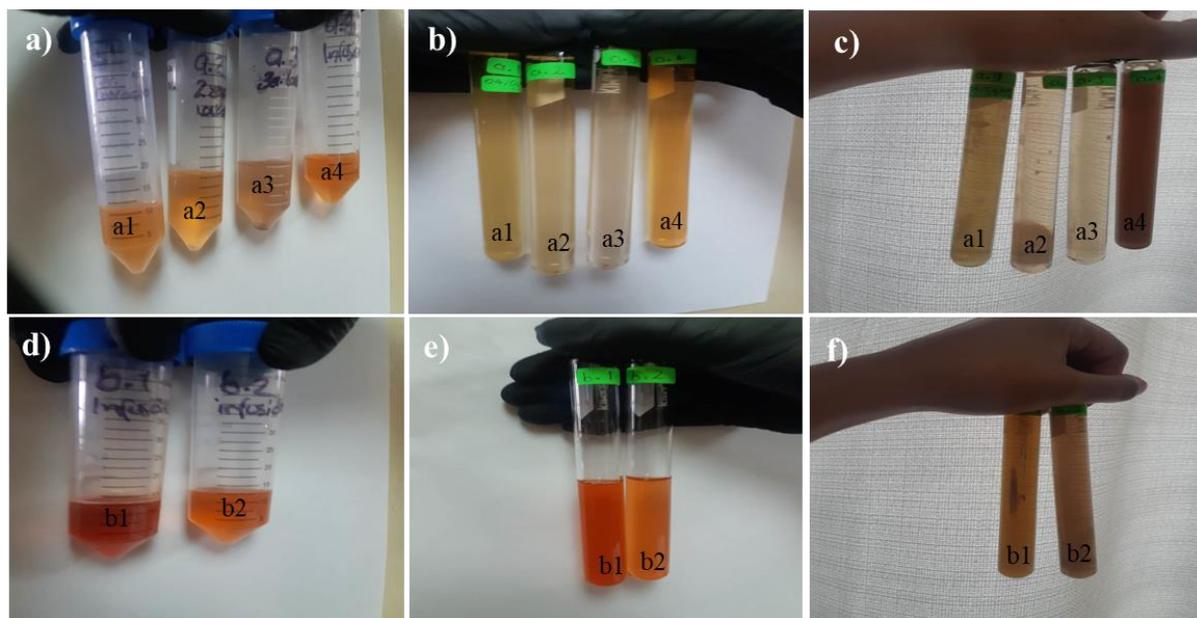


Figura 4.16 a), d) Primer y segundo tratamiento de lavados del palo de brasil, b), e) Mezcla del extracto acuoso de la planta con la sal, y c), f) cambios de color en la síntesis de AgNPs.

Las únicas muestras derivadas de los lavados que mostraron cambio de coloración indicativo de la formación de AgNPs fueron a4, b1 y b2, sin embargo, todas las muestras se midieron en espectroscopía UV-Vis para corroborar la síntesis de AgNPs, por lo que en la Figura 4.17 se muestran los espectros de UV-Vis derivados dichos tratamientos, en los cuales se observa una banda de plasmón más definida a 440 nm en las mismas que mostraron cambio de coloración, característico del fenómeno SPR de estos nanosólidos.

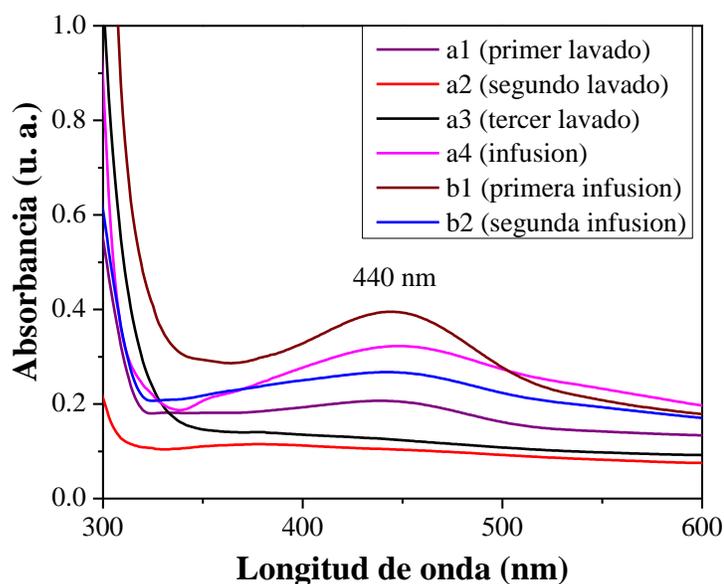


Figura 4.17 Espectros de UV-Vis de la síntesis de AgNPs con los diferentes tratamientos de lavados.

La Figura 4.18 muestra los difractogramas de las muestras a4, b1 y b2 que presentaron una banda más definida y de mayor absorbancia en espectroscopía UV-Vis. A pesar de los diferentes tratamientos realizados para eliminar el Cl del extracto, se observó la presencia de dos fases, siendo Ag y AgCl. De esta forma, el extracto acuoso de *Haematoxylum brasiletto* (palo de brasil) no es adecuado para la biosíntesis del nanocomposito Ag/rGO, debido a que los iones Ag^+ se combinan con el Cl^- y forman el precipitado AgCl, disminuyendo el rendimiento de formación de AgNPs.

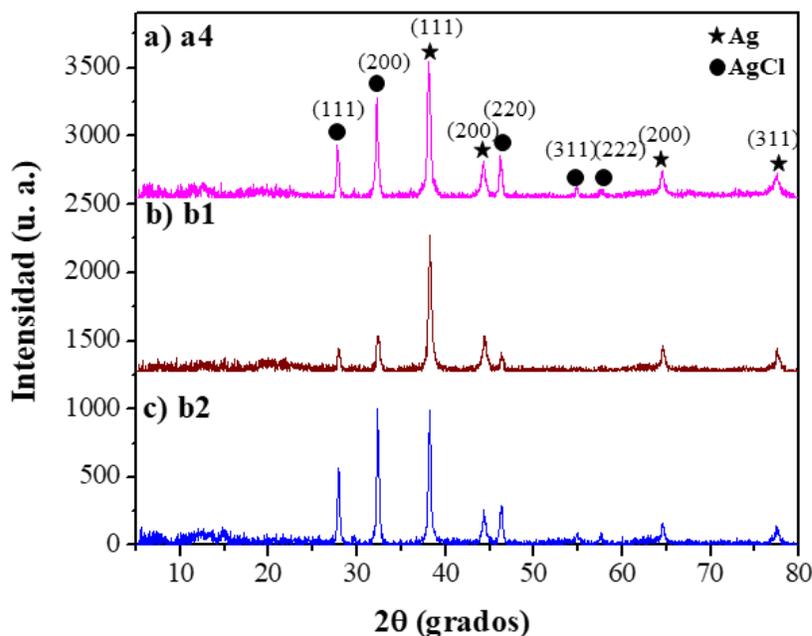


Figura 4.18 Difractogramas de la síntesis de AgNPs con los extractos lavados de *Haematoxylum brasiletto* (palo de brasil): a) lavado a4, b) lavado b1 y c) b2.

4.3.3 *Tamarix gallica* (taray)

Dada la cantidad insuficiente de agentes estabilizadores para la formación de AgNPs en el extracto acuoso de *Cuphea aequipetala* (hierba del cáncer) y además, la presencia de cloro en el extracto de *Haematoxylum brasiletto* (palo de brasil) tratados en las secciones previas, se consideró utilizar otro extracto acuoso conocido como *Tamarix gallica* (taray), previamente utilizado por López-Miranda y Col. [95], cuyos resultados de espectroscopía UV-Vis no presentaron el problema de una doble distribución de tamaño, a diferentes concentraciones molares mostrando una banda bien definida a un máximo de absorbancia en 426.7 nm. Además, sus resultados de DRX confirmaron la estructura cristalina fcc de la Ag, sin presencia de AgCl, similarmente, la espectroscopía FT-IR no presentó una banda referente al grupo funcional C-Cl en el extracto.

En ese trabajo [95] se obtuvieron los mejores resultados empleando 0.15 g/mL de extracto acuoso combinado con AgNO₃ (5 mM). Por lo tanto, en esta investigación, se utilizó una relación volumétrica 1:1:1 de AgNO₃ 5 Mm, GO y extracto acuoso de la planta de taray, respectivamente. Esta mezcla se agitó constante (6 STIR) y adición dosificada de la sal precursora. Se monitoreo el

cambio de color de amarillo a marrón oscuro (Figura 4.19a), para confirmar la formación de AgNPs, así como, la reducción del GO y se midió en espectroscopía UV-Vis tal como se muestra en la Figura 4.19b. Se aprecia una banda a 285 nm desplazada hacia el rojo por causa de la reducción del GO, y otra a 440 nm atribuida al fenómeno SPR de las AgNPs. Gurunathan y Col. [117] obtuvieron resultados similares biosintetizando Ag/rGO con el extracto acuoso de *Tilia amurensis* (tilo).

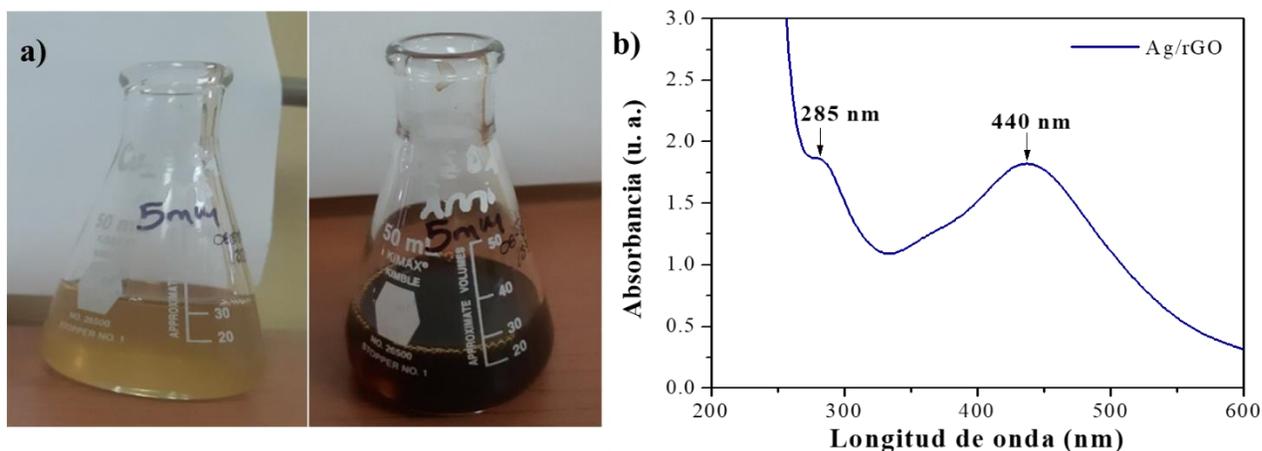


Figura 4.19 a) Cambio de coloración en la síntesis del nanocompuesto Ag/rGO preparado con *Tamarix gallica* (taray) y b) espectro de UV-Vis.

La técnica de DRX comprobó la estructura cristalina fcc de las AgNPs como se muestra en la Figura 4.20. Se identificaron picos centrados a $2\theta = 38.16, 44.65, 64.41$ y 77.21° correspondientes a los planos (111), (200), (220) y (311) de la estructura cristalina fcc de la Ag de acuerdo a la tarjeta de difracción [99-101-3078]. De la misma manera, el difractograma mostró picos relacionados a los compuestos orgánicos remanentes del extracto [95], centrados a $2\theta = 27.37, 29.85$ y 32.26° , los primeros dos correspondientes a 5,7 dihidroxi-3,3',4' trimetoxiflavona, de acuerdo a la tarjeta [00-021-1631]. El pico adicional posiblemente sea de un flavonoide, tanino, carotenoide y/o aceite esencial, responsables de la estabilización estérica de las AgNPs formadas. Sin embargo, al igual que en previos resultados, el pico de rGO no se identificó, lo cual se atribuye a la relación peso GO/Ag [114, 115]. A través del semiancho del pico principal y la ecuación de Debye-Scherrer se determinó el tamaño promedio de cristal de las AgNPs depositadas en el rGO, obteniéndose un valor de 35 nm.

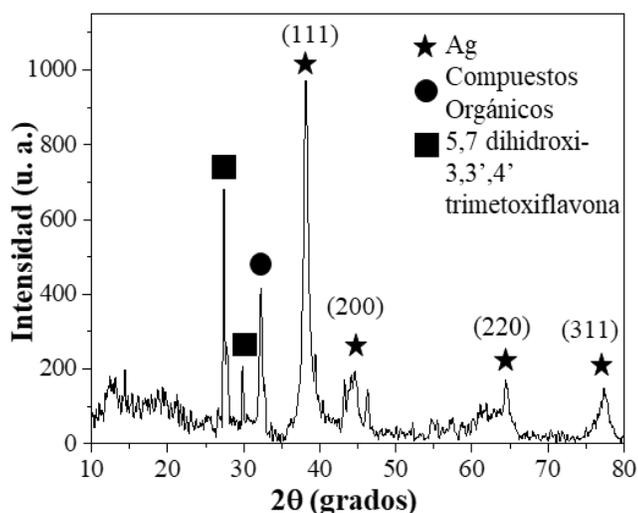


Figura 4.20 Difractograma del nanocompuesto Ag/rGO sintetizado con AgNO_3 5 mM con extracto acuoso de *Tamarix gallica* (taray).

La morfología y deposición de las AgNPs en el rGO se elucidó por medio de la técnica de MEB, como se muestra en la Figura 4.21a-d, en estas micrografías obtenidas a diferentes ampliaciones, que van desde 10,000 X hasta 100,000 X, se aprecia que las AgNPs se depositaron exitosamente en la nanopelícula, la cual tiene un tamaño aproximado de 8 μm , mientras que las AgNPs están en un rango de tamaño que va desde 20 nm hasta 40 nm aproximadamente.

