



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE FÍSICA

**“SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE ÓXIDO DE GRAFENO
FUNCIONALIZADO CON NANOPARTÍCULAS DE COBRE Y
PLATA OBTENIDOS MEDIANTE PROCESOS QUÍMICOS Y
BIOLÓGICOS: EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA”.**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Proyecto Integrador

Presentado para optar el grado académico de:

FÍSICO

AUTORES: MARCELO SANTIAGO BARBA NICOLALDE

JOSETH ALEJANDRA PACHACAMA RUIZ

DIRECTOR: Dr. FABIÁN ERNESTO ARIAS ARIAS PhD.

Riobamba- Ecuador

2021

©2021, Marcelo Santiago Barba Nicolalde & Joseth Alejandra Pachacama Ruiz

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos por cualquier medio o procedimiento, incluyendo las citas bibliográficas del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Nosotros, Marcelo Santiago Barba Nicolalde y Joseth Alejandra Pachacama Ruiz declaramos que el presente trabajo de integración curricular es de nuestra autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autores asumimos la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación. El patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 03 de septiembre de 2021



Marcelo Santiago Barba Nicolalde

060461209-3



Joseth Alejandra Pachacama Ruiz

172630530-1

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE FÍSICA

El Tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que: el Trabajo de Integración Curricular: Tipo: Proyecto Integrador, “**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE ÓXIDO DE GRAFENO FUNCIONALIZADO CON NANOPARTÍCULAS DE COBRE Y PLATA OBTENIDOS MEDIANTE PROCESOS QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS: EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**”, realizado por el señor **MARCELO SANTIAGO BARBA NICOLALDE** y la señorita **JOSETH ALEJANDRA PACHACAMA RUIZ**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del trabajo de integración curricular, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

NOMBRE	FIRMA	FECHA
Ing. Gabriela Viviana Tubón Usca PhD. PRESIDENTE DEL TRIBUNAL	-----	03 de septiembre 2021
Dr. Fabián Ernesto Arias Arias PhD. DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR	-----	03 de septiembre 2021
Biof. Vilma Nohemi Yanchapanta Bastidas. MSc MIEMBRO DEL TRIBUNAL	-----	03 de septiembre 2021

DEDICATORIA

A Josefina y Carlos los pilares fundamentales en mi vida, por colmarme cada día de bendiciones e inculcarme los más preciados valores del ser humano. La vida nos llevó por caminos diferentes, pero sé que desde el lugar que se encuentren estarán orgullosos de lo que he conseguido con mis errores y caídas me he levantado gracias a todas las palabras que me han enseñado.

A mi padre Leonardo, a mi madre Mercedes por ser las personas más cariñosas y por todo el apoyo que me han brindado en este camino difícil de mi andar, a mis tíos Marcelo, Rene, Alfredo por no dejar de apoyarme en todos los aspectos de mi vida.

A mis hermanos Pepe, Bryan, Miguel, María que siempre están cuando los necesito y en cualquier circunstancia.

Marcelo

A mis padres Elena Ruiz y José Pachacama por haberme forjado como la persona que soy, muchos de mis logros incluido este se lo debo a ustedes. Me formaron con valores, principios y responsabilidades para cumplir mis objetivos, es un privilegio dedicarles este trabajo y darles las gracias por el apoyo incondicional.

A mis hermanos Rubén y Camila quienes son mis sinceros y eternos amigos que han hecho que mis días sean gratos, que con su cariño, amor y apoyo me han dado la fuerza para continuar en este camino.

A Humberto Cueva y María Casamen por su amor, bondad, generosidad y por apoyarme a seguir adelante.

Joseth

AGRADECIMIENTO

A Dios por las bendiciones que recibimos cada día, que con su bondad y misericordia ha permitido que los objetivos de nuestras vidas se cumplan.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Física y Matemática, por haber permitido formarnos como profesional, y un agradecimiento especial a los Docentes de la Carrera que fueron parte de nuestra formación académica, sin ustedes este sueño no se hubiese cumplido.

A Physic Research Grupo (PRG) y Grupo de Investigación de Materiales Avanzados (GIMA) de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, por el acceso a los equipos, y laboratorios, además a los docentes que intervinieron en este trabajo de titulación.

A Fabián Arias PhD como director de este trabajo de integración curricular, por su apoyo.

A Cristian Vacacela PhD, Talía Tene PhD, Gabriela Tubón PhD, por la colaboración, sugerencias y apoyo para llevar a cabo este proyecto.

A toda mi familia por su cariño incondicional y su apoyo cada día de mi vida.

A Ronny de la Bastida por su paciencia, cariño y apoyo incondicional.

A Vilma Yanchapanta MSc y María José Benítez PhD, por sus consejos y enseñanzas.

A mis amigos quiénes depositaron confianza en mí y me incentivaron a seguir adelante, en especial a Nadiesda Arias, Liliana Shilquigua, Viviana Lara, Wilfredo Salas, Cristhian Torres y Alex Chimborazo.

Marcelo & Joseth

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ECUACIONES	xv
RESUMEN	xvii
ABSTRACT	xviii
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL	4
1.1. Antecedentes.....	4
1.2. Marco Conceptual.....	5
1.2.1. Nanotecnología.....	5
1.2.2. Síntesis de Nanopartículas	6
1.2.3. Nanopartículas Metálicas.....	7
1.2.4. Nanopartículas de Plata	7
1.2.5. Nanopartículas de Cobre	7
1.2.6. Óxido de Grafeno (GO)	8
1.2.7. Agentes antimicrobianos	8
1.2.8. Plata y cobre como agentes antimicrobianos	9
1.2.9. Nanopartículas de plata y cobre como agentes antimicrobianos	10

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO	12
2.1. Planteamiento de la Hipótesis.....	12
2.1.1. Hipótesis General	12
2.2. Diseño de la Investigación.....	12
2.2.1. Tipo de Investigación.....	12
2.2.2. Detalle Experimental.....	13
2.2.3. Operacionalización de las variables	18
2.2.5. Localización del estudio	19
2.2.6. Población de estudio	19
2.2.7. Tamaño de la muestra	19

2.2.8. <i>Método de muestreo</i>	20
2.2.9. <i>Técnicas de recolección de datos</i>	20
2.2.10. <i>Instrumentación</i>	20
2.2.11. <i>Análisis estadístico</i>	23