Una vez confirmada la reducción del GO, así como la síntesis de AgNPs, en la Figura 4.22 a-b se muestran las micrografías obtenidas en METB del nanocompuesto Ag/rGO sintetizado en relación volumétrica 1:1:1 de GO, extracto y AgNO_3 5 mM, en las cuales se distinguen AgNPs esféricas en el rango de tamaño entre 20-40 nm depositadas exitosamente en las láminas de rGO, sin embargo, como se deriva de la Figura 4.22c se observa que en algunas partes del rGO, las AgNPs no se encuentran uniformemente distribuidas y hay aglomeraciones de la mismas, por lo que se consideró aumentar la cantidad de GO disponible al momento de hacer la reacción *in-situ*, es decir, variar la relación volumétrica de los tres componentes, manteniendo todos los demás parámetros constantes. Como se muestra en la Figura 4.22d por medio del análisis químico (EDS) realizado a esa zona (Figura 4.22b), se demostró la presencia de C, O y Ag en el nanocompuesto sintetizado, lo cual es otra prueba que corrobora la preparación del nanocompuesto.

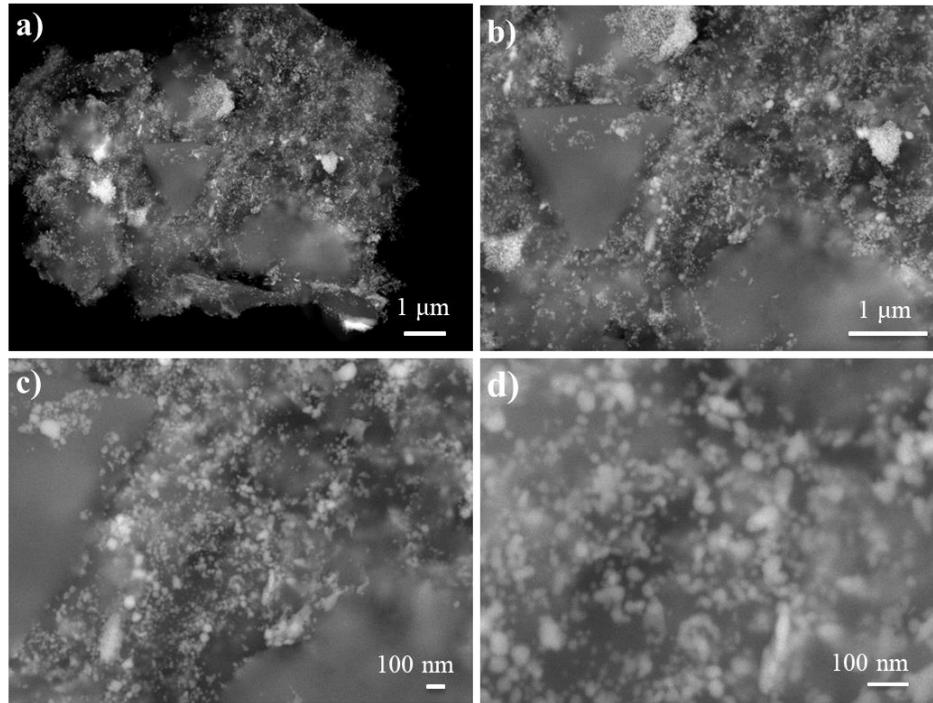


Figura 4.21 Micrografías obtenidas por MEB del nanocompuesto Ag/rGO sintetizado en relación volumétrica 1:1:1 a diferentes ampliaciones: a) 10,000 X, b) 20,000 X, c) 40,000 X y d) 100,000 X.

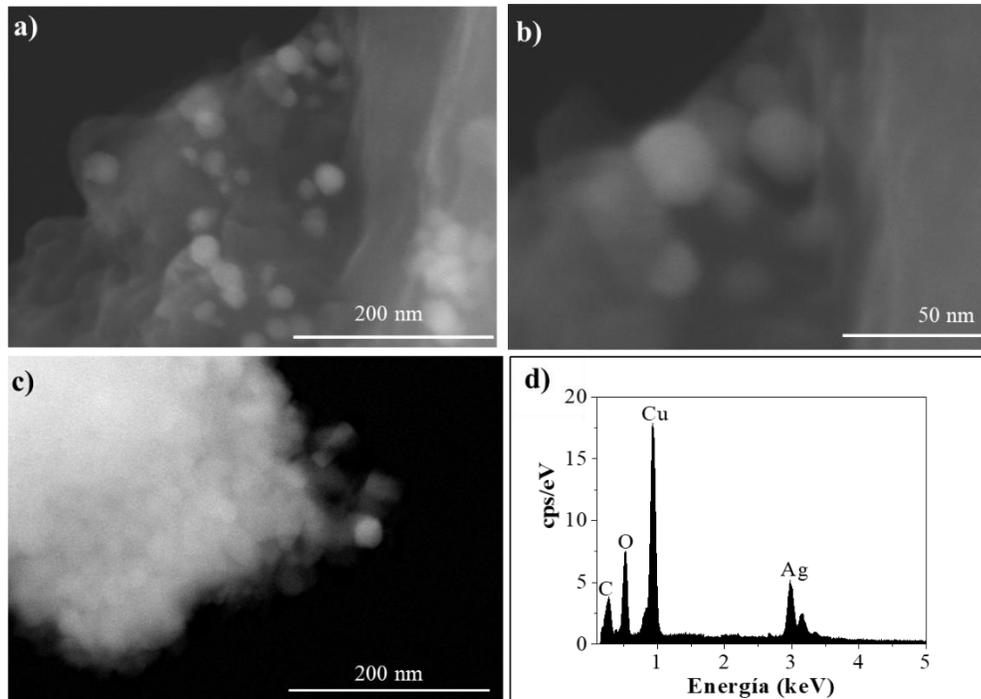


Figura 4.22 a-c) Micrografías de METB del nanocompuesto Ag/rGO sintetizado en relación volumétrica 1:1:1 con extracto acuoso de *Tamarix gallica* (taray) y d) análisis químico de Ag/rGO.

4.3.3.1 Variación de la relación volumétrica

Con el fin de evaluar una depositación más homogénea de AgNPs, se varió la relación volumétrica de GO, el extracto acuoso de la planta medicinal y la sal precursora AgNO_3 (5 mM), utilizando los siguientes valores, 5:1:1 y 10:1:1. Al aumentar la cantidad de GO disponible se cuenta con mayor área superficial para la depositación y evitar las aglomeraciones de las mismas en la nanopelícula.

Se monitoreo el tiempo del cambio de coloración de amarillo a marrón oscuro, de las diferentes reacciones, observándose que, para la relación volumétrica 5:1:1 cambio después de 1 h, mientras que para 10:1:1 fue de 1.5 h, indicativos de la formación de las AgNPs y la reducción del GO. La técnica de espectroscopía UV-Vis confirmó la presencia de dos bandas de absorción debido a la síntesis simultánea de rGO y AgNPs para ambas reacciones, como se muestra en la Figura 4.23.

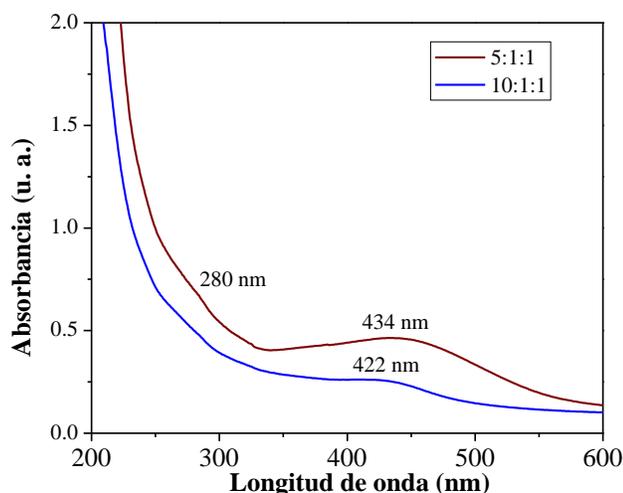


Figura 4.23 Espectro de UV-Vis de la síntesis del nanocompuesto Ag/rGO con relaciones volumétricas 5:1:1 y 10:1:1 utilizando el extracto acuoso de *Tamarix gallica* (taray).

Se observa que la relación volumétrica 5:1:1 tiene una mayor cantidad de AgNPs, debido a que la banda de absorción ubicada a 434 nm, correspondiente al fenómeno SPR típica de estos nanosólidos, presenta mayor intensidad respecto a la relación 10:1:1 situada a 422 nm, además, el corrimiento hacia el azul denota que el aumento en la relación volumétrica es indicativo de AgNPs más pequeñas. Del mismo modo, la desaparición de la banda característica del GO a 222 nm

(debido a la transición π - π^* de los enlaces C-C, ver Figura 4.3) y aparición de una nueva banda a 280 nm, es indicativo de la reducción de este nanomaterial 2D [118].

Para analizar la depositación de las AgNPs en la nanopelícula con las diferentes relaciones volumétricas, se utilizó la técnica de MEB. En la Figura 4.24a-c se muestran las micrografías de las diferentes reacciones, en las cuales se aprecia que a medida que se aumenta la relación volumétrica, la cantidad y tamaño de las AgNPs esféricas depositadas en el rGO disminuye, lo cual coincide con los datos obtenidos por medio de espectroscopía UV-Vis, ya que la intensidad de las bandas fue disminuyendo proporcionalmente al aumentar la relación volumétrica, lo que es indicativo de una menor cantidad de AgNPs. Además, para las relaciones 1:1:1 y 5:1:1 la máxima absorbancia correspondiente al SPR de estos nanosólidos fue a 440 nm (ver Figura 4.19b) y 434 nm, respectivamente, mientras que para la relación 10:1:1 fue en 422 nm, dado que este tipo de nanosólidos tienen un desplazamiento hacia el azul, atribuido a su menor tamaño.

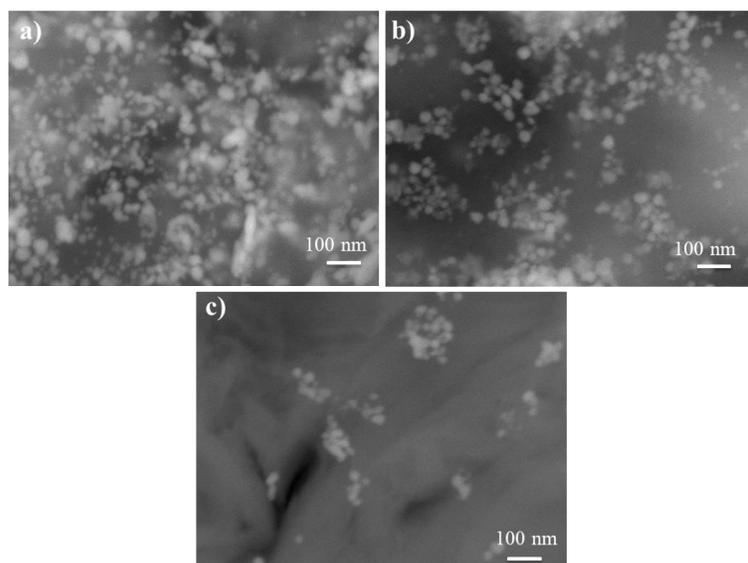


Figura 4.24 Imágenes de MEB registradas con la técnica de LABE a 100,000 X correspondientes a la síntesis de nanocompuestos Ag/rGO a las diferentes relaciones volumétricas: a) 1:1:1, b) 5:1:1 y c) 10:1:1.

Con el fin de comparar la distribución de oxígeno en la nanopelícula después de la bio-reducción, así como la plata presente en cada uno de los nanocompuestos sintetizados, se realizó un mapeo químico para cada una de las reacciones a las diferentes relaciones volumétricas, como se muestra

en la Figura 4.25. Los incisos a-c presentan micrografías de electrones secundarios, distribución de rayos-X del oxígeno y plata, respectivamente, para la relación volumétrica 1:1:1, en las cuales se observa después de la reducción, tanto la presencia de oxígeno en la película y la plata que se encuentra distribuida en el nanomaterial 2D. Mientras que la Figura 4.25d-f muestra la micrografía de electrones secundarios, distribución de rayos-X del oxígeno y plata, respectivamente, para la relación 5:1:1. Se aprecia de igual manera la presencia de oxígeno y plata, sin embargo, la cantidad de plata que se encuentra depositada en el rGO es menor, respecto a la relación anterior, asociado con la relativa mayor cantidad de rGO. Para la relación volumétrica 10:1:1, contemplada en la Figura 4.25g-i, se observan la micrografía de electrones secundarios, distribución de rayos-X de oxígeno y plata, respectivamente, comparándolas con las relaciones anteriores, se observa una menor cantidad de AgNPs depositadas y fuera de la misma. Aunado a lo anterior, a medida que se va aumentando la relación volumétrica de GO presente en la síntesis, se observa que la cantidad de oxígeno es mayor, es decir, la cantidad de grupos funcionales que se reducen en cada película es menor, debido a que los agentes reductores y estabilizadores permanecen constantes.

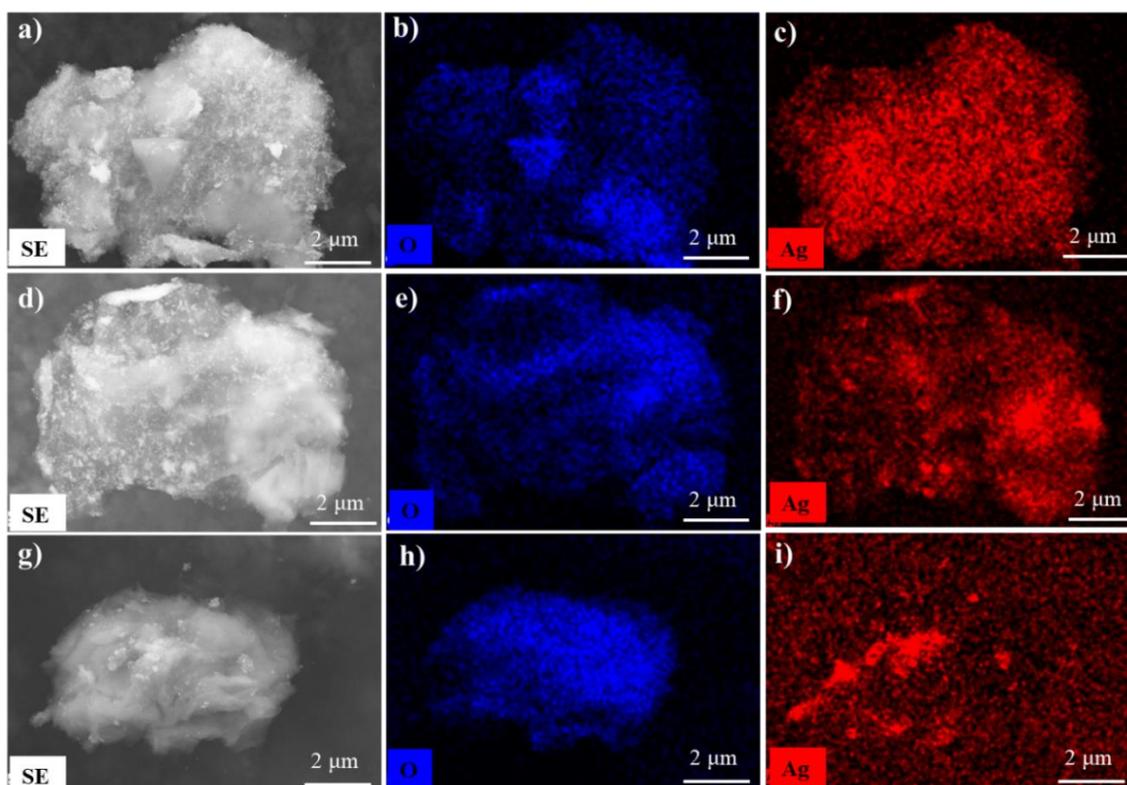


Figura 4.25 Mapeo químico de los nanocompuestos sintetizados a diferentes relaciones volumétricas: a-c) 1:1:1, d-f) 5:1:1 y g-i) 10:1:1.

Dados los resultados anteriores, la relación 5:1:1 fue la seleccionada debido a que se observa una depositación más homogénea de las AgNPs, comparándose con la relación 1:1:1 en la que la superficie está prácticamente cubierta en su totalidad por AgNPs e igualmente con la relación 10:1:1 en la que se observaron AgNPs fuera del material de soporte junto a la mayor cantidad de oxígeno, eso fue indicativo de que se eliminaron una menor cantidad de grupos funcionales oxigenados.

Por medio de la técnica de espectroscopía FT-IR se corroboró la disminución de los grupos funcionales que contienen oxígeno en el GO después de la bioreducción, como se muestra en la Figura 4.26a, en la cual con respecto al espectro FT-IR del GO (Figura 4.26b), se observa que los picos centrados en 3046, 1402 y 1081 cm^{-1} correspondientes a los grupos funcionales $-\text{OH}$, $-\text{OH}$ y C-O-C , respectivamente, disminuyeron después de la bioreducción con el extracto acuoso de la planta de *Tamarix gallica* (taray), además, el pico a 1078 cm^{-1} correspondiente al grupo funcional carbonilo (C=O) desapareció. Por lo tanto, mediante esta técnica se comprobó la reducción exitosa del GO. Estos resultados coinciden con lo reportado por Geetha y Col. [119], al bioreducir el GO y AgNO_3 con el extracto de *Ganoderma lucidum* (reishi, reino fungi).

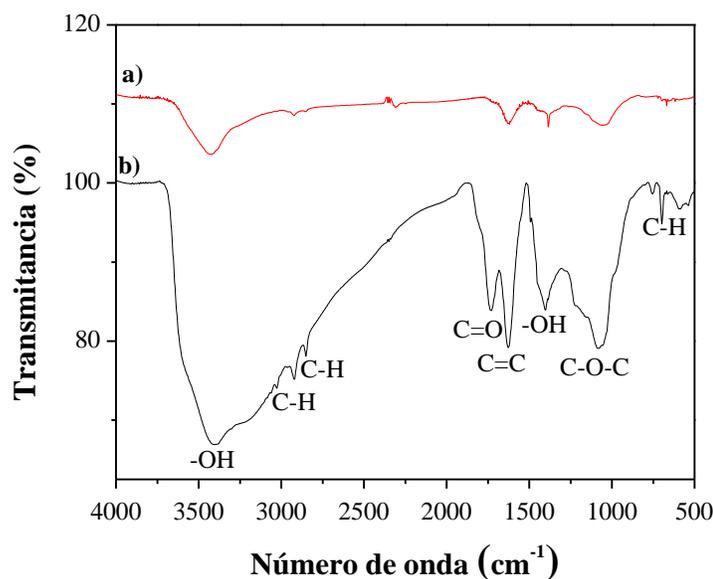


Figura 4.26 Espectros de FT-IR de: a) nanocompuesto Ag/rGO sintetizado extracto acuoso de *Tamarix gallica* (taray) y b) GO.

Además, por esta misma técnica se determinaron los grupos funcionales presentes en el extracto acuoso de *Tamarix gallica* (taray) antes y después de la bioreducción simultánea de iones de Ag y GO. En la Figura 4.27a se muestra el espectro FT-IR del extracto acuoso de taray (*Tamarix gallica*) en el que se aprecian bandas ubicadas a 3390, 2930, 1612, 1355, 1075 y 840 cm^{-1} , correspondientes a los siguientes grupos funcionales: $-\text{OH}$ de alcoholes, C-H de alcanos, C=C de compuestos aromáticos, $\text{CO}-\text{CH}_3$ de bencenos, estos últimos asociados a compuestos aromáticos [95], C-O de alcoholes y C-H de compuestos aromáticos, respectivamente. Estas bandas se asocian a la presencia de diversos compuestos fenólicos, que constan al menos de un fenol, es decir, de un anillo aromático hidroxilado: taninos (ácido gálico y elágico) [120, 121] y flavonoides [19]. Ahora bien, con el espectro FT-IR del extracto acuoso de *Tamarix gallica* (taray), después de la bioreducción (Figura 4.27b) se observó una disminución de la intensidad de las bandas mencionadas, es decir, estos diferentes tipos de compuestos del extracto acuoso actuaron como agentes reductores y/o estabilizadores en la síntesis de AgNPs y de manera simultánea en la bioreducción del GO para formar el nanocompuesto de interés. Estos resultados se corroboran con los obtenidos por DRX (ver Figura 4.20), en la que se identificó al compuesto 5, 7 dihidroxi-3,3',4' trimetoxiflavona como uno de los compuestos remanentes en el nanocompuesto, responsable de la estabilización, el cual tiene en su estructura grupos funcionales $-\text{OH}$ unidos a anillos aromáticos y metilos (CH_3) unidos por un átomo de oxígeno a carbonos de anillos aromáticos.

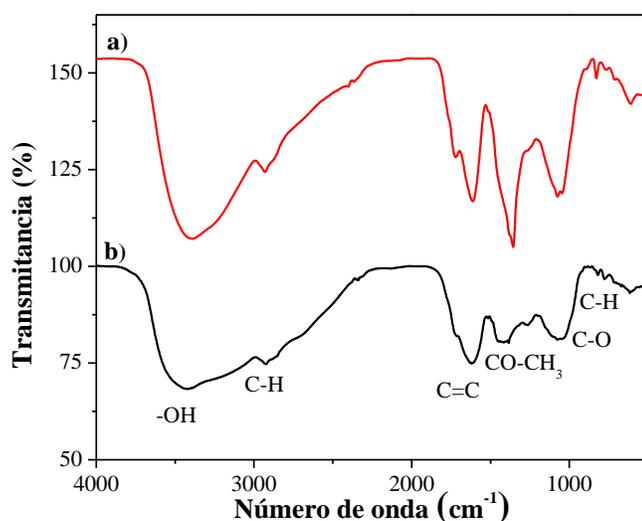


Figura 4.27 Espectro de FT-IR del extracto acuoso de *Tamarix gallica* (taray): a) antes de la bioreducción y b) después de la bioreducción.

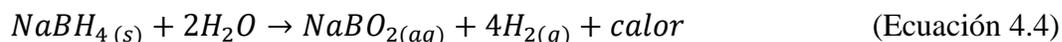
4.4 Síntesis híbrida del nanocompuesto Cu₂O/rGO

La biosíntesis del nanocompuesto Cu₂O/rGO no fue posible utilizando únicamente el extracto acuoso de *Tamarix gallica* (taray), debido a que el potencial de reducción estándar del Cu es de +0.34 V, este potencial mide la tendencia de una especie química a reducirse, entre más positivo sea, más probable será que se reduzca, sin embargo, para este metal el valor es bajo, indicativo de que la posibilidad de reducción no es fácil, a diferencia de la Ag que tiene un potencial estándar de reducción más alto, +0.80 V, o bien, el caso del Au, +1.50 V [122, 123].

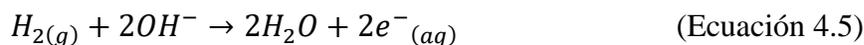
Una alternativa para lograr la reducción de los iones de Cu²⁺, es utilizar un agente reductor fuerte, en este caso se consideró el NaBH₄ mediante síntesis convencional o síntesis híbrida, tal como lo señala Aguilar y Col. [96, 124], quienes sintetizaron nanocubos de Cu₂O al combinar NaBH₄ con CuCl₂, además, prepararon nanopartículas esféricas por síntesis híbrida al utilizar NaBH₄, CuCl₂ y extracto acuoso de *Origanum vulgare* (orégano).

Para la síntesis híbrida del nanocompuesto Cu₂O/rGO, se utilizó como agente reductor, NaBH₄ 26 mM, la sal precursora, CuCl₂ 15 mM y extracto acuoso de *Tamarix gallica* (0.02 g/mL, taray) como agente estabilizador, como se muestra en la Figura 4.28. Se añaden diferentes reacciones químicas referentes a la reducción del cobre y GO. En este caso, el NaBH₄ actúa como agente reductor de los iones Cu²⁺ y de los diversos grupos funcionales oxigenados del GO (carboxilo, éter y alcohol), se pueden deducir más claramente las reacciones que suceden, ya que se conoce exactamente la fórmula química del agente reductor y es solamente uno. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que el cobre también se oxida fácilmente, es por ello, que se obtuvieron Cu₂ONPs.

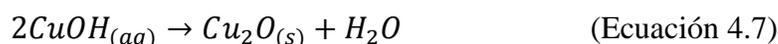
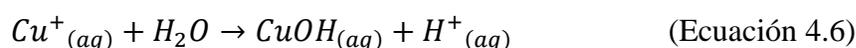
En solución acuosa, el CuCl₂ se disocia en iones [Cu (H₂O)₆]²⁺ (responsables de la coloración celeste) y aniones Cl⁻, que pueden coordinarse parcialmente con los iones de cobre. En [Cu (H₂O)₆]²⁺, las seis moléculas de agua rodean completamente el ion Cu²⁺, protegiéndolo. La adición de NaBH₄ provoca la siguiente reacción [125]:



El hidrógeno, que interactúa con los iones hidroxilo, provoca la producción de electrones solvatados [125]:



Estos electrones pueden penetrar el ion $[Cu(H_2O)_6]^{2+}$ reduciéndolo a iones $Cu^{+}(H_2O)_x$ ($x=1-4$). La accesibilidad del ion de cobre en esos complejos es altamente favorecida, ya que la coordinación con el agua es menos fuerte. El ion Cu^{+} reducido puede conducir a la formación de cuprita (Cu_2O) a través de la siguiente reacción [125]:



Mediante el Cu_2O formado, empieza el proceso de nucleación y crecimiento de las Cu_2ONPs , estabilizadas con las biomoléculas (flavonoides, taninos, carotenoides, antocianinas, aceites esenciales, entre otras) del extracto acuoso de *Tamarix gallica* (taray).

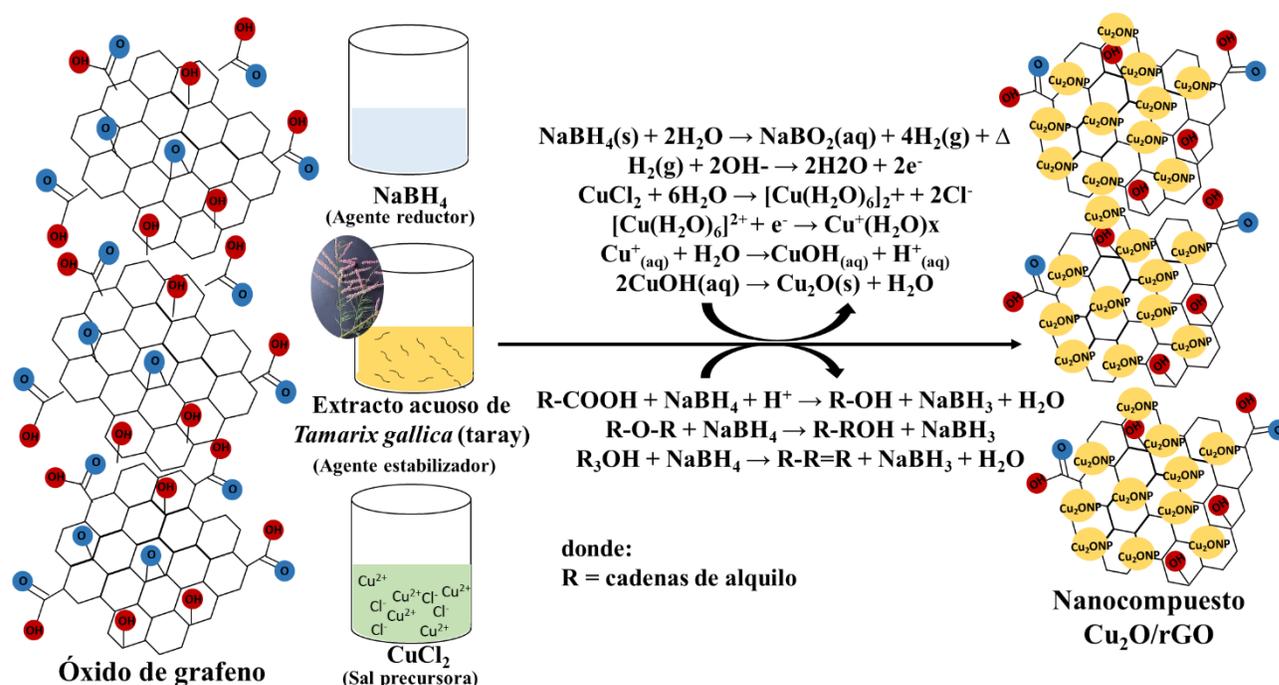


Figura 4.28 Esquema general del mecanismo de síntesis del nanocompuesto Cu_2O/rGO .

Se sonicaron 0.004 g de GO en 12 mL de NaBH₄ por 25 min, para tener la misma cantidad de GO que en el nanocomposito Ag/rGO, posteriormente, se mantuvo en agitación constante a 6 STIR, se añadieron 2.5 mL de extracto acuoso de *Tamarix gallica* (taray) y por goteo se añadieron 10 mL de la sal precursora, CuCl₂ 15 mM. Se monitoreo el cambio de coloración de la reacción, de negro a ocre, similar a un marrón claro, indicativo de la formación de Cu₂ONPs, así como de la reducción simultánea de GO.