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
3.1. Síntesis de nanomateriales y nanopartículas	24
3.1.1. <i>Síntesis del Óxido de Grafeno</i>	24
3.1.2. <i>Síntesis de nanopartículas de plata por el método químico</i>	25
3.1.3. <i>Síntesis de nanopartículas de plata por el método biológico</i>	26
3.1.4. <i>Síntesis de nanopartículas de cobre método químico</i>	27
3.1.5. <i>Síntesis de nanopartículas de cobre método biológico</i>	28
3.1.6. <i>Funcionalización de las nanopartículas metálicas con el óxido de grafeno</i>	29
3.2. Caracterización de las Nanopartículas y Nanomateriales	30
3.2.1. <i>Espectroscopía Ultravioleta Visible (UV-Vis)</i>	30
3.2.2. <i>Espectroscopía Transformada de Fourier (FTIR)</i>	34
3.2.3. <i>Espectroscopía de Rayos X por Dispersión de Energía (EDS)</i>	39
3.2.4. <i>Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)</i>	44
3.2.5. <i>Espectroscopía Raman</i>	48
3.2.6. <i>Microscopía de Barrido Electrónico (SEM)</i>	50
3.3. Análisis antibacteriano	53
3.3.1. <i>Concentración inhibitoria mínima</i>	53
3.2.3. <i>Concentración mínima bactericida</i>	66
3.4. Unidades formadoras de colonias	71
3.4.1. <i>Conteo de UFC en bacterias Gram Positivo</i>	71
3.4.2. <i>Conteo UFC en bacterias Gram Negativo</i>	73
3.5. Test de ANOVA	74
3.5.1. <i>Test de ANOVA para la bacteria Gram positiva</i>	75
3.5.2. <i>Test de ANOVA para la bacteria Gram negativa</i>	80
CONCLUSIONES	87
RECOMENDACIONES	89
BIBLIOGRAFÍA	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-2: Obtención de Nanopartículas Metálicas de Plata y Cobre.....	18
Tabla 2-2: Evaluación Antimicrobiana en Gram Positivo	18
Tabla 3-2: Evaluación Antimicrobiana en Gram Negativo.....	19
Tabla 4-2: Espectrofotómetro.....	20
Tabla 5-2: Espectrómetro de infrarrojo	21
Tabla 6-2: Microscopio de fuerza atómica	21
Tabla 7-2: Microscopio electrónico de barrido.....	22
Tabla 8-2: Materiales	22
Tabla 9-2: Reactivos	23
Tabla 10-3: Composición Química de AgNP's	40
Tabla 11-3: Composición Química de CuNP's	41
Tabla 12-3: Composición Química de GO + AgNP's.....	42
Tabla 13-3: Composición Química de GO + CuNP's	43
Tabla 14-3: Concentración y tipo de nanohíbrido	54
Tabla 15-3: Presencia de inhibición y resistencia de los discos S.aureus	55
Tabla 16-3: CMI Cuantitativo Gram Positivo S. aureus a las 24 horas.	56
Tabla 17-3: CMI Cuantitativo Gram Positivo S. aureus a las 48 horas.	57
Tabla 18-3: Presencia de inhibición y resistencia de los discos E.coli	61
Tabla 19-3: CMI Cuantitativo Gram Negativo E. coli a las 24 horas.	63
Tabla 20-3: CMI Cuantitativo Gram Negativo E. coli a las 48 horas.	64
Tabla 21-3: CMB Cualitativo Escala Bimodal Gram Negativo (<i>E. coli</i>).....	68
Tabla 22-3: CMB Cualitativo Escala Bimodal Gram Negativo (<i>S. aureus</i>).....	70
Tabla 23-3: Registro de conteo de colonias bacteria Gram Positivo.	72
Tabla 24-3: Registro de conteo de colonias bacteria Gram negativo.....	74
Tabla 25-3: Test de ANOVA para la bacteria Gram Positiva con AgNP's a las 24 horas	75
Tabla 26-3: Test de ANOVA para la bacteria Gram positiva con AgNP's a las 48 horas	75
Tabla 27-33: Test de ANOVA para la bacteria Gram Positiva con AgNP's, conteo de UFC....	76
Tabla 28-3: Test de ANOVA para la bacteria Gram Positiva con CuNP's a las 24 horas	77
Tabla 29-3: Test de ANOVA para la bacteria Gram Positiva con CuNP's a las 48 horas	78
Tabla 30-3: Test de ANOVA para la bacteria Gram Positiva con CuNP's, conteo de UFC.	79
Tabla 31-3: Test de ANOVA para la bacteria Gram Negativa con AgNP's a las 24 horas	80
Tabla 32-3: Test de ANOVA para la bacteria Gram Negativa con AgNP's a las 48 horas	81
Tabla 33-3: Test de ANOVA para la bacteria Gram Negativa con AgNP's, conteo de UFC. ...	82
Tabla 34-3: Test de ANOVA para la bacteria Gram Negativa con CuNP's a las 24 horas.....	83
Tabla 35-3: Test de ANOVA para la bacteria Gram Negativa con CuNP's a las 48 horas.....	84

Tabla 36-3: Test de ANOVA para la bacteria Gram Negativa con CuNP's, conteo de UFC. ...85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: Esquema de mecanismos de top-down y bottom-up.....	5
Figura 2-1: Estructura Esquemática de óxido de grafeno	8
Figura 3-2: Experimento 1: Síntesis del GO.	14
Figura 4-2: Diseño Experimental del Antibiograma.	16
Figura 5-2: Diluciones de Bacteria.....	17
Figura 6-2: Esquema experimental.....	17
Figura 7-3: Síntesis Óxido de Grafeno.....	24
Figura 8-3: Óxido de Grafeno seco	25
Figura 9-3: Síntesis química de nanopartículas de plata.....	25
Figura 10-3: Nanopartículas de Plata síntesis química.	26
Figura 11-3: Síntesis biológica de nanopartículas de plata.....	26
Figura 12-3: Nanopartículas de plata síntesis verde.	27
Figura 13-3: Síntesis química de nanopartículas de cobre.....	27
Figura 14-3: Nanopartículas de cobre método químico.....	28
Figura 15-3: Síntesis biológica de nanopartículas de cobre.....	28
Figura 16-3: Nanopartículas de cobre método biológico.....	29
Figura 17-3: Funcionalización de las nanopartículas metálicas.....	30
Figura 18-3: Espectro UV-Vis del Óxido de Grafeno	31
Figura 19-3: Espectroscopía visible AgNP's. a síntesis química. b síntesis biológica.	32
Figura 20-3: Espectro UV-Vis CuNP's. a síntesis química. b síntesis biológica.	32
Figura 21-3: UV-Vis del GO funcionalizado AgNP's. a síntesis química. b síntesis biológica. ...	33
Figura 22-3: Espectro UV-Vis GO + CuNP's. a síntesis química. b síntesis biológica.	34
Figura 23-3: Espectroscopia infrarroja del GO.	35
Figura 24-3: agentes reductores AgNP's. a síntesis biológica. b síntesis química.	36
Figura 25-3: Agentes reductores CuNP's. a síntesis química. b síntesis biológica.	37
Figura 26-3: FTIR GO + AgNP's. a síntesis biológica. b síntesis química c) GO	38
Figura 27-3: FTIR GO + CuNP's. a síntesis química. b síntesis biológica c) GO	39
Figura 28-3: Espectro EDS de las nanopartículas de plata. a ruta química. b ruta biológica. ...	40
Figura 29-3: Espectro EDS de nanopartículas de cobre. a ruta química. b ruta biológica.....	41
Figura 30-3: Espectro EDS de GO + AgNP's. a síntesis biológica. b síntesis química.....	42
Figura 31-3: Espectro EDS de GO + CuNP's. a síntesis química. b síntesis biológica.....	43
Figura 32-3: Imágenes AFM del GO a 2.0 μ m.....	45
Figura 33-3: Dispersión de Tamaño GO.	44
Figura 34-3: Imágenes AFM de AgNP's síntesis química a escala 1000[nm].....	45
Figura 35-3: Imágenes AFM de AgNP's síntesis biológica a escala 2.0[μ m].	45