En la Figura 4.29 se muestra el espectro de UV-Vis del nanocomposito sintetizado, en el cual se observan tres bandas definidas. La primera ubicada a 278 nm, es indicativa del corrimiento hacia el rojo del GO por su reducción y restantes, situadas a 355 y 440 nm, características del fenómeno SPR de las Cu₂ONPs. Similar a lo reportado por Magyai y Col. [126], quienes por un método sol-gel obtuvieron Cu₂ONPs, observando dos bandas de absorción a 368 y 448 nm, la primera asociada a la presencia de cristales de ~ 5 nm, y la segunda a cristales de entre ~ 15-20 nm. Además, se observó el desplazamiento hacia el azul, indicativo de nanosólidos de menor tamaño, comparado con lo obtenido por Yang y Col. [84] y Mohan y Col. [127].

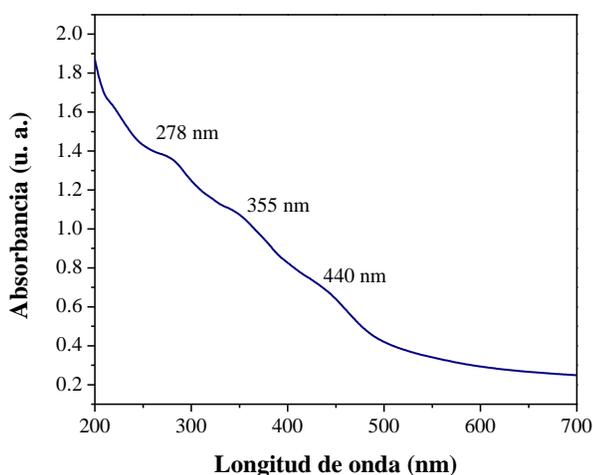


Figura 4.29 Espectro de UV-Vis del nanocompuesto Cu₂O/rGO obtenido por síntesis híbrida.

En la Figura 4.30a-d se muestran las micrografías obtenidas por MEB con la técnica de LABE a diferentes ampliaciones, en las cuales se aprecia una gran cantidad de Cu₂ONPs depositadas exitosamente en la nanopelícula cuya forma es esférica con tamaños inferiores a 30 nm. Estas nanopartículas fueron obtenidas por una síntesis híbrida utilizando el extracto acuoso de *Tamarix*

gallica (taray) como agente estabilizador. Además, el análisis químico EDS (Figura 4.30e), realizado a la zona mostrada en la Figura 4.30d, demostró la presencia de C, O y Cu, lo que confirma la formación del nanocompuesto de interés $\text{Cu}_2\text{O}/\text{rGO}$.

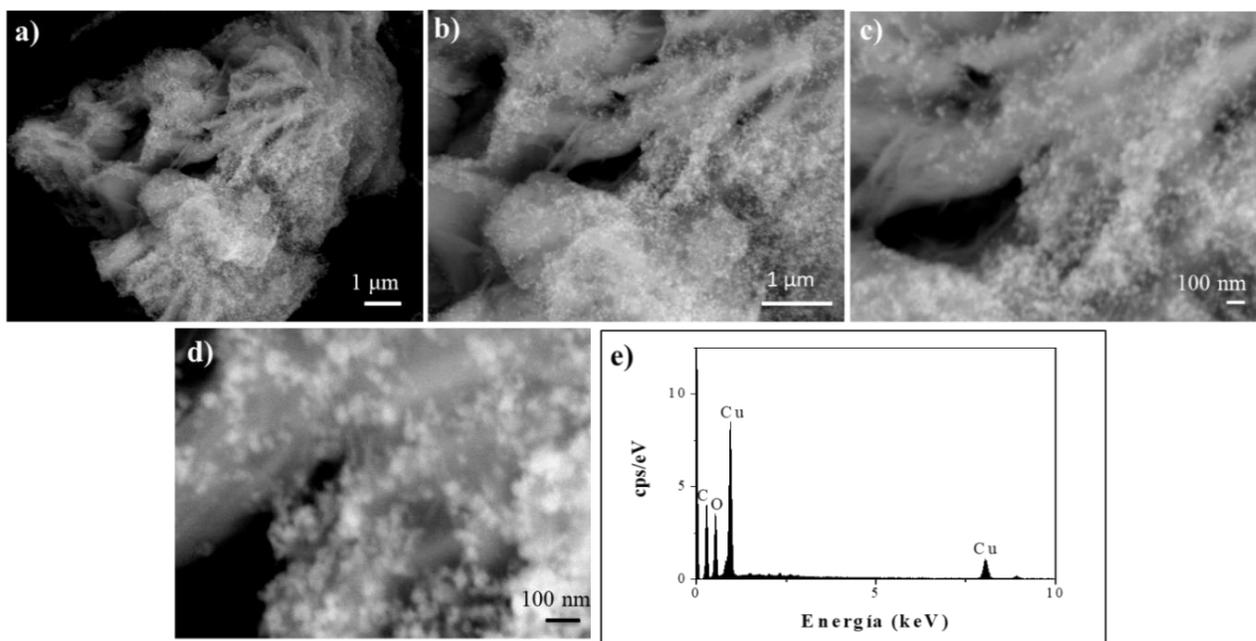


Figura 4.30 Micrografías de MEB registradas con la técnica de LABE del nanocompuesto $\text{Cu}_2\text{O}/\text{rGO}$: a) 10,000 X, b) 20,000 X, c) 40,000 X, d) 100,000 X y, e) análisis químico EDS.

Las Cu_2ONPs fueron de tamaños inferiores a las sintetizadas por Aguilar y Col. [96], quienes utilizaron *Origanum vulgare* (orégano), los que observaron partículas que se encontraban entre el rango de tamaño de 100 a 250 nm. Estas diferencias pueden atribuirse a que el extracto acuoso de *Tamarix gallica* (taray) puede contener una mayor cantidad de agentes estabilizadores. Mientras que, otros estudios encuentran que el extracto acuoso de *Origanum vulgare* (orégano) tiene una cantidad insuficiente de agentes estabilizadores [128]. Aunado a lo anterior, la nucleación al sintetizar únicamente NPs es homogénea, mientras que, en este caso, al utilizar el GO, la nucleación es heterogénea. Se considera nucleación homogénea cuando un sólido se forma dentro de su propio líquido sin la ayuda de materiales externos, por lo que requiere de grandes fuerzas conductoras debido a la relativamente mayor contribución de la energía de superficie a la energía libre total de muy pocas partículas, mientras que, en la nucleación heterogénea la cristalización da inicio sobre partículas de impurezas, evitando así las grandes barreras termodinámicas de la nucleación

homogénea [129]. Ante la presencia de la nanopelícula que aumenta el número de núcleos, la barrera energética para que se produzca la nucleación disminuye gradualmente en comparación con la nucleación homogénea, esta es menor en función de un factor $f(\theta)$, que puede ser evaluado en función del ángulo de mojado [129, 130]. Por lo tanto, la nucleación heterogénea favorece la formación de nanopartículas de menor tamaño, las cuales presentan alta relación área superficial/volumen y son agentes más eficientes para la actividad antibacteriana [131]. De esta manera, resulta favorable para la aplicación antibacteriana la disminución de tamaño de las Cu_2ONPs en comparación con el método de referencia.

En la Figura 4.31 se muestra el patrón de DRX del nanocompuesto $\text{Cu}_2\text{O}/\text{rGO}$, con el cual se comprobó la cristalinidad del nanocompuesto sintetizado, se observan picos centrados a $2\theta = 29.56, 36.57, 42.45, 61.50, 73.65$ y 77.57° indexados a los planos (110), (111), (200), (220), (311) y (222) de la estructura cúbica simple (sc) del Cu_2O (Pn-3m, 224), de acuerdo a la tarjeta de difracción [01-077-0199]. Este patrón de DRX no mostró el pico correspondiente al rGO, similar a lo reportado por Sharma y Col. [86], lo cual atribuyeron al bajo porcentaje de rGO y la depositación de Cu_2ONPs en rGO. A través del semiancho del pico principal y la ecuación de Debye-Scherrer, se determinó el tamaño promedio de cristal de las Cu_2ONPs depositadas en el rGO, obteniéndose un valor de 18 nm.

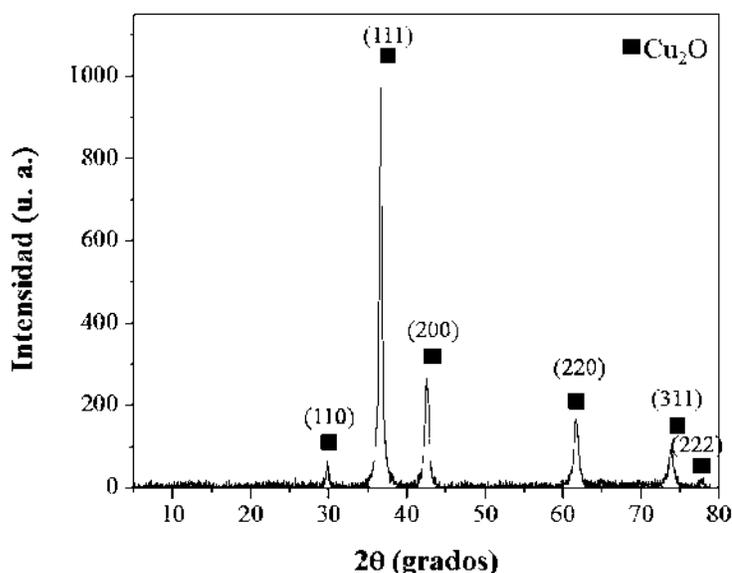


Figura 4.31 Difractograma de nanocompuesto $\text{Cu}_2\text{O}/\text{rGO}$ obtenido por síntesis híbrida.

Por otro lado, se realizaron pruebas por espectroscopía FT-IR, para identificar los grupos funcionales presentes en el nanocompuesto $\text{Cu}_2\text{O}/\text{rGO}$, como se muestra en la Figura 4.32a, observándose bandas de absorción a: 3429, 2922, 2855, 1750, 1616, 1460, 1385, 1050 y 616 cm^{-1} , correspondientes a los grupos funcionales $-\text{OH}$, C-H, C-H, C=O, C=C, $-\text{OH}$, C-O-C y Cu-O, de alcoholes/agua, alcanos, alcanos, ácidos carboxílicos, compuestos aromáticos, ácidos carboxílicos, éteres y óxido de cobre (I), respectivamente, esta última banda es similar a la reportada en el trabajo de Kouti y Col. [132], quienes muestran una banda de absorción a 623 cm^{-1} correspondiente al mismo grupo funcional. Además, se observó claramente una disminución de los grupos respecto al espectro del GO (Figura 4.32b), así como la desaparición de las bandas correspondientes al grupo C-H de los compuestos aromáticos ($755\text{ y }697\text{ cm}^{-1}$) y un aumento en las bandas correspondientes a los alcanos (C-H) debido al proceso de reducción.

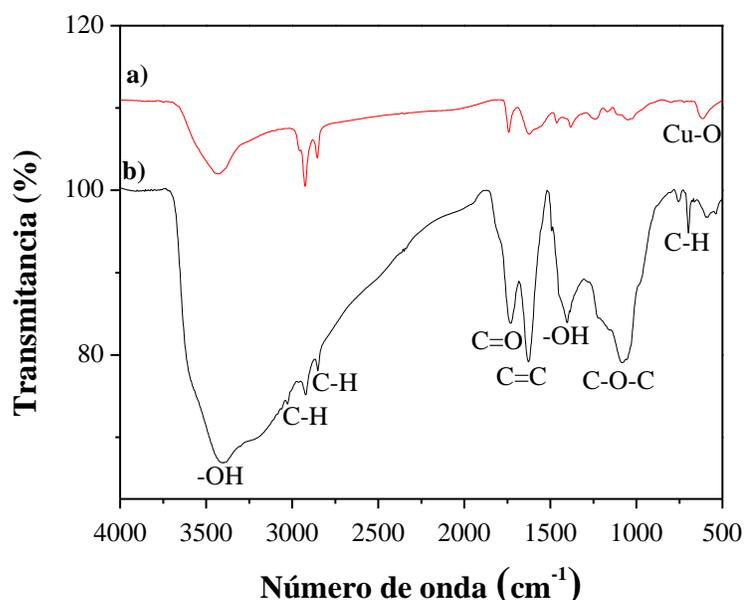


Figura 4.32 Espectros de FT-IR de: a) nanocompuesto $\text{Cu}_2\text{O}/\text{rGO}$ y b) GO.

4.5 Estimación de la concentración de NPs por espectrofotometría de absorción atómica (AA)

La técnica de espectrofotometría de absorción atómica (AA) permite estimar la concentración de AgNPs y Cu_2ONPs presente en los nanocompuestos sintetizados de manera indirecta.

4.5.1 AgNPs

La estimación de AgNPs se realizó por medio de AA, se midieron las absorbancias de los estándares previamente preparados para la elaboración de la curva de calibración mostrada en la Figura 4.33, en la cual se añadió la ecuación ajustada a los puntos de referencia.

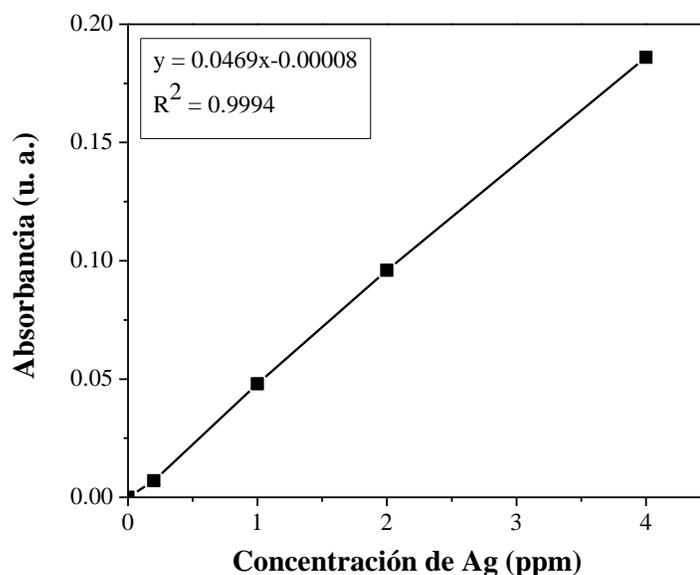


Figura 4.33 Curva de calibración para la estimación de AgNPs.

Para la estimación de las AgNPs en el nanocompuesto Ag/rGO, se recuperaron los sólidos por centrifugación a 12,000 rpm hasta la desaparición de la banda correspondiente al fenómeno SPR de estos nanosólidos en el sobrenadante utilizando la técnica de espectroscopía UV-Vis. Este sobrenadante, así como la sal precursora utilizada (AgNO_3 5mM) se analizaron en espectroscopía AA. En la Tabla 4.6 se muestran los resultados obtenidos de la estimación de AgNPs en los nanocompuestos sintetizados de acuerdo a la Ecuación 3.3, así como el porcentaje de rendimiento obtenido de la Ecuación 3.4. Se determinó que la concentración de AgNPs presentes en el nanocompuesto es de 33 ppm, mientras que el porcentaje de rendimiento fue de 40%.

Tabla 4.6 Estimación de AgNPs en el nanocompuesto Ag/rGO.

Muestra	C _{inicial} (ppm)	C _{sobrenadante} (ppm)	C _{AgNPs} (ppm)	Rendimiento (%)
Ag/rGO	83	50	33	40
AgNO ₃ 5 mM	579			

4.5.2 Cu₂ONPs

La estimación de Cu₂ONPs se realizó por medio de AA, similar a lo realizado para determinar la concentración de AgNPs, se midieron las absorbancias de los estándares previamente preparados para la elaboración de la curva de calibración mostrada en la Figura 4.34, en la cual se añadió la ecuación ajustada a los puntos de referencia.

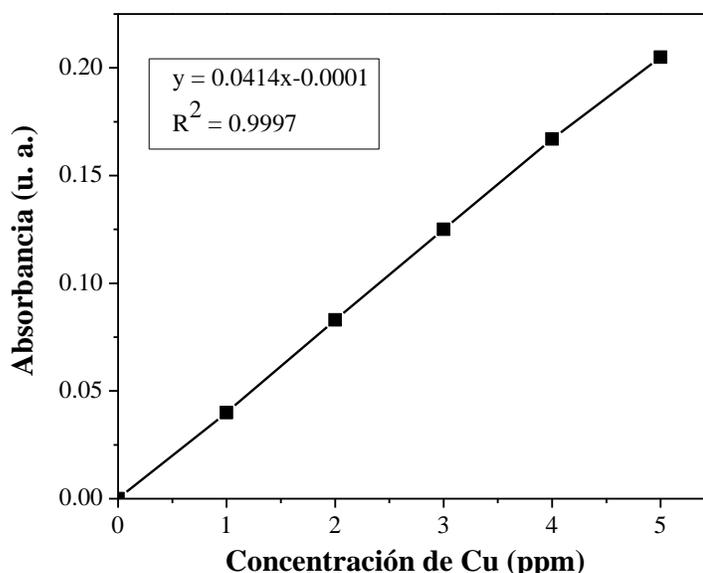


Figura 4.34 Curva de calibración para la estimación de Cu₂ONPs.

Para la estimación de las Cu₂ONPs en el nanocompuesto Cu₂O/rGO, de igual manera que en la sección anterior, se recuperaron los sólidos por centrifugación a 12,000 rpm hasta la desaparición de la banda correspondiente al fenómeno SPR de estos nanosólidos en el sobrenadante utilizando la técnica de espectroscopía UV-Vis. Este sobrenadante, así como la sal precursora utilizada (CuCl₂ 15 mM) se analizaron en espectrofotometría de AA. En la Tabla 4.7 se muestran los resultados de la estimación para las Cu₂ONPs en el nanocompuesto Cu₂O/rGO de acuerdo a la Ecuación 3.4, así

como el porcentaje de rendimiento derivado de la Ecuación 3.5. Se determinó que la concentración de Cu₂ONPs presentes en el nanocompuesto fue de 329 ppm, mientras que el porcentaje de rendimiento fue de 94%.

Tabla 4.7 Estimación de Cu₂ONPs en el nanocompuesto Cu₂O/rGO.

Muestra	C _{inicial} (ppm)	C _{sobrenadante} (ppm)	C _{Cu₂ONPs} (ppm)	Rendimiento (%)
Cu ₂ O/rGO	351	22	329	94
CuCl ₂ 15 mM	861			

Por lo tanto, los rendimientos de síntesis para los nanocompuestos Ag/rGO y Cu₂O/rGO, obtenidos por métodos verde e híbrido, fueron de 40 y 94%, respectivamente. Cabe señalar que una de las ventajas al usar agentes reductores químicos en este tipo de síntesis, es precisamente los mejores rendimientos que se obtienen [133], aunque son menos amigables con el medio ambiente, que los métodos biológicos. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, no fue posible sintetizar el nanocompuesto Cu₂O/rGO utilizando únicamente el extracto acuoso de *Tamarix gallica* (taray), debido al bajo potencial de reducción estándar de este metal, se requirió un agente reductor fuerte, como el NaBH₄.

4.6 Rendimiento de síntesis por peso seco

Se realizó un rendimiento de síntesis por peso seco para la síntesis de los nanocompuestos Ag/rGO y Cu₂O/rGO. Primero se calculó que la cantidad de extracto acuoso obtenido por 1 g de *Tamarix gallica* (taray) es de 35 mL.

Para el nanocompuesto Ag/rGO se utilizó una relación volumétrica 5:1:1 de GO, extracto acuoso de *Tamarix gallica* (taray) y sal precursora AgNO₃ 5 mM. Se colocó una charola para pesaje en el horno a 50° C por 24 h para eliminar la humedad y se pesó. Posteriormente, se sintetizó el nanocompuesto y se puso a secar en la charola bajo las mismas condiciones. Una vez concluido el tiempo de secado, se pesó la charola con los polvos y mediante diferencia de pesos se calculó la cantidad de Ag/rGO obtenido, de acuerdo a la ecuación 3.5, obteniéndose 0.0108g.

Por lo tanto, por cada 10 mL de extracto acuoso de *Tamarix gallica* (taray), se obtienen 0.0108 g del nanocompuesto Ag/rGO. Se realizó una estimación de la cantidad de extracto necesaria para sintetizar 1 g de nanocompuesto, como se muestra en la Tabla 4.8. En la cual se observa que se requieren 26.48 g de extracto seco de *Tamarix gallica* (taray) para obtener 1 g del nanocompuesto, considerando que por cada gramo se obtienen 35 mL de extracto acuoso.

Tabla 4.8 Estimación de reactivos para obtener 1 g de nanocompuesto Ag/rGO.

	0.0108 g del nanocompuesto Ag/rGO	1 g del nanocompuesto Ag/rGO
GO	0.004 g	0.370 g
Extracto acuoso de <i>Tamarix gallica</i> (0.02 g/mL)	10 mL	925.936 mL
Sal precursora AgNO ₃ (5 mM)	10 mL	925.936 mL
Planta medicinal seca <i>Tamarix gallica</i> (taray)	0.286 g	26.48 g

Para el nanocompuesto Cu₂O/rGO se utilizaron 12 mL de NaBH₄ 26 mM, 10 mL de CuCl₂ 15 mM, 2.5 mL de extracto acuoso de *Tamarix gallica* (taray) y 0.004 g de GO. Se realizó un procedimiento análogo al de la determinación del peso seco del nanocompuesto Ag/rGO y de acuerdo a la ecuación 3.5, se calculó la diferencia de pesos.

Por lo tanto, por cada 2.5 mL de extracto acuoso de *Tamarix gallica* (taray), se obtienen 0.0169 g del nanocompuesto Cu₂O/rGO. Se realizó una estimación de la cantidad de extracto necesaria para sintetizar 1 g de nanocompuesto, como se muestra en la Tabla 4.9. En la cual se observa que se requieren 4.227 g de extracto seco de *Tamarix gallica* (taray) para obtener 1 g del nanocompuesto, considerando que por cada gramo se obtienen 35 mL de extracto acuoso.

Tabla 4.9 Estimación de reactivos para obtener 1 g de nanocompuesto Cu₂O/rGO.

	0.0169 g del nanocompuesto Cu ₂ O/rGO	1 g del nanocompuesto Cu ₂ O/rGO
GO	0.004 g	0.237 g
Extracto acuoso de <i>Tamarix gallica</i> (0.02 g/mL)	2.5 mL	147.929 mL
NaBH ₄ (26 mM)	12 mL	710.060 mL
Sal precursora CuCl ₂ (15 mM)	10 mL	591.716 mL
Planta medicinal seca <i>Tamarix gallica</i> (taray)	0.071 g	4.227 g

4.7 Evaluación antibacterial

Se determinó el efecto antibacteriano de los nanocompuestos Ag/rGO y Cu₂O/rGO sobre *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 29213 por el método de difusión en agar o halo de inhibición (Kirby-Bauer). Dado que las bacterias se encontraban liofilizadas se reactivaron en agar Muller-Hinton con la técnica de estría cruzada y se incubaron a 37° C por 24 h. Posteriormente, con las cepas reactivadas, se prepararon los inóculos en solución salina 4% ajustándose la absorbancia entre 0.08 y 0.1 unidades mediante espectroscopía UV-Vis a una longitud de onda de 625 nm. Se sumergió un hisopo estéril en el inóculo y se sembró en agar Muller-Hinton. Una vez seco, se colocaron los sensidiscos en las cajas. Se añadieron 10 µL de cada una de las soluciones a evaluar en cada sensidisco: Eritromicina (control positivo), agua desionizada (control negativo) y los nanocompuestos a diferentes concentraciones (0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 y 10.0 mg/mL). Se incubaron a 37° C por 48 h y finalmente se midieron los halos de inhibición con un Vernier.

En la Figura 4.35 se muestran los resultados obtenidos de la prueba antibacterial del nanocompuesto Ag/rGO contra las bacterias patógenas *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 29213. En ambos casos la Eritromicina mostró un halo de inhibición mayor al del nanocompuesto. A partir de la concentración 2.50 mg/mL se empezó a observar halo de inhibición, el cual fue aumentando a medida que incrementaba la concentración (Figura 4.35e), mientras que, efectivamente el control negativo (agua desionizada) presentó nula inhibición del crecimiento

bacteriano. La mayor zona de inhibición con el nanocompuesto para ambas bacterias fue con 10 mg/mL.

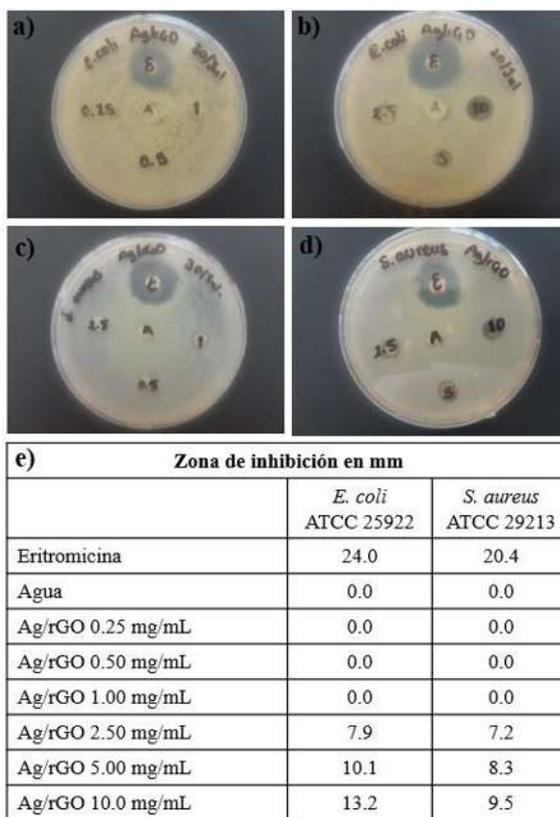


Figura 4.35 Actividad antibacteriana del nanocompuesto Ag/rGO ante a-b) *Escherichia coli* ATCC 25922, c-d) *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y e) la zona de inhibición.

Con estos resultados se demuestra que ambas bacterias son sensibles al nanocompuesto Ag/rGO biosintetizado con el extracto acuoso de *Tamarix gallica* (taray). Barua y Col. [84] demostraron que el nanocompuesto Ag/rGO obtenido con extracto de *Colosia esculenta* tiene actividad antibacteriana contra *E. coli* ATCC 10536 y *S. aureus* ATCC 11632 con zonas de inhibición de crecimiento de 18.84 y 23.82 mm, respectivamente. Estas zonas de inhibición son de tamaños superiores con concentraciones inferiores a las obtenidas en este trabajo, sin embargo, se debe considerar que Barua y Col. [84] utilizaron una cantidad de líquido cinco veces mayor a la utilizada en este proyecto y las diferencias genéticas entre las cepas de las bacterias patógenas seleccionadas.

Por otro lado, los resultados de la prueba antibacterial para el nanocompuesto $\text{Cu}_2\text{O}/\text{rGO}$, mostrados en la Figura 4.36, utilizando las mismas concentraciones que para Ag/rGO no mostraron actividad bactericida ante *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 29213. Sin embargo, con la concentración de 10 mg/mL, se observó actividad bacteriostática ante *E. coli* (Figura 4.36d). Las definiciones de “bacteriostático” y “bactericida” son diferentes, la primera hace referencia a que el agente evita el crecimiento de las bacterias (es decir, las mantiene en fase estacionaria de crecimiento), y, la segunda, significa que mata las bacterias [134]. En este caso, el halo formado indica que inhibió el porcentaje de bacterias dentro de las 48 h, pero no lo suficiente (> 99.9%) para ser considerado bactericida, éste se mantuvo después de 8 días.