Figura 36-3: Histograma del tamaño de las nanopartículas de plata por ruta química.....	45
Figura 37-3: Histograma del tamaño de las nanopartículas de plata por ruta biológica.....	45
Figura 38-3: Microscopía AFM a 2.0[μm] e Histograma de CuNP's por ruta química.....	46
Figura 39-3: Microscopía AFM a 599[nm] e Histograma de CuNP's por ruta biológica.....	46
Figura 40-3: Microscopía AFM a 390[nm] con incremento a 180[nm] de GO + AgNP's	47
Figura 41-3: Microscopía AFM a 1.7[μm] y aumento a 300[nm]de GO + CuNP's.....	47
Figura 42-3: Espectroscopía Raman del GO.	48
Figura 43-3: Espectroscopia Raman de GO+AgNP's.	49
Figura 44-3: Espectroscopia Raman de GO+CuNP's.	50
Figura 45-3: SEM del Óxido de Grafeno. a escala 50[μm]. b escala 1.0[μm]	51
Figura 46-3: SEM de GO + AgNP's ruta química a 10[μm]......	51
Figura 47-3: SEM de GO +AgNP's ruta biológica a 200[μm].	52
Figura 48-3: SEM de GO +CuNP's ruta química a 10[μm].....	52
Figura 49-3: SEM de GO + Cu NP's ruta biológica a10[μm].....	53
Figura 50-3: Variación de Halo a) 32, b) 62.5, c) 125 y d) 250 [ug/mL].....	58
Figura 51-3: Variación del Halo a) 32, b) 62.5, c) 125 y d) 250 [ug/mL].....	65
Figura 52-3: Medición del pH del caldo LB.	67
Figura 53-3: Turbidez <i>E coli</i> . a presencia de bacteria. b ausencia de bacteria.	68
Figura 54-3: Turbidez <i>S. aureus</i> . a crecimiento bacteriano b ausencia de bacteria.	70
Figura 55-3: Reporte de colonias en la bacteria Gram Positivo.	72
Figura 56-3: Conteo por cuadrante de colonias en la bacteria Gram negativo	73
Figura 57-3: Influencia de la concentración en la actividad inhibitoria en (Gram+) a 24hrs....	75
Figura 58-3: Influencia de la concentración en la actividad inhibitoria en (Gram+) a 48 hrs....	76
Figura 59-3: Influencia de la concentración de AgNP's en el conteo de colonias	77
Figura 60-3: Influencia de la concentración en la actividad inhibitoria en (Gram +) a 24 hrs...78	78
Figura 61-3: Influencia de la concentración en la actividad inhibitoria en (Gram+) a 48 hrs....79	79
Figura 62-3: Influencia de la concentración de CuNP's en el conteo de colonias.	80
Figura 63-3: Influencia de la concentración en la actividad inhibitoria en (Gram-) a 24 hrs....81	81
Figura 64-3: Influencia de la concentración en la actividad inhibitoria en (Gram-) a 48 hrs....82	82
Figura 65-3: Influencia de la concentración de AgNP's en el conteo de colonias.	83
Figura 66-3: Influencia de la concentración en la actividad inhibitoria en (Gram-) a 24 hrs....84	84
Figura 67-3: Influencia de la concentración en la actividad inhibitoria en (Gram-) a 48 hrs....85	85
Figura 68-3: Influencia de la concentración de CuNP's en el conteo de colonias.	86

INDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1-3: Ecuación Unidades Formadoras de Colonias	71
---	----

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

NP's	Nanopartículas
GO	Óxido de Grafeno
Cu	Cobre
Ag	Plata
AgNP's	Nanopartículas de plata
CuNP's	Nanopartículas de cobre
GO+AgNP's	Óxido de Grafeno funcionalizado con nanopartícula de plata
GO+CuNP's	Óxido de Grafeno funcionalizado con nanopartículas de cobre
GO+ CuNP's-B	Nanohíbrido de GO con Cu por ruta biológica
GO+ CuNP's-Q	Nanohíbrido de GO con Cu por ruta química
GO+ AgNP's-B	Nanohíbrido de GO con Ag por ruta biológica
GO+ AgNP's-Q	Nanohíbrido de GO con Cu por ruta química
UV-Vis	Espectroscopía Ultravioleta Visible
AFM	Microscopía de Fuerza Atómica
FTIR	Espectroscopía Infrarroja Transformada de Fourier
SEM	Microscopía de Barrido Electrónico
EDS	Espectroscopía de Rayos X por Dispersión en Energía
E. Coli	Escherichia Coli
S. Aureus	Staphylococcus Aureus
Gram +	Bacteria Gram Positivo
Gram -	Bacteria Gram Negativo
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
CIM	Concentración Inhibitoria Mínima
CBM	Concentración Bactericida Mínima

RESUMEN

El objetivo de este trabajo de integración curricular fue sintetizar y caracterizar óxido de grafeno funcionalizado con nanopartículas de cobre y plata obtenidos mediante procesos químicos y biológicos; además evaluar su actividad antimicrobiana en cepas bacterianas, *Staphylococcus aureus*, y en *Escherichia coli*. Para lo cual el óxido de grafeno fue sintetizado por el método de Hummers modificado, la obtención de las nanopartículas fue por métodos top-down, en la síntesis de nanopartículas de plata por ruta química se utilizó citrato de sodio, y por ruta biológica se empleó caléndula (*Calendula Officinalis*). Para la producción de las nanopartículas de cobre por ruta química se empleó ácido ascórbico, mientras que para la síntesis biológica se utilizó limón persa (*Citrus limon*). La funcionalización del óxido de grafeno con las nanopartículas metálicas permitió que se inserten grupos funcionales con el fin de mejorar las propiedades antimicrobianas, la funcionalización se llevó a cabo por agitación magnética y sonicación. Los nanomateriales fueron caracterizados mediante Espectroscopía Ultravioleta Visible (UV-Vis), Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR), Espectroscopía de Rayos X por Dispersión de Energía (EDS), Espectroscopía Raman, técnicas de Microscopía de Barrido Electrónico (SEM) y Microscopía de Fuerza Atómica (AFM). Para el análisis estadístico se utilizó test de Anova entre las concentraciones de las nanopartículas y el método de obtención, los resultados fueron significativamente diferentes, es decir, estos factores influyen directamente al crecimiento e inhibición de las bacterias. Tras la experimentación se logró identificar que el óxido de grafeno funcionalizado con nanopartículas de plata presenta mayor inhibición en la cepa (*Staphylococcus aureus*), induciendo el 99.9% de muerte bacteriana in vitro. Se recomienda continuar con el estudio de actividad antimicrobiana en diferentes cepas Gram Positivo y Gram Negativo con el fin de observar la influencia de los nanomateriales y encontrar una alternativa ante la resistencia bacteriana.

Palabras clave: <ÓXIDO DE GRAFENO>, <NANOPARTÍCULAS DE PLATA>, <NANOPARTÍCULAS DE COBRE>, <CALÉNDULA (*Calendula officinalis*)>, <LIMÓN (*Citrus limon*)>, <*Escherichia coli*>, <*Staphylococcus aureus*>, <ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA>.