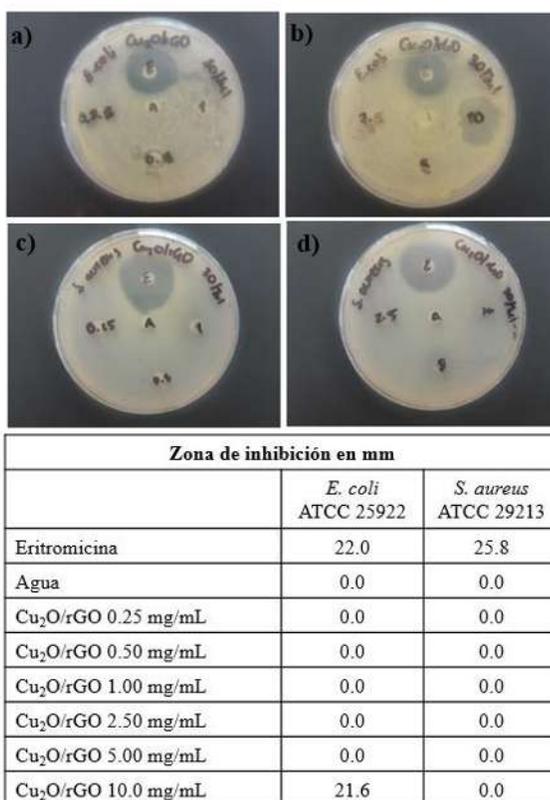


Figura 4.36 Actividad antibacterial del nanocompuesto $\text{Cu}_2\text{O}/\text{rGO}$ ante a-b) *Escherichia coli* ATCC 25922, c-d) *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y e) la zona de inhibición.

Ambas bacterias, gram positivas (*S. aureus*) y gram negativas (*E. coli*) tienen una superficie cargada negativamente. Las diferencias en la actividad bacteriana entre los dos grupos de bacterias, se puede atribuir a que las bacterias gram positivas tienen una capa gruesa de peptidoglucano

formada por cadenas lineales que alternan residuos de N acetilglucosamina (NAG) y ácido N-acetilmurámico (NAM) unidos por una secuencia de 3 a 5 aminoácidos que se entrecruzan, formando una malla. Además, los ácidos teicoicos cargados negativamente (con altos niveles de grupos fosfato) se extienden desde la pared celular hasta la superficie de la mayoría de las bacterias gram positivas. Por otro lado, las bacterias gram negativas, tienen una estructura ligeramente más compleja. Además de la capa delgada de peptidoglicano, tienen una membrana externa de fosfolípidos con lipopolisacáridos parcialmente fosforilados que contribuyen a aumentar la carga superficial negativa de su membrana celular [135]. Las paredes celulares bacterianas cargadas negativamente atraen NPs cargadas positivamente a su superficie debido a las interacciones electrostáticas. Por otro lado, las NPs a base de metal cargadas positivamente establecen un fuerte enlace con las membranas, lo que resulta en la interrupción de las paredes celulares y, en consecuencia, aumenta su permeabilidad. Además, las NPs también pueden liberar iones metálicos del espacio extracelular, capaces de ingresar a la célula y alterar los procesos biológicos [135]. Aunado a lo anterior, el rGO puede inducir daño a las células bacterianas a través del deterioro físico que ocasiona en la membrana bacteriana [17].

4.8 Sección de discusión del trabajo

En esta sección se menciona de manera general los resultados del presente trabajo.

Mediante los resultados experimentales se demostró que no todos los extractos de las plantas pueden utilizarse, como agentes reductores y estabilizadores. Aunque algunos muestran un alto poder reductor no cuentan con agentes estabilizantes suficientes para impedir el crecimiento de las NPs, además, no presentan un potencial de reducción que asegura la obtención de NPs de cada metal.

Otro aspecto importante es el contenido de cloro en algunos extractos, que conlleva a la pérdida de eficiencia del proceso. En este caso, al combinarse con la plata, da lugar al compuesto insoluble AgCl y, por ende, disminuye la cantidad formada de AgNPs. Por esta razón se recurrió a una planta cuyos resultados indican la ausencia de cloro en su estructura.

Para oxidar el grafito, el método Marcano y Col. que desprende menos gases tóxicos, se utilizó en este trabajo. La exfoliación del óxido de grafito en agua desionizada a una concentración de 0.08 mg/mL ayudada mediante ultrasonido presentó las máximas absorbancias a través de la técnica de espectroscopía UV-Vis. Utilizando el método de DRX, se comprobó la formación del GO por la presencia de un pico a $2\theta = 10.4^\circ$, correspondiente a los planos (002) de su estructura hcp, que presenta una distancia interplanar de 8.50Å, tamaño promedio de cristal de 6.5 nm, (FWHM=1.22°) y número de capas entre 9-16. Esta última estimación fue realizada combinando los datos de la densidad real con la Ec. de Debye-Scherrer y la Ley de Bragg. En un futuro, será complementario calcular este dato por espectroscopía Raman para mayor exactitud.

El GO presentó un tamaño promedio de partícula de 4.6 μm , valor muy cercano al establecido como meta (5 μm). Ya que las dimensiones promedio de las bacterias oscilan entre 0.5-1 μm de diámetro y 2-5 μm de longitud, esas dimensiones del GO, serán muy útiles para la acción antibacteriana de esta nanopelícula, que consistirá en cubrir la bacteria y ocasionar daños en la membrana celular. Si bien, al aumentar el número de capas del GO y rGO podría influir en la actividad antibacteriana, esto no afecta la propiedad antibacteriana ya que el incremento relativo en el espesor del grafeno es mínimo o nulo considerando que hablamos de distancias entre los átomos.

Los procesos de formación de AgNPs con un tamaño promedio de cristal de 35 nm y la reducción del óxido de grafeno se obtuvieron de manera simultánea mediante las biomoléculas del extracto acuoso de *Tamarix gallica* (taray). Esto de acuerdo a los resultados generados mediante las espectroscopías UV-Vis y FT-IR, así como, DRX, MEB y METB.

Se evaluó la depositación de AgNPs en el rGO a diferentes relaciones volumétricas de GO, extracto y sal precursora (1:1:1, 5:1:1 y 10:1:1). Se observó una depositación más homogénea en la relación correspondiente a 5:1:1, dado que, en el valor 1:1:1, las AgNPs se encontraron aglomeradas por la reducción del área superficial disponible para su nucleación. Mientras que, al valor de 10:1:1 la cantidad de AgNPs fue escasa, debido al incremento del GO.

La biosíntesis del nanocompuesto $\text{Cu}_2\text{O}/\text{rGO}$ por medio del extracto acuoso de *Tamarix gallica* (taray) no tuvo éxito, debido al bajo potencial de reducción estándar del cobre. Sin embargo, este

extracto funcionó excelente como agente estabilizador, al mediar la síntesis convencional de Cu₂ONPs empleando como agente reductor NaBH₄, y arrojando nanosólidos de morfología esférica con tamaño promedio de cristal de 18 nm depositadas sobre rGO.

El tamaño de las AgNPs y Cu₂ONPs en la nanopelícula, es de particular interés para la aplicación antibacterial de los nanocompuestos sintetizados, en virtud que, al disminuir el tamaño de las NPs, aumenta su relación área superficial/volumen y como consecuencia, se disponen agentes antimicrobianos más eficaces que pueden circundar y penetrar fácilmente la célula y afectar su funcionamiento hasta conducirla a la muerte.

El rendimiento en una reacción química hace referencia a la cantidad de producto que se obtiene a partir de los reactivos. En este trabajo, se consideran reactivos a las sales precursoras AgNO₃ y CuCl₂, para formar los productos de interés, AgNPs y Cu₂ONPs. La técnica de espectrofotometría de absorción atómica, permitió hacer una estimación de manera indirecta de estos valores, al cuantificar la cantidad de iones en solución después de sedimentar los nanosólidos. Para las AgNPs en el nanocompuesto Ag/rGO fue de 40%, en comparación, con las Cu₂ONPs en el nanocomposito Cu₂O/rGO presentó un rendimiento considerablemente mayor (94%). Estas diferencias se atribuyeron a los diferentes tipos de síntesis utilizados, con métodos híbridos o convencionales se registraron mejores rendimientos de reacción.

La actividad bacteriana del nanocompuesto Ag/rGO ante las bacterias *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 29213 se consiguió a partir de la concentración de 2.5 mg/mL, mientras que, Cu₂O/rGO mostró únicamente actividad bacteriostática para *E. coli* ATCC 25922 con 10 mg/mL.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

En este trabajo se obtuvieron nanocompuestos Ag/rGO y Cu₂O/rGO mediante síntesis verde e híbrida, respectivamente. Los nanocompuestos fueron estudiados en sus propiedades antibacteriales contra *E. coli* y *S. aureus*. El nanocompuesto Ag/rGO mostró el mejor comportamiento antibacterial ante las cepas seleccionadas, que reafirma las mayores propiedades antibacterianas de la Ag.

A continuación, se enlistan una serie de conclusiones específicas:

1. La capacidad antioxidante y cantidad de fenoles totales de los distintos extractos de plantas medicinales evaluados para la preparación de los nanocompuestos, indicaron los mejores resultados en *Cuphea aequipetala* (hierba del cáncer), siendo de 89.5% y 29.3 µg EAG/mL, respectivamente.
2. El alto potencial antioxidante y cantidad de fenoles en los extractos de las plantas medicinales no garantizó la formación de AgNPs, ya que otros factores, como la cantidad de agentes estabilizadores insuficientes, presencia de iones Cl⁻ y baja velocidad de reducción, también influyeron durante la etapa de síntesis.
3. El óxido de grafito obtenido por medio del método Hummers modificado por Marcano y Col., y posterior exfoliación, permitieron obtener satisfactoriamente nanopelículas de GO con tamaño promedio de partícula de 4.6 µm y número de capas entre 9-16, de acuerdo a las estimaciones realizadas por DRX y el valor de densidad.
4. Mediante *Cuphea aequipetala* (hierba del cáncer) no fue posible formar el nanocompuesto Ag/rGO, debido a que presentó una cantidad insuficiente de agentes estabilizadores.
5. La síntesis del nanocompuesto Ag/rGO fue fácilmente obtenida utilizando el extracto acuoso de *Haematoxylum brasiletto* (palo de brasil), sin embargo, los resultados de DRX mostraron al compuesto AgCl, lo que indica Cl en su estructura, mismo que a pesar de diferentes lavados, no fue posible eliminar.

6. La biosíntesis de AgNPs con tamaño promedio de 35 nm y la bio-reducción del GO se logró exitosamente de manera simultánea mediante las biomoléculas del extracto acuoso de *Tamarix gallica* (taray), las cuales actuaron como agentes reductores y estabilizadores. La depositación más homogénea de AgNPs se consiguió en una relación volumétrica 5:1:1 de GO, extracto y sal precursora AgNO₃ (5 mM).
7. La biosíntesis de Cu₂ONPs no se favorece utilizando únicamente el extracto acuoso de *Tamarix gallica* (taray), ya que el Cu es un metal con bajo potencial de reducción estándar.
8. Mediante un método híbrido, se obtuvieron Cu₂ONPs esféricas con tamaño promedio de cristal de 18 nm depositadas sobre rGO, utilizando como agente reductor fuerte el NaBH₄ y el extracto acuoso de *Tamarix gallica* (taray) como agente estabilizador.
9. Por medio de la técnica de espectrofotometría de absorción atómica se estimaron los rendimientos de las reacciones de depositación de AgNPs y Cu₂ONPs en la nanopelícula, siendo de 40 y 94%, respectivamente, eficiencia claramente mejor al utilizar NaBH₄ como agente reductor.
10. El nanocompuesto Ag/rGO mostró actividad bactericida ante *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 29213 a partir de la concentración de 2.5 mg/mL por el método de difusión en agar. Además, la zona de inhibición fue aumentando de tamaño a medida que se incrementaba la concentración.
11. El nanocompuesto Cu₂O/rGO únicamente mostró actividad bacteriostática ante *E. coli* ATCC 25922 para una concentración de 10 mg/mL por el método de difusión en agar.

5.1 Recomendaciones

Realizar un análisis por espectroscopía Raman para determinar el número de capas del GO y compararlo con las estimaciones realizadas por medio de DRX y la densidad del nanomaterial.

Llevar a cabo los análisis por METB del nanocompuesto Cu₂O/rGO.

Efectuar un análisis mediante la técnica de espectroscopía UV-Vis por reflectancia difusa de los nanomateriales obtenidos en polvo y compararlo con los obtenidos en modo de transmitancia en solución.

Realizar otros análisis de evaluación antibacterial, considerando otros factores, por ejemplo, utilizar los nanocompuestos directos de la síntesis para hacer las diluciones.

5.2 Trabajo futuro

Será interesante evaluar a los nanocompuestos en otras aplicaciones, dado que, los nanomateriales individuales presentan diversas propiedades, que combinadas logran una sinergia. Por ejemplo, otras aplicaciones biomédicas (biosensores, tratamiento contra el cáncer, agente antiviral y antimicótico), ambientales (tratamiento de aguas y degradación de colorantes) y energéticas (baterías, celdas solares y supercapacitores).

Combinar los dos métodos de síntesis ya establecidos en este trabajo para sintetizar un nanocompuesto ternario.

Además, se podrían biosintetizar este tipo de nanocompuestos con las plantas *Oenothera rosea* L'Hér. ex Aiton (hierba del golpe) y *Gentiana spathacea* Kunth (flor de hielo), las cuales tiene un porcentaje de inhibición del radical libre DPPH de 89.4% y 87.8%, respectivamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mondal A, Jana N. *Graphene-Nanoparticle Composites and Their Applications in Energy, Environmental and Biomedical Science*. **Reviews in Nanoscience and Nanotechnology**, 3 177-192, 2014.
2. Slavin Y N, Asnis J, Häfeli U O, Bach H. *Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity*. **Journal of Nanobiotechnology**, 15(1), 65, 2017.
3. Soleymani A R, Rafigh S M, Hekmati M. *Green synthesis of RGO/Ag: As evidence for the production of uniform mono-dispersed nanospheres using microfluidization*. **Applied Surface Science**, 518 146264, 2020.
4. Rajapaksha P, Cheeseman S, Hombach S, Murdoch B, Gangadoo S, Blanch E, Truong Y, Cozzolino D, McConville C F, Crawford R, Truong V K, Elbourne A, Chapman J. *Antibacterial Properties of Graphene Oxide-Copper Oxide Nanoparticle Nanocomposites*. **ACS Applied Bio Materials**, 2(12), 5687-5696, 2019.
5. Chen M, Li Z, Chen L. *Highly antibacterial rGO/Cu₂O nanocomposite from a biomass precursor: Synthesis, performance, and mechanism*. **Nano Materials Science**, 2019.
6. Deepak Kumar P, Tapan Kumar P, Kulamani P, S. K. S, P. M. M. *Green Synthesis of Fe₃O₄/RGO Nanocomposite with Enhanced Photocatalytic Performance for Cr(VI) Reduction, Phenol Degradation, and Antibacterial Activity*. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, 5(11), 10551-10562, 2017.
7. Alsharaeh E, Mussa Y, Ahmed F, Aldawsari Y, Al-Hindawi M, Sing G K. *Novel route for the preparation of cobalt oxide nanoparticles/reduced graphene oxide nanocomposites and their antibacterial activities*. **Ceramics International**, 42(2, Part B), 3407-3410, 2016.
8. Mohamed H H, Hammami I, Baghdadi H A, Al-Jameel S S. *Multifunctional TiO₂ microspheres-rGO as highly active visible light photocatalyst and antimicrobial agent*. **Materials Express**, 8(4), 345-352, 2018.
9. Zhang W, Yang Y, Ziemann E, Be'er A, Bashouti M, Elimelech M, Bernstein R. *One-step sonochemical synthesis of a reduced graphene oxide – ZnO nanocomposite with antibacterial and antibiofouling properties*. **Environmental Science: Nano**, 6 2019.