1837-DBRA-UTP-2021

SUMMARY

The aim of this curricular integration work was to synthesise and characterise graphene oxide functionalised with copper and silver nanoparticles obtained by chemical and biological processes; also, to evaluate its antimicrobial activity in bacterial strains, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*. For which the graphene oxide was synthesised by the modified Hummers method, the nanoparticles were obtained by top-down methods, in the synthesis of silver nanoparticles by chemical route sodium citrate was used, and by biological route calendula (*Calendula Officinalis*) was used. Ascorbic acid was used to produce copper nanoparticles by chemical route, while Persian lemon (*Citrus limon*) was used for the biological synthesis. Functionalisation of the graphene oxide with the metal nanoparticles allowed functional groups to be inserted to improve the antimicrobial properties, the functionalisation was carried out by magnetic stirring and sonication. The nanomaterials were characterised by Ultraviolet Visible Spectroscopy (UV-Vis), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS), Raman Spectroscopy, Scanning Electron Microscopy (SEM) and Atomic Force Microscopy (AFM) techniques. For the statistical analysis, the Anova test was used between the concentrations of the nanoparticles and the method of obtaining them, the results were significantly different, i.e. these factors directly influence the growth and inhibition of the bacteria. After the experimentation, it was possible to identify that the graphene oxide functionalised with silver nanoparticles presents greater inhibition in the strain (*Staphylococcus aureus*), inducing 99.9% of bacterial death in vitro. It is recommended to continue with the study of antimicrobial activity in different Gram-positive and Gram-negative strains to observe the influence of nanomaterials and find an alternative to bacterial resistance.

Keywords: <GRAPHENE OXIDE>, <SILVER NANOPARTICLES>, <COPPER NANOPARTICLES>, <CALENDULA (*Calendula officinalis*)>, <LEMÓN (*Citrus limon*)>, <*Escherichia coli*>, <*Staphylococcus aureus*>, <ANTIMICROBIAL ANTIMICROBIAL>

INTRODUCCIÓN

La nanotecnología es la ciencia que se encarga del estudio de los objetos a nanoescala, en dicha escala las propiedades físicas y químicas del material difieren significativamente a nivel macroscópico como microscópico. (Sengupta et al. 2015: p. 2). Los avances en la nanotecnología y la nanociencia han permitido el desarrollo, creación y manipulación de nuevos materiales con propiedades estructurales únicas, permitiendo así aplicaciones relacionadas en áreas como en la robótica, medicina, electrónica, química, física, biofísica, entre otras.

Los nanomateriales son aquellos que miden entre 1 y 100 nanómetros (nm) y nanopartículas (NP's) son estructuras cuyo tamaño es inferior a 100 nanómetros (nm), las cuales pueden ser sintetizadas por diferentes materiales incluido los metales, además, dentro de la ciencia ha llamado la atención debido a sus características extraordinarias como su alta cantidad de átomos superficiales y la relación área/ volumen, si el área superficial aumenta, el diámetro de la partícula disminuye y como consecuencia presenta un incremento en las propiedades originales del material en bruto (Galdiero et al., 2011: pp.12).

El término nanomaterial es el resultado nanotecnológico que emplea una variedad de materiales con composición y propiedades distintas, pero con la característica común de que al menos una dimensión externa o parte de la partícula pueda ser constituida a escala nanométrica. Algunos nanomateriales como nano óxidos de diferentes metales se fabrican por reducción de tamaño de partículas existentes en la naturaleza, otros como los nanomateriales de carbono se obtienen mediante procesos de síntesis, con el fin de incorporar nuevos productos con aplicaciones en la industria, energía, construcción, medicina, la ingeniería de materiales y aeroespacial (INSHT, 2015: pp.10). Las nanopartículas compuestas por materiales metálicos han despertado un gran interés científico por las interesantes propiedades biológicas, ópticas, electrónicas, catalíticas, además, han contribuido a una variedad de aplicaciones dentro de la Química, Biología, Medicina, y Física.

En el presente trabajo se pretende evaluar la actividad antimicrobiana en bacterias Gram Positivo y Gram Negativo utilizando como nanomaterial al óxido de grafeno funcionalizado tanto con nanopartículas de plata y de cobre obtenidas por métodos biológicos y químicos, a diario las bacterias presentan problemas para el ser humano y para la medicina, pese a que los antibióticos son una solución a este problema pueden causar resistencia bacteriana, es por eso, que en esta investigación se proporcionará una alternativa para la actividad antimicrobiana en cepas bacterianas.

El Capítulo 1 aborda el estado del arte que precede a nuestra investigación sin dejar de prestar atención a todo lo que compete el desarrollo científico y práctico.

En el Capítulo 2 se toma en cuenta paso a paso y de una forma detallada el desarrollo científico-práctico llevado a cabo en la presente investigación juntamente con los reactivos y materiales usados en el laboratorio para obtener los nanomateriales y las nanopartículas.

El Capítulo 3 describe los resultados obtenidos de la funcionalización de nuestro nanomaterial como es el nano híbrido de óxido de grafeno con nanopartículas de plata y nano híbrido de óxido de grafeno con nanopartículas de cobre, así como de la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración mínima bactericida (CMB) en *Escherichia coli* bacteria Gram Negativo y *Staphylococcus aureus* Gram Positivo.

OBJETIVOS

General

- Sintetizar y caracterizar el óxido de grafeno funcionalizado con nanopartículas de cobre y plata obtenidos mediante procesos químicos y biológicos y evaluar su actividad antimicrobiana.

Específicos

- Obtener óxido de grafeno a partir de grafito natural.
- Sintetizar nanopartículas de cobre y plata por el método químico top-down.
- Obtener nanopartículas de cobre y plata por métodos biológicos.
- Realizar la caracterización espectroscópica del óxido de grafeno funcionalizado con partículas de cobre usando técnicas UV-Visible, Espectroscopía FTIR, Espectroscopía Raman, Espectroscopía de rayos X por dispersión en energía (EDS).
- Realizar la caracterización espectroscópica del óxido de grafeno funcionalizado con nanopartículas de plata usando técnicas UV-Visible, Espectroscopía FTIR, Espectroscopía Raman, Espectroscopía de rayos X por dispersión en energía (EDS).
- Efectuar la caracterización morfológica del óxido de grafeno funcionalizado con nanopartículas de plata utilizando las técnicas de Microscopía de fuerza atómica (AFM) y Microscopía de Barrido Electrónico (SEM).
- Efectuar la caracterización morfológica del óxido de grafeno funcionalizado con nanopartículas de cobre utilizando las técnicas de Microscopía de fuerza atómica (AFM) y Microscopía de Barrido Electrónico (SEM).
- Evaluar la actividad antimicrobiana del óxido de grafeno funcionalizado con nanopartículas de cobre usando Concentración Inhibitoria Mínima (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB).
- Evaluar la actividad antimicrobiana del óxido de grafeno funcionalizado con nanopartículas de plata usando Concentración Inhibitoria Mínima (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB).

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1. Antecedentes

Los progresos científicos en nanociencia y en nanotecnología se ha incrementado exponencialmente en las últimas décadas, cada vez son más las indagaciones acerca de nanomateriales que proporcionan versatilidad con una mejoría en sus propiedades, las cuales permiten desarrollar aplicaciones en diversos ámbitos.

Para desarrollar la presente investigación se adquirió como base, estudios que se detallan a continuación:

Mokkapati VRSS y sus colaboradores destacan la importancia de comprender la interacción del óxido de grafeno (GO) y sus derivados con las bacterias, que pueden ser netamente mecánicas como metabólicas, en su estudio se evalúa la actividad antimicrobiana de GO (óxido de grafeno) y rGO (óxido de grafeno reducido) contra bacterias Gram Positivo (*B. subtilis* y *P. auruginosa*), demostraron que GO inhibe el crecimiento de *P.auruginosa* y que el rGO es tóxico para ambas bacterias (Mokkapati et al., 2018: p.3).