10. Veisi H, Kavian M, Hekmati M, Hemmati S. *Biosynthesis of the silver nanoparticles on the graphene oxide's surface using Pistacia atlantica leaves extract and its antibacterial activity against some human pathogens*. **Polyhedron**, 161 338-345, 2019.
11. Prüss A, Kay D, Fewtrell L, Bartram J. *Estimating the burden of disease from water, sanitation, and hygiene at a global level*. **Environmental Health Perspectives**, 110(5), 537-542, 2002.
12. WHO. *WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed*[en línea]. Disponible en:<<https://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>> [Consultado 05 de Abril del 2019].
13. Jaworski S, Wierzbicki M, Sawosz E, Jung A, Gielerak G, Biernat J, Jaremek H, Łojkowski W, Woźniak B, Wojnarowicz J, Stobiński L, Małolepszy A, Mazurkiewicz-Pawlicka M, Łojkowski M, Kurantowicz N, Chwalibog A. *Graphene Oxide-Based Nanocomposites Decorated with Silver Nanoparticles as an Antibacterial Agent*. **Nanoscale Research Letters**, 13(1), 116, 2018.
14. Betancur C, Hernández V, Buitrago R. *Nanopartículas para materiales antibacterianos y aplicaciones del dióxido de titanio*. **Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas**, 4 387-402, 2016.
15. Dakal T, Kumar A, Majumdar R, Yadav V. *Mechanistic Basis of Antimicrobial Action of Silver Nanoparticles*. **Frontiers in Microbiology**, 7 1-17, 2016.
16. Gopalakrishnan K, Ramesh C, Raguathan V, Thamilselvan M. *Antibacterial activity of Cu₂O nanoparticles on E. coli synthesized from Tridax procumbens leaf extract and surface coating with polyaniline*. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, 7(2), 833-839, 2012.
17. Tu Y, Lv M, Xiu P, Huynh T, Zhang M, Castelli M, Liu Z, Huang Q, Fan C, Fang H, Zhou R. *Destructive extraction of phospholipids from Escherichia coli membranes by graphene nanosheets*. **Nature Nanotechnology**, 8 594, 2013.
18. Wen J, Salunke B K, Kim B S. *Biosynthesis of graphene-metal nanocomposites using plant extract and their biological activities*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, 92(6), 1428-1435, 2017.

19. Boulaaba M, Snoussi M, Saada M, Mkadmini K, Smaoui A, Abdelly C, Ksouri R. *Antimicrobial activities and phytochemical analysis of Tamarix gallica extracts. Industrial Crops and Products*, 76 1114-1122, 2015.
20. KalamUrfi M, Mujahid M, Badruddeen, JuberAkhtar, Khalid M, Khan M I, Usmani A. *Tamarix gallica: For traditional uses, phytochemical and pharmacological potentials. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8(1), 809-814, 2016.
21. Huyut Z, Beydemir Ş, Gülçin İ. *Antioxidant and Antiradical Properties of Selected Flavonoids and Phenolic Compounds. Biochemistry Research International*, 2017 1-10, 2017.
22. Ranajlt K, Satyajlt T. *Bacteria: A Prospective Source of Metallic Nanoparticles. Research & Reviews: Research Journal of Biology*, 4(3), 24-26, 2016.
23. Baker S, Aston A. *The business of nanotech. Business Week*, 14(02), 65-71, 2005.
24. Bawa R, Maebius S, Iyer C, Bawa S. *Bionanotechnology patents: challenges and opportunities*. 3rd ed. The Crc Biomedical Engineering Handbook. 2006.
25. Hunt W. *Nanomaterials: Nomenclature, novelty and necessity. The Journal of The Minerals, Metals & Materials Society (TMS)*, 56(10), 13-18, 2004.
26. Queijo Á A. *Arquitecturas supramoleculares generadas por nuevos derivados de ciclodextrina y ácidos biliares. Tesis de Doctorado*. Universidad de Santiago de Compostela. Servizo de Publicacións e Intercambio Científico. 2008.
27. Mijatovic D, Eijkel J, Van den Berg A. *Technologies for nanofluidic systems: Top-down vs. bottom-up - A review. Lan on a Chip*, 5(5), 492-500, 2005.
28. Nasrollahzadeh M, Sajadi S M, Sajjadi M, Issaabadi Z, Atarod M. *An Introduction to Green Nanotechnology*. First ed. United Kingdom. Academic Press. 2019.
29. Pokropivny V V, Skorokhod V V. *Classification of nanostructures by dimensionality and concept of surface forms engineering in nanomaterial science. Materials Science and Engineering: C*, 27(5), 990-993, 2007.
30. Ashby M F, Ferreira P J, Schodek D L. *Chapter 6 - Nanomaterials: Classes and Fundamentals*. En: *Nanomaterials, Nanotechnologies and Design*. Michael F. Ashby, Ferreira Paulo J., Schodek Daniel L. 177-197. 2009.

31. Oluwafemi O S, Vuyelwa N, Scriba M, Songca S P. *Green controlled synthesis of monodispersed, stable and smaller sized starch-capped silver nanoparticles.* **Materials Letters**, 106 332-336, 2013.
32. Iravani S. *Green synthesis of metal nanoparticles using plants.* **Green Chemistry**, 13(10), 2638-2650, 2011.
33. Khan I, Saeed K, Khan I. *Nanoparticles: Properties, applications and toxicities.* **Arabian Journal of Chemistry**, 12(7), 908-931, 2017.
34. Deepak V, Umamaheshwaran P S, Guhan K, Nanthini R A, Krithiga B, Jaithoon N M H, Gurunathan S. *Synthesis of gold and silver nanoparticles using purified URAK.* **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 86(2), 353-358, 2011.
35. Mallick K, Witcomb M, Scurrrell M. *Polymer stabilized silver nanoparticles: a photochemical synthesis route.* **Journal of Materials Science**, 39(14), 4459-4463, 2004.
36. Haruta M, Delmon B. *Preparation of homodisperse solids.* **Journal de Chimie Physique**, 83 859-868, 1986.
37. Nielsen A E. *Kinetics of Precipitation.* 1964.
38. Silva L, Bonatto C, Pereira F, Dias da Silva L, Albernaz V, Polez V. *Nanotecnologia verde para síntese de nanopartículas metálicas.* En: *Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria.* Blucher. 967-1011. 2017.
39. Silva L P, Pereira T M, Bonatto C C. *Chapter 7 Frontiers and perspectives in the green synthesis of silver nanoparticles.* En: *Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles.* 137-164. 2019.
40. Smitha S L, Philip D, Gopchandran K G. *Green synthesis of gold nanoparticles using Cinnamomum zeylanicum leaf broth.* **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 74(3), 735-739, 2009.
41. Waizel-Bucay J, Martínez-Porcayo G, Villareal-Ortega M L, Alonso-Cortés D, Pliego-Castañeda A. *Estudio preliminar etnobotánico, fitoquímico, de la actividad citotóxica y antimicrobina de Cuphea aequipetala Cav. (Lythraceae).* **Polibotánica**, 15 99-108, 2003.
42. Palacios-Espinosa J F, Arroyo-García O, García-Valencia G, Linares E, Bye R, Romero I. *Evidence of the anti-Helicobacter pylori, gastroprotective and anti-*

- inflammatory activities of Cuphea aequipetala infusion. Journal of Ethnopharmacology*, 151(2), 990-998, 2014.
43. CONAFOR. *Haematoxylum brasiletto* H. Karst[en línea]. Disponible en:<https://www.cnf.gob.mx:8443/snif/especies_forestales/detalles.php?tipo_especie=17> [Consultado 03 de Diciembre de 2019].
 44. Argueta V, Cano L, Rodarte M. *Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana: Instituto Nacional Indigenista. Vol. II. México*, 559, 1994.
 45. Heredia N, Escobar M, Rodríguez-Padilla C, García S. *Extracts of Haematoxylum brasiletto Inhibit Growth, Verotoxin Production, and Adhesion of Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 to HeLa Cells. Journal of Food Protection*, 68(7), 1346-1351, 2005.
 46. Rivero-Cruz J F. *Antimicrobial compounds isolated from Haematoxylum brasiletto. Journal of Ethnopharmacology*, 119(1), 99-103, 2008.
 47. Bello-Martínez J, Jiménez-Estrada M, Rosas-Acevedo J L, Avila-Caballero L P, Vidal-Gutierrez M, Patiño-Morales C, Ortiz-Sánchez E, Robles-Zepeda R E. *Antiproliferative activity of Haematoxylum brasiletto H. Karst. Pharmacognosy Magazine*, 13(Suppl 2), S289-S293, 2017.
 48. Cavanilles A J. *Géneros y especies de plantas demostradas en las lecciones públicas del año 1802*. Madrid, España. 1803.
 49. Mishra V, Sharma R, Nakuleshwar D, Jasuja D, Gupta K. *A Review on Green Synthesis of Nanoparticles and Evaluation of Antimicrobial Activity*. 333 81-94, 2014.
 50. Ahmed S, Ahmad M, Swami B L, Ikram S. *A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. Journal of Advanced Research*, 7 17 - 28, 2016.
 51. Aguilar M S, Rosas G. *A new synthesis of Cu₂O spherical particles for the degradation of methylene blue dye. Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 11 2019.
 52. Novoselov K S, Geim A K, Morozov S V, Jiang D, Zhang Y, Dubonos S V, Grigorieva I V, Firsov A A. *Electric field effect in atomically thin carbon films. Science*, 306(5696), 666-669, 2004.

53. Huo L C R, Shi X, Bai R, Wang P, Chang Y, Chen C. *High-Content Screening for Assessing Nanomaterial Toxicity*. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, 15 1143-1149, 2015.
54. Andrews D L, Lipson R H, Nann T. *Comprehensive Nanoscience and Nanotechnology*. 2nd. Ed. USA. Elsevier. 2019.
55. Lee X J, Hiew B Y Z, Lai K C, Lee L Y, Gan S, Thangalazhy-Gopakumar S, Rigby S. *Review on graphene and its derivatives: Synthesis methods and potential industrial implementation*. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, 98 163-180, 2018.
56. Rebecca S E, Coleman K S. *Graphene synthesis: relationship to applications*. **Nanoscale**, 5 38-51, 2013.
57. Brodie B. *XIII. On the atomic weight of graphite*. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, 149 249-259, 1859.
58. Staudenmaier L. *Verfahren zur Darstellung der Graphitsäure*. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, 32(2), 1394-1399, 1898.
59. Hummers W S, Offeman R E. *Preparation of Graphitic Oxide*. **Journal of the American Chemical Society**, 80(6), 1339-1339, 1958.
60. Marcano D C, Kosynkin D V, Berlin J M, Sinitskii A, Sun Z, Slesarev A, Alemany L B, Lu W, Tour J M. *Improved Synthesis of Graphene Oxide*. **ACS Nano**, 4(8), 4806-4814, 2010.
61. Dreyer D R, Park S, Bielawski C W, Ruoff R S. *The chemistry of graphene oxide*. **Chemical Society Reviews**, 39(1), 228-240, 2010.
62. Pei S, Cheng H-M. *The reduction of graphene oxide*. **Carbon**, 50(9), 3210-3228, 2012.
63. Agharkar M, Kochrekar S, Hidouri S, Azeez M A. *Trends in green reduction of graphene oxides, issues and challenges: A review*. **Materials Research Bulletin**, 59 323-328, 2014.
64. Gurunathan S, Han J W, Park J H, Eppakayala V, Kim J-H. *Ginkgo biloba: a natural reducing agent for the synthesis of cytocompatible graphene*. **International Journal of Nanomedicine**, 9 363-377, 2014.
65. Campos V. *Preparación y caracterización de grafeno modificado con nanopartículas metálicas y bimetálicas*. **Tesis de Maestría**. Facultad de Ingeniería Mecánica y

- Eléctrica, Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, Nuevo León, México 2013.
66. Huízar A M. *Estudio de las propiedades magnéticas y nanoestructura de nanocompuestos de nanopartículas metálicas y óxido de grafeno reducido térmicamente. Tesis de Doctorado.* Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica, Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, Nuevo León, México 2014.
 67. Zhang X-F, Liu Z-G, Shen W, Gurunathan S. *Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. International Journal of Molecular Sciences*, 17(9), 1534, 2016.
 68. Xiong L, Tong Z-H, Chen J-J, Li L-L, Yu H-Q. *Morphology-dependent antimicrobial activity of Cu/Cu₂O nanoparticles. Ecotoxicology*, 24(10), 2067-2072, 2015.
 69. Singh S, Bahadur D. *Functional Oxide Nanomaterials and Nanocomposites for the Removal of Heavy Metals and Dyes. Nanomaterials and Nanotechnology*, 3(1), 3-20, 2013.
 70. Malwal D, Packirisamy G. *Enhanced photocatalytic activity of hierarchical three dimensional metal oxide@CuO nanostructures towards the degradation of Congo red dye under solar radiations. Catalysis Science & Technology*, 6(12), 4458-4472, 2016.
 71. Negut I, Grumezescu V, Sima L E, Axente E. *Chapter 11 - Recent advances of graphene family nanomaterials for nanomedicine.* En: Fullerenes, Graphenes and Nanotubes. Alexandru Mihai Grumezescu. 413-455. 2018.
 72. Gurunathan S, Han J W, Dayem A A, Eppakayala V, Kim J-H. *Oxidative stress-mediated antibacterial activity of graphene oxide and reduced graphene oxide in Pseudomonas aeruginosa. International Journal of Nanomedicine*, 7 5901-5914, 2012.
 73. Parrales E N L, Zambrano J E C, Vences R Y M, Alcivar J A C. *Infecciones de vías urinarias en pacientes diabéticos de zonas rurales de Jipijapa.* Primera ed. Manta, Manabi, Ecuador. Casa Editora Del Polo. 2018.
 74. García-Rodríguez J A, Picazo J J. *Microbiología Médica 1. Microbiología Médica General.* First ed. España. Harcourt Brace. 1996.
 75. Murray P R, Rosenthal K S, Pfaller M A. *Microbiología Médica.* Octava ed. Barcelona, España. Elsevier. 2017.