Según el estudio de Liu, S. y sus colaboradores, la actividad antimicrobiana en dispersiones acuosas sobre *Escherichia coli* mostraron en el conteo de colonias que el óxido de grafeno tiene una mayor actividad antimicrobiana, y que la citotoxicidad puede contribuirse al estrés oxidativo que se presenta en la membrana de bacterias provocando una muerte celular.(Liu et al., 2011: pp.6971-6980).

Bouchareb, S. junto con sus colaboradores exponen que el nanohíbrido de óxido de grafeno y nanopartículas de plata aseguran un contacto activo entre las células bacterianas, lo que provoca una perforación mecánica en la pared celular por los bordes agudos del GO, especialmente para especies Gram negativo cuya pared celular está constituida por peptidoglicano. Además, el nanohíbrido GO-Ag exhiben cierta sensibilidad en Gram negativo; los resultados muestran que el aumento del tiempo de contacto y la concentración son proporcionales al efecto antimicrobiano (Bouchareb et al., 2020: pp.2-6).

En el 2014 se realiza una investigación con una película de grafeno manipulada por transferencia de carga con cobre; con bacterias de tipo Gram negativo y Gram positivo como las *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* respectivamente, para comprobar su respuesta antimicrobiana y la constante transferencia de electrones que resulta una incapacidad de respiración celular provoca su posterior muerte (Li et al., 2014: pp 228-240).

1.2. Marco Conceptual

1.2.1. Nanotecnología

La nanotecnología proviene del griego vávoc que significa enano, se presenta como un área nueva de exploración en el estudio de los materiales, donde se reúnen diversas ramas del conocimiento como la física, química, biología, medicina, entre otras, cuyo fin es estudiar fenómenos que ocurren a nivel atómico y molecular. Además, es el desarrollo de sistemas en escala manométrica que corresponde a un factor 10^{-9} m, que, corresponde a una mil millonésima parte de un metro es decir el nanómetro, la nanotecnología estudia la materia desde un nivel de resolución manométrico, entre 1 y 100 nanómetros (Santana Cabello y Gañán Rojo, 2019: pp. 508-516).

La nanotecnología ha experimentado un desarrollo rápido en la última década debido a los avances en las técnicas de nanosíntesis y nanofabricación empleada para sintetizar material a nanoescala y fabricar nanodispositivos. Los diferentes enfoques utilizados en la síntesis de nanomateriales y nanodispositivos pueden adaptar materiales precursores sólidos, líquidos y/o gaseosos. En general, la mayoría de estas técnicas puede clasificarse como bottom-up y top-down (Pérez et al., 2017: pp.1-4).

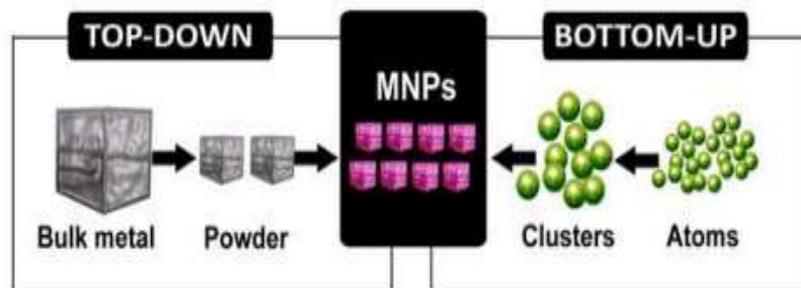


Figura 1-1: Esquema de mecanismos de top-down y bottom-up.
Realizado por: (Hegazy y Borham, 2018).

El enfoque Top-down empieza con un material a granel y consiste en disminuir el tamaño de agregación utilizando energía hasta alcanzar una nanoestructura. Con este método es posible obtener dispositivos muy complejos como microprocesadores o microchips, sin embargo, el método presenta limitaciones como la generación abundante de desperdicios y necesidad de energía.

El enfoque Botton-up, por otro lado, es sintetizar las nanoestructuras mediante reacciones químicas o por autoensamblaje partiendo de componentes atómicos y moleculares hasta llegar a la estructura deseada. Este método produce pocos desperdicios, emplea poca energía y además se puede controlar la forma y tamaño de las nanopartículas.

Pese a que la nanotecnología es una ciencia muy reciente su aplicación y estudio al pasar de los años ha demostrado que es muy útil ya que tiene gran repercusión en la sociedad como la tecnología, farmacia, medicina, biotecnología, etc.

1.2.2. Síntesis de Nanopartículas

Los métodos de síntesis de nanopartículas suelen agruparse en dos aproximaciones "top down" y las "bottom up". La primera se fundamenta en la reducción de sólidos másicos en proporciones pequeñas. En este enfoque se involucra la molienda denominada como el desgaste, numerosos métodos físicos, y la volatilización de un sólido acompañado por la condensación de los componentes volatilizados. El segundo método, bottom up, consiste en la fabricación del material desde "abajo", a partir de átomos o moléculas, para la generación de compuestos más grandes. Ambos enfoques tienen roles importantes en la industria moderna y en la nanotecnología.

Las nanopartículas se preparan por varios métodos físicos, químicos, y biológicos (Iravani, 2011: p.2640). Los métodos físicos más importantes son de arco de descarga, la condensación física en fase vapor, y la ablación con láser. Los métodos químicos frecuentemente utilizados para la síntesis de nanopartículas metálicas incluyen la reducción química en fase homogénea, reducción en microemulsiones, reducción foto-inducida, reducción electroquímica y síntesis asistida por microondas. Los métodos de base biológica consisten en métodos de síntesis verde, donde se utilizan extractos de diferentes plantas, células bacterianas u hongos como agentes reductores (Mohanpuria, Rana y Yadav, 2008: p.372).

El tamaño pequeño no es el único requerimiento en la síntesis de nanomateriales. Para cualquier aplicación práctica se necesita tener un control del proceso de forma tal que las nanopartículas tengan las siguientes propiedades: tamaño idéntico de todas las partículas, igual morfología, la misma composición química, y ausencia de aglomeración.

Las nanopartículas de Ag y Cu en bajas concentraciones son seguras y no tóxicas para las células humanas y animales, por lo tanto, el grado de toxicidad de nanopartículas metálicas para el medio ambiente se considera extremadamente bajo en comparación con otros materiales (Durán et al., 2007: pp. 203-204). Por otro lado, las nanopartículas de cobre resultan de elevado interés ya que presentarían propiedades antibacterianas, actividad catalítica, propiedades ópticas y magnéticas, a un coste mucho menor que las nanopartículas de plata. Además, cuentan también con una elevada relación volumen: superficie, lo que les confiere una aplicación potencial en sistemas para liberación controlada de drogas en terapias contra el cáncer, modulación del comportamiento celular, inmunosensores, detección de glucosa y ADN, entre otras aplicaciones terapia y diagnóstico médico (Goel et al., 2018: pp2-9).

1.2.3. Nanopartículas Metálicas

Las nanopartículas metálicas se acercan al intervalo de 1 a 10 nm, los efectos de tamaño y área se hacen más características. Esto tiene repercusiones que pueden afectar sus propiedades magnéticas, la conducción electrónica, en la temperatura de fusión o en la reactividad química, además de otras más. Es posible controlar dichas propiedades selectivamente por la modificación de su tamaño, su morfología y su composición (López Téllez et al., 2013: p.4).