76. Maddinedi S B, Mandal B K, Vankayala R, Kalluru P, Pamanji S R. *Bioinspired reduced graphene oxide nanosheets using Terminalia chebula seeds extract*. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 145 117-124, 2015.
77. Chettri P, Vendamani V S, Tripathi A, Pathak A P, Tiwari A. *Self assembly of functionalised graphene nanostructures by one step reduction of graphene oxide using aqueous extract of Artemisia vulgaris*. **Applied Surface Science**, 362 221-229, 2016.
78. Jin X, Li N, Weng X, Li C, Chen Z. *Green reduction of graphene oxide using eucalyptus leaf extract and its application to remove dye*. **Chemosphere**, 208 417-424, 2018.
79. Hou D, Liu Q, Wang X, Quan Y, Qiao Z, Yu L, Ding S. *Facile synthesis of graphene via reduction of graphene oxide by artemisinin in ethanol*. **Journal of Materiomics**, 4(3), 256-265, 2018.
80. De Silva K K H, Huang H H, Joshi R K, Yoshimura M. *Chemical reduction of graphene oxide using green reductants*. **Carbon**, 119 190-199, 2017.
81. Thakur S, Karak N. *Alternative methods and nature-based reagents for the reduction of graphene oxide: A review*. **Carbon**, 94 224-242, 2015.
82. Barua S, Thakur S, Aidew L, Buragohain A K, Chattopadhyay P, Karak N. *One step preparation of a biocompatible, antimicrobial reduced graphene oxide–silver nanohybrid as a topical antimicrobial agent*. **RSC Advances**, 4(19), 9777-9783, 2014.
83. Sedki M, Mohamed M B, Fawzy M, Abdelrehim D A, Abdel-Mottaleb M M S A. *Phytosynthesis of silver–reduced graphene oxide (Ag–RGO) nanocomposite with an enhanced antibacterial effect using Potamogeton pectinatus extract*. **RSC Advances**, 5(22), 17358-17365, 2015.
84. Yang Z, Hao X, Chen S, Ma Z, Wang W, Wang C, Yue L, Sun H, Shao Q, Murugadoss V, Guo Z. *Long-term antibacterial stable reduced graphene oxide nanocomposites loaded with cuprous oxide nanoparticles*. **Journal of Colloid and Interface Science**, 533 13-23, 2019.
85. Navya R M, Murthy M, Shyla S N, Ananda S, Yogesh S, Dinesh R. *Cuprous oxide anchored Reduced Graphene oxide ceramic nanocomposite using Tagetes erecta*

- flower extract and evaluation of its antibacterial activity and cytotoxicity. Ceramics International*, 45(18), 25020-25026, 2019.
86. Sharma K, Maiti K, Kim N H, Hui D, Lee J. *Green synthesis of glucose-reduced graphene oxide supported Ag-Cu₂O nanocomposites for the enhanced visible-light photocatalytic activity. Composites Part B: Engineering*, 138 35-44, 2017.
 87. Guo S, Wang Y, Zhang F, Gao R, Liu M, Dong L, Liu Y, Zhang Y, Chen L. *In situ synthesis of Ag@Cu₂O-rGO architecture for strong light-matter interactions. Nanomaterials*, 8(6), 444, 2018.
 88. Guo Y, Wang H, Ma X, Jin J, Ji W, Wang X, Song W, Zhao B, He C. *Fabrication of Ag-Cu₂O/Reduced Graphene Oxide Nanocomposites as Surface-Enhanced Raman Scattering Substrates for in Situ Monitoring of Peroxidase-Like Catalytic Reaction and Biosensing. ACS Applied Materials & Interfaces*, 9(22), 19074-19081, 2017.
 89. Jankauskaite V, Vitkauskienė A, Lazauskas A, Baltrusaitis J, Prosycevas I, Andrulevičius M. *Bactericidal effect of graphene oxide/Cu/Ag nanoderivatives against Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Staphylococcus aureus and Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. International Journal of Pharmaceutics*, 511(1), 90-97, 2016.
 90. González Güreca M C, Soto Hernández M, Geoffrey K, Martínez Vázquez M. *Actividad antioxidante de flavonoides de tallo de orégano mexicano (Lippia graveolens HBK var. berlandieri Schauer). Revista Fitotecnia Mexicana*, 30(1), 43-49, 2007.
 91. Palomino G L R, García P C M, Gil G J H, Rojano B A, Durango R D L. *Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia). Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 16(3), 388-395, 2009.
 92. Liang N, Kitts D D. *Antioxidant property of coffee components: assessment of methods that define mechanisms of action. Molecules*, 19(11), 19180-19208, 2014.
 93. Peterson G L. *Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. Analytical biochemistry*, 100(2), 201-220, 1979.

94. Ainsworth E A, Gillespie K M. *Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent*. **Nature Protocols**, 2 875, 2007.
95. López-Miranda J L, Vázquez M, Fletes N, Esparza R, Rosas G. *Biosynthesis of silver nanoparticles using a Tamarix gallica leaf extract and their antibacterial activity*. **Materials Letters**, 176 285-289, 2016.
96. Aguilar M S, Rosas G. *A new synthesis of Cu₂O spherical particles for the degradation of methylene blue dye*. **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**, 11 100195, 2019.
97. Cardarelli F. *Materials Handbook. A Concise Desktop Reference*. 2a. ed. Girona, España. 2008.
98. Walton H, Reyes J. *Análisis Químico e instrumental moderno*. Barcelona, España. 1983.
99. Laboratorio de Bioquímica. *Manual de Técnicas del Laboratorio de Bioquímica*. Tecnológico Nacional De México/Instituto Tecnológico De Morelia. Morelia, Michoacán, México 2017.
100. Goodarzi V, Zamani H, Bajuli L, Moradshahi A. *Evaluation of antioxidant potential and reduction capacity of some plant extracts in silver nanoparticles' synthesis*. **Molecular Biology Research Communications**, 3(3), 165, 2014.
101. Devatha C, Thalla A K, Katte S Y. *Green synthesis of iron nanoparticles using different leaf extracts for treatment of domestic waste water*. **Journal of Cleaner Production**, 139 1425-1435, 2016.
102. Saini P, Sharma R, Chadha N. *Determination of defect density, crystallite size and number of graphene layers in graphene analogues using X-ray diffraction and Raman spectroscopy*. **Indian Journal of Pure & Applied Physics (IJPAP)**, 55(9), 625-629, 2017.
103. Ossonon B D, Bélanger D. *Synthesis and characterization of sulfophenyl-functionalized reduced graphene oxide sheets*. **RSC Advances**, 7(44), 27224-27234, 2017.
104. Sigma Aldrich. *Graphene oxide powder, 15-20 sheets, 4-10% edge-oxidized*[en línea]. Disponible

- en:<<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/796034?lang=es®ion=MX>> [Consultado 23 de Enero de 2020].
105. Advanced Chemical Supplier (ACS). *Graphite oxide*[en línea]. Disponible en:<<https://www.acsmaterial.com/graphite-oxide.html>> [Consultado 23 de Enero 2020].
 106. SkySpring Nanomaterials I. *Graphene oxide*[en línea]. Disponible en:<https://www.ssnano.com/inc/sdetail/graphene_oxide_gel_98_2nm_diameter_1_5um_/23370> [Consultado 11 de Febrero 2020].
 107. US Research Nanomaterials I. *Graphene Oxide Water Dispersion*[en línea]. Disponible en:<<https://www.us-nano.com/inc/sdetail/3766>> [Consultado 11 de Febrero 2020].
 108. Ahmed M J, Murtaza G, Mehmood A, Bhatti T M. *Green synthesis of silver nanoparticles using leaves extract of Skimmia laureola: Characterization and antibacterial activity*. **Materials Letters**, 153 10-13, 2015.
 109. Bagherzade G, Tavakoli M M, Namaei M H. *Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of saffron (Crocus sativus L.) wastages and its antibacterial activity against six bacteria*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 7(3), 227-233, 2017.
 110. Villalpando N M A. *Síntesis verde de nanoestructuras de Ag para aplicaciones biológicas*. **Tesis de Maestría**. Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México 2018.
 111. Wang Y, Chen P, Liu M. *Synthesis of hollow silver nanostructures by a simple strategy*. **Nanotechnology**, 19(4), 045607, 2008.
 112. Sastry M, Mayya K, Bandyopadhyay K. *pH Dependent changes in the optical properties of carboxylic acid derivatized silver colloidal particles*. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 127(1-3), 221-228, 1997.
 113. Hornyak G L, Dutta J, Tibbals H F, Rao A. *Introduction to Nanoscience*. 2008.
 114. Xu C, Wang X, Zhu J. *Graphene– metal particle nanocomposites*. **The Journal of Physical Chemistry C**, 112(50), 19841-19845, 2008.
 115. Xu C, Wang X. *Fabrication of flexible metal-nanoparticle films using graphene oxide sheets as substrates*. **Small**, 5(19), 2212-2217, 2009.

116. López-Miranda J, Borjas-García S, Esparza R, Rosas G. *Synthesis and Catalytic Evaluation of Silver Nanoparticles Synthesized with Aloysia triphylla Leaf Extract*. **Journal of Cluster Science**, 27 2016.
117. Gurunathan S, Han J W, Park J H, Kim E, Choi Y-J, Kwon D-N, Kim J-H. *Reduced graphene oxide–silver nanoparticle nanocomposite: a potential anticancer nanotherapy*. **International Journal of Nanomedicine**, 10 6257, 2015.
118. Maryami M, Nasrollahzadeh M, Mehdipour E, Sajadi S M. *Preparation of the Ag/RGO nanocomposite by use of Abutilon hirtum leaf extract: A recoverable catalyst for the reduction of organic dyes in aqueous medium at room temperature*. **International Journal of Hydrogen Energy**, 41(46), 21236-21245, 2016.
119. Geetha Bai R, Muthoosamy K, Shipton F, Pandikumar A, Kumar P, Ming H, Manickam S. *Biogenic Synthesis of Reduced Graphene Oxide-Silver (RGO-Ag) Nanocomposite and its Dual Applications as Antibacterial Agent and Cancer Biomarker Sensor*. **RSC Advances**, 6 2016.
120. Sehrawat A, Sultana S. *Tamarix gallica ameliorates thioacetamide–induced hepatic oxidative stress and hyperproliferative response in Wistar rats*. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, 21(2), 215-223, 2006.
121. Ksouri R, Falleh H, Megdiche W, Trabelsi N, Mhamdi B, Chaieb K, Bakrouf A, Magné C, Abdelly C. *Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte Tamarix gallica L. and related polyphenolic constituents*. **Food and Chemical Toxicology**, 47(8), 2083-2091, 2009.
122. Petrucci R, Harwood W, Herring G, Madura J. *General chemistry: Principles and Modern Application*. 9th ed. Upper Saddle River, New Jersey. Pearson Education. 2007.
123. Zumdahl S, Zumdahl S. *Chemistry*. 7th ed. Boston , New Jersey. Houghton Mifflin Company. 2007.
124. Aguilar M S. *Síntesis verde de nanopartículas de Ag, Au, Cu₂O y preparación convencional de nanoestructuras de Cu, Cu₂O y CuO en diferentes morfologías para la evaluación de sus propiedades catalíticas y ópticas*. **Tesis de Doctorado**. Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. México 2019.

125. Doodoo Arhin D, Leoni M, Scardi P, Garnier E, Mittiga A. *Synthesis, characterisation and stability of Cu₂O nanoparticles produced via reverse micelles microemulsion.* **Materials Chemistry and Physics**, 122 602-608, 2010.
126. Magyari K, Pap Z, Tóth Z R, Kása Z, Licarete E, Vodnar D C, Hernadi K, Baia L. *The impact of copper oxide nanoparticles on the structure and applicability of bioactive glasses.* **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, 91(3), 634-643, 2019.
127. Mohan S, Singh Y, Verma D, Hasan S. *Synthesis of CuO nanoparticles through green route using Citrus limon juice and its application as nanosorbent for Cr(VI) remediation: Process optimization with RSM and ANN-GA based model.* **Process Safety and Environmental Protection**, 96 2015.
128. Landeros J L. *Síntesis verde de nanopartículas TiO₂-Ag mediante extractos de Origanum vulgare y Sedum praealtum.* **Tesis de Maestría.** Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México 2018.
129. Mejía I. *Apuntes de Metalurgia Física.* Instituto De Investigación En Metalurgia Y Materiales, Universidad Michoacana De San Nicolás De Hidalgo. Morelia, Michoacán, México 2016.
130. Thanh N T K, Maclean N, Mahiddine S. *Mechanisms of Nucleation and Growth of Nanoparticles in Solution.* **Chemical Reviews**, 114(15), 7610-7630, 2014.
131. Baker C, Pradhan A, Pakstis L, Pochan D, Shah S. *Synthesis and Antibacterial Properties of Silver Nanoparticles.* **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, 5 244-249, 2005.
132. Kouti M, Matouri L. *Fabrication of nanosized cuprous oxide using fehling's solution.* **Transaction F: Nanotechnology**, 17(1), 73-18, 2010.
133. Schmidt H. *Nanoparticles by chemical synthesis, processing to materials and innovative applications.* **Applied Organometallic Chemistry**, 15(5), 331-343, 2001.
134. Pankey G A, Sabath L D. *Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections.* **Clinical Infectious Diseases**, 38(6), 864-870, 2004.
135. Sánchez-López E, Gomes D, Esteruelas G, Bonilla L, Lopez-Machado A L, Galindo R, Cano A, Espina M, Ettcheto M, Camins A, Silva A M, Durazzo A, Santini A, Garcia

M L, Souto E B. *Metal-Based Nanoparticles as Antimicrobial Agents: An Overview*. **Nanomaterials (Basel, Switzerland)**, 10(2), 292, 2020.