1.2.4. Nanopartículas de Plata

1.2.4.1. Propiedades de las Nanopartículas de Plata

Las nanopartículas metálicas de plata AgNP's muestran fascinantes propiedades biológicas, ópticas, magnéticas, electrónicas que se relacionan con su tamaño, forma, composición y estructura de la partícula (Máster, 2017: pp 30-37).

1.2.4.2. Aplicaciones Biomédicas

La plata ha sido empleada durante miles de años como metal precioso por el ser humano en aplicaciones como joyería, utensilios, moneda, fotografía o explosivos. De todos estos usos, uno de los más importantes es como agente desinfectante con fines higiénicos y médicos (Monge, 2009: pp.1576-1580).

1.2.5. Nanopartículas de Cobre

1.2.5.1. Propiedades de las Nanopartículas de Cobre

Poseen una alta conductividad eléctrica y térmica y estas las hacen ser usadas ampliamente en campos como la microelectrónica, además, presentan una gran área superficial con respecto a su volumen lo que hace resaltar las propiedades del cobre y favorece la liberación de iones cobre y siendo clave en el área de catálisis siendo aún más nocivo para microorganismos patógenos.

1.2.5.2 Aplicaciones Biomédicas

Las nanopartículas de cobre tienen propiedades antimicrobianas, por lo que se puede utilizar como fungicida y antisépticos (Guajardo, 2013: p.136).

1.2.6. Óxido de Grafeno (GO)

Es una capa de grafeno unida por enlaces sp^3 a grupos funcionales oxigenados como carbonilos, carboxilos e hidroxilos, etc. Generalmente uno de los principales procesos para la obtención es por exfoliación química usando agentes de oxidación fuertes (Yelil Arasi et al., 2009: pp. 1229-1234). Además, el óxido de grafeno tiene propio interés científico y tecnológico, como una forma básica de carbono y de suma importancia tecnológica, ya sea como plataforma para la creación de nuevos materiales tanto como materiales compuestos basados principalmente en GO, y demostrado en varias aplicaciones tanto médicas, tecnológicas, farmacéuticas, etc. (Martínez Orozco, 2015: p.80).

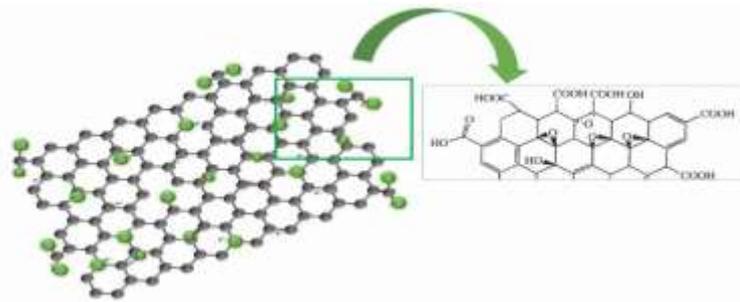


Figura 2-1: Estructura Esquemática de óxido de grafeno
Realizado por: (Jahan, Liu y Loh, 2013).

Los grupos funcionales polares que están compuestos por el oxígeno le aportan una importante polaridad por lo que es considerado como un material hidrofílico, además esto permite que pueda reaccionar con muchos otros agentes químicos ya sea orgánicos e inorgánicos permitiendo la fácil creación de nuevas funcionalidades (Yelil Arasi et al., 2009: pp. 1229-1234).

1.2.7. Agentes antimicrobianos

Los agentes antimicrobianos son sustancias obtenidas por síntesis o naturalmente, que mediante algún mecanismo de acción tienen la capacidad de matar o inhibir el crecimiento de microorganismos. Es posible la producción de agentes sintéticos o semisintéticos mediante la modificación de la estructura química de un algún agente antimicrobiano cuya generación fue natural. Los primeros agentes sintéticos usados fueron los del grupo de los colorantes (MI, Errecalde y Mestorino, 2011: pp.1-14).

El primer agente antimicrobiano fue el Salvarsán, en 1910. En 1935 se comenzaron a desarrollar las sulfonamidas, compuestos sintéticos, que presentaban limitaciones en términos de eficacia y seguridad (Saga y Yamaguchi, 2009: pp 1-6).

El primer antibiótico natural fue la penicilina, producida por el hongo *Penicillium notatum*, y descubierta en 1928 por Alexander Fleming. A partir de allí comenzó la era de los antibióticos, con su introducción como agentes terapéuticos contra infecciones microbianas. Desde ese momento, los antibióticos han sido los antimicrobianos más efectivos en quimioterapia y una gran variedad de antibióticos fueron descubiertos e introducidos en aplicaciones clínicas (Davies y Davies, 2010: pp 1-17).

No obstante, en los últimos años, la producción de nuevos antibióticos ha disminuido de forma considerable y eso ha sido un problema médico grave en todo el mundo la resistencia a los mismos por parte de los distintos microorganismos (Cor et al., 2003: pp.1-5). Los microorganismos adquieren resistencia a estos por diferentes mecanismos como por ejemplo mutaciones cromosómicas o intercambio genético mediado por plásmidos y transposones. Por el proceso natural de selección, ante la presencia de antibióticos en el medio ambiente, sólo se multiplicarán los microorganismos que los resistan y, por consiguiente, se transmitirá esa característica a la población microbiana que se origine a partir de los mismos (Okonko et al., 2009: pp.105-109). Esto ha originado que, ante el uso extensivo de antibióticos en la comunidad y en los hospitales, se incremente cada más la aparición de microorganismos resistentes. Es por esto, que existe actualmente una amplia demanda en mejorar y generar nuevos materiales o moléculas que actúen como antimicrobianos.

1.2.8. Plata y cobre como agentes antimicrobianos

Tanto el cobre como la plata han sido ampliamente utilizados, durante siglos, como agentes antimicrobianos en una gran cantidad de aplicaciones. Los iones Ag^+ y Cu^{2+} resultan ser extremadamente tóxicos para las bacterias incluso en concentraciones excepcionalmente bajas. Aunque el comportamiento antibacteriano de estos elementos no se comprende completamente, se han propuesto dos potenciales mecanismos de acción (Palza, Delgado y Pinochet, 2015: p.3). Uno de los mecanismos está basado en la capacidad de generar especies reactivas de oxígeno, las cuales pueden inducir un estrés oxidativo en las bacterias, resultando en que las células fallen en el mantenimiento de sus funciones fisiológicas normales. El otro mecanismo está dado por la capacidad de estos iones de interactuar con enzimas y proteínas celulares, uniéndose a grupos funcionales con carga negativa que estén presentes en ellas, principalmente con grupos tioles. Finalmente, esto resulta en cambios estructurales a nivel de la membrana plasmática de la bacteria, lo cual aumenta su permeabilidad causando disipación de protones y finalmente muerte celular.

1.2.9. Nanopartículas de plata y cobre como agentes antimicrobianos

En numerosas investigaciones se ha observado que cuando a la plata y al cobre se los prepara en forma de nanopartículas se observan características antimicrobianas superiores a las que posee el material tradicional, posiblemente debido a su mayor relación superficie: volumen. Esto permite, además, que interactúen de manera distinta con las membranas bacterianas (Panáček et al., 2018: pp.65-67).

Las propiedades antimicrobianas de las nanopartículas de plata han sido establecidas y se han propuesto diversos mecanismos de acción (Lee et al., 2011: pp. 1971-1977) pero hay muy pocos estudios reportados sobre los efectos bactericidas del cobre nano particulado.

En diversos trabajos se presentan a las nanopartículas como alternativas a los agentes antibacterianos tradicionales por presentar una menor toxicidad en células eucariotas al liberar menor cantidad de iones metálicos (Katsumiti et al., 2015: pp. 2-20). Además, pueden ser inmovilizadas y adheridas a diferentes superficies, lo cual tiene aplicación en numerosos campos. Asimismo, las nanopartículas de plata pueden ser combinadas con polímeros para generar materiales compuestos con mayor actividad antimicrobiana.

Se han realizado ensayos sobre el efecto del tamaño de nanopartículas de plata esféricas de entre 1 y 10 nm. En primer lugar, observaron que las NP interactúan con la membrana de células *E. coli*, e ingresan en el interior de estas bacterias.

Mediante imágenes obtenidas por microscopía de campo oscuro (HAADF) y microscopía electrónica de transmisión (TEM) se propuso que el efecto bactericida podría depender del tamaño, ya que las nanopartículas que ingresaban a la célula tenían tamaños similares a las que se encontraban delimitando la membrana, lo cual indicaría que solo las partículas que interactúan con la membrana son capaces de ingresar al citoplasma (Morones et al., 2005: pp.2346-2353).

Por otro lado, Salopek y colaboradores sugirieron que cuando un cultivo de *E. coli* es tratado con nanopartículas de plata, estas se acumulan en la pared celular bacteriana y desactivan enzimas celulares, provocándole perforaciones e incrementando significativamente su permeabilidad, lo cual afecta negativamente el transporte activo a través de la membrana plasmática y genera la muerte celular (Sondi and Salopek-Sondi, 2004: pp. 178-180).

Otros aportes indican que las nanopartículas de Ag esféricas probablemente interactúan con el azufre y los complejos que contienen fósforo como el ADN y las cadenas lipídicas de la membrana externa de las (Gram -), interrumpiendo de esta forma la morfología de la membrana plasmática celular y ocasionando daños irreversibles en el material genético, impidiendo la multiplicación celular. Por otro lado, se estableció que las nanopartículas de cobre pueden unirse

al ADN y distorsionar su estructura helicoidal por medio de entrecruzamientos entre las hebras, interfiriendo de esta forma con los procesos bioquímicos tras su ingreso en el interior celular.

La razón por la cual las bacterias (Gram +) pueden resultar menos resistentes a las nanopartículas de plata y cobre, podría residir en la gran abundancia de grupos aminos y carboxilos presentes en la superficie celular de estas bacterias y la gran afinidad de las nanopartículas metálicas por estos grupos. No obstante, muchas investigaciones recientes difieren en cuanto al mecanismo de acción antibacteriano de las nanopartículas de Ag y Cu descritos anteriormente y proponen que las propiedades antibacterianas de las nanopartículas se deben a la liberación de iones en las cercanías de las bacterias por oxidación, y no a la acción de las nanopartículas en sí mismas. Por ejemplo, la posibilidad de contribución de los iones de plata pertenecientes a las nanopartículas que pueden presentar efectos inhibitorios se verificó mediante voltametría (S. Lee et al., 2011: pp.3051-3056).

En este estudio, se observó la liberación efectiva de iones al medio, a través del comportamiento electroquímico de las nanopartículas. Por otro lado, investigadores de la Universidad de Rice, determinaron que la efectividad de nanopartículas de plata se debe principalmente a su propiedad de ionización en ambientes aerobios, mientras que sin oxígeno las nanopartículas demostraron no tener efecto antimicrobiano (Xiu et al., 2012: pp. 4271-4275).

Se ha observado que ante la presencia de los iones de Ag⁺ las bacterias generaban una condensación del ADN, lo cual podría significar un posible mecanismo de defensa de estas frente a estos compuestos tóxicos. Además, los iones metálicos podrían generar la separación del citoplasma y la pared celular, lo cual sería la causa de la inhibición de la multiplicación de las células bacterianas, tanto en bacterias (Gram +) como en (Gram -) (Wang *et al.*, 2005). Debido a las controversias existentes, en este proyecto se consideró interesante realizar una comparación de la actividad antibacteriana de diferentes tipos de nanopartículas metálicas.

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Planteamiento de la Hipótesis

2.1.1. Hipótesis General

El óxido de grafeno funcionalizado tanto con nanopartículas de cobre y nanopartículas de plata posee una actividad antimicrobiana en cepas Gram Positivo y Gram Negativo causantes de infecciones en humanos.

2.1.1.2. Hipótesis Específicas

El óxido de grafeno funcionalizado con las nanopartículas metálicas presenta una alta capacidad de destrucción en cultivos bacterianos *Staphylococcus aureus*, y *Escherichia coli*.

El óxido de grafeno funcionalizado con nanopartículas de plata afecta al crecimiento de *Staphylococcus aureus*, y *Escherichia coli*.

Las técnicas de Concentración Inhibitoria Mínima y Concentración Mínima Bactericida en *Staphylococcus aureus*, y *Escherichia coli*, permiten una alternativa antimicrobiana utilizando el óxido de grafeno funcionalizado con nanopartículas de cobre.

2.2. Diseño de la Investigación

2.2.1. Tipo de Investigación

Este estudio es de tipo cuantitativo ya que para la obtención de los resultados de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) se realizan procedimientos basados en la medición del crecimiento bacteriano in vitro, además es de tipo longitudinal ya que se comprobará el crecimiento de las bacterias en los medios de cultivo tanto de Gram Negativo como de Gram Positivo. El proyecto está enfocado en el desarrollo, síntesis y caracterización de cada uno de los nanomateriales por lo que se considera un trabajo experimental.

El objeto de estudio es la actividad antimicrobiana del óxido de grafeno funcionalizado tanto con las nanopartículas de plata y cobre obtenidas por síntesis química y biológica,

adicionalmente se basa en hipótesis que serán comprobada o discrepada por medio de la experimentación.

2.2.2. Detalle Experimental

Síntesis del Óxido de grafeno

Para la síntesis del óxido de grafeno se utilizó el método de *Hummers* modificado, 3gr de grafito natural de marca *Algin* fue mezclado con 70 mL de ácido sulfúrico H_2SO_4 en vigorosa agitación utilizando un agitador magnético de la marca *Fisher Scientific*, posteriormente se agregó lentamente 9gr de permanganato de potasio $KMnO_4$. El baño de hielo fue necesario en toda esta reacción ya que la temperatura no debía superar los $20^\circ C$. Posteriormente fue cambiado a un baño de aceite para provocar un incremento de temperatura a $50^\circ C$ por 30min. Manteniendo aún en agitación constante se agregó al reactor 150mL de agua destilada por 20min y la temperatura es incrementada a $90^\circ C$. A continuación, se añadió 500mL de agua destilada a la solución, seguidamente 30mL de peróxido de hidrógeno H_2O_2 al 30% fueron colocados a la reacción gota a gota, en este paso se presenta un cambio de coloración de café oscuro a amarillo. Esta solución fue centrifugada a 3000rpm por 10min y el precipitado fue lavado 3 veces con una solución 1:10 de HCl y agua destilada a las mismas especificaciones mencionadas anteriormente. Finalmente, este precipitado fue secado en una estufa GREAT LAB - IB- 9052A a una temperatura de $80^\circ C$ por 24 horas. 4gr. del material seco fue sonicado por 2 horas en 4000mL de agua destilada y este fue centrifugado por 30min a 1000rpm obteniendo una suspensión de óxido de grafeno menos denso que representa el sobrenadante, y óxido de grafito el material precipitado que no fue exfoliado (Tene et al., 2020: p3).

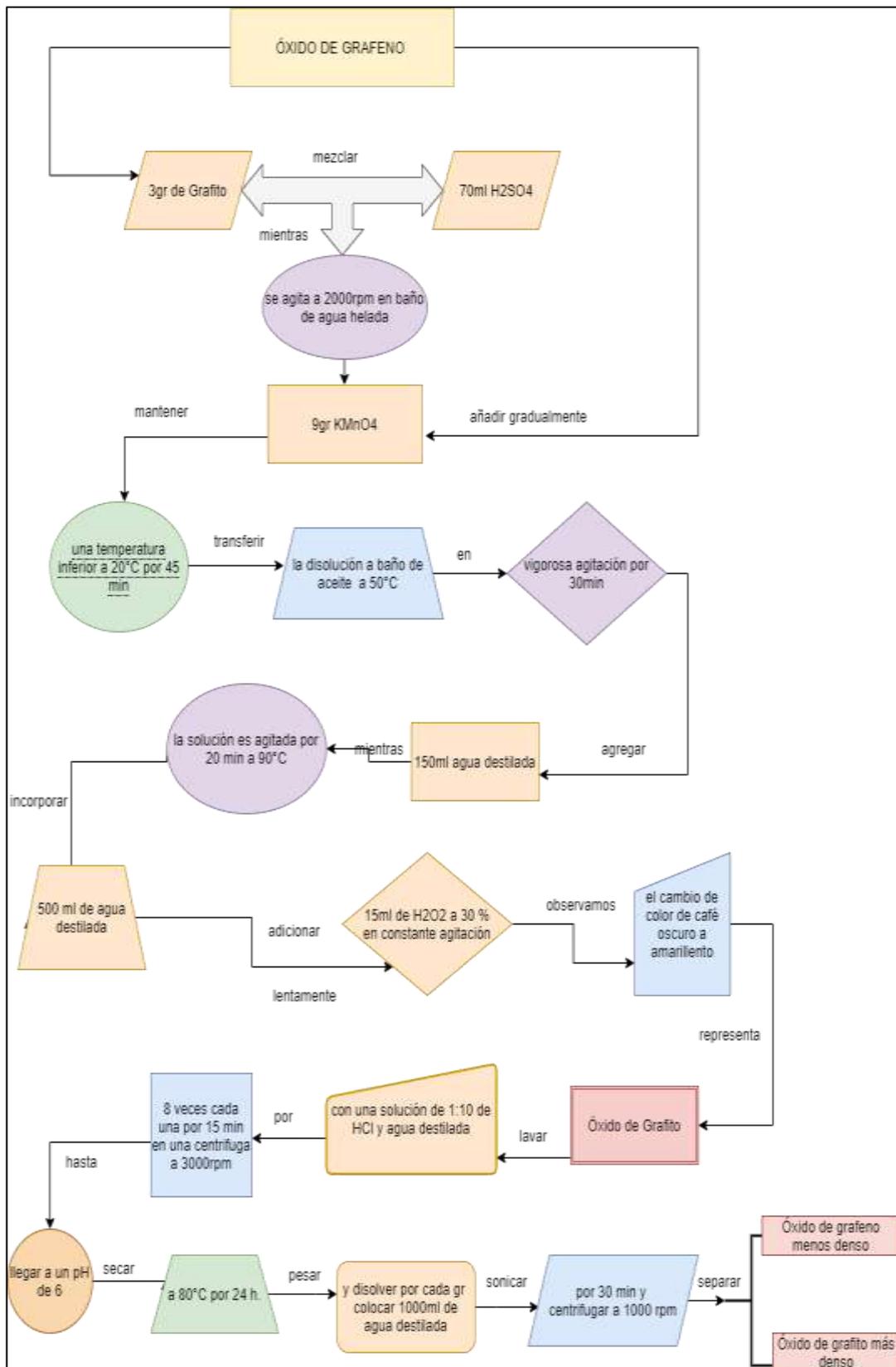


Figura 3-2: Experimento 1: Síntesis del GO.
 Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

Síntesis química de las nanopartículas de plata (AgNP's)

En 500mL de agua destilada fueron agregados 5gr de nitrato de plata AgNO_3 y llevadas a ebullición, en un vaso de precipitación de 50mL 5gr de citrato de sodio $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ fueron pesados, al cual se añadió 10mL de agua destilada. Esta última solución fue agregada a la primera gota a gota utilizando una bureta mientras se mantuvo en agitación constante, además la solución debe alcanzar los 90°C por 1 hora. Finalmente, el precipitado se recolectó en un vidrio reloj y fue secado a 80°C por 24 horas (Ramadhani Khija, ludovick Uttoh 2015: pp. 1576-1577).

Síntesis biológica de las nanopartículas de plata (AgNP's)

Un peso de 25gr de semillas de *Caléndula Officinalis* fue lavado por algunas ocasiones con agua destilada para quitar impurezas y luego fueron agregadas en un vaso de precipitación con 100mL de agua destilada. Fue llevado a ebullición por 30min y filtrado con papel filtro por *CHMLAB Group N°1*. A 25mL del extracto obtenido anteriormente se agrega 5gr de nitrato de plata AgNO_3 y esta solución fue aforada a 225mL con agua destilada. El precipitado fue secado a 80°C por 24 horas (Baghizadeh et al. 2015: pp. 159-163).

Síntesis química de las nanopartículas de cobre (CuNP's)

Las nanopartículas de cobre fueron sintetizadas mediante reducción química, 25gr de sulfato de cobre pentahidratado $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ fueron añadidos en 120mL de una solución de almidón al 1,2% manteniendo en agitación por 30min. Luego, en 50mL de agua destilada se agregó 35,2gr de ácido ascórbico $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ y esta solución fue agregada a la primera, subsecuentemente 30mL de una solución de 40gr de hidróxido de sodio NaOH , fue agregada lentamente a la solución por medio de una bureta y calentada a 80°C por 2 horas observando un cambio de color. El precipitado es lavado con agua destilada y etanol por 3 veces para eliminar el exceso de almidón en las nanopartículas, las nanopartículas obtenidas fueron secadas a temperatura ambiente (Khan et al., 2016: pp. 21-26).

Síntesis biológica de las nanopartículas de cobre (CuNP's)

A 51mL de zumo de *citrus limon* se agregó 12,78gr de sulfato de cobre pentahidratado $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ el cuál funciona como agente precursor, esta solución gradualmente fue llevada a ebullición en un recipiente de aluminio hasta la evaporación completa del medio acuoso, el aluminio provoca que las nanopartículas de cobre se adhieran a la superficie de nuestro recipiente. Con 20mL de agua destilada fue sonicado para desprender el material obtenido y posteriormente el precipitado es secado en un vidrio reloj (Shende et al., 2015: pp. 865-868).

Funcionalización de las nanopartículas con óxido de grafeno

Para la funcionalización de las nanopartículas primero se prepara una solución de óxido de grafeno a una concentración de 650ppm, luego realizamos soluciones de las nanopartículas metálicas a las siguientes concentraciones (32; 62,5; 120; 250) [$\mu\text{g}/\text{mL}$] y se mezcla las soluciones mediante agitación por 15min usando un agitador magnético, después la solución fue

sonicada por 10min, nuevamente la solución fue agitada por 15min, y finalmente la mezcla fue centrifugada a 13000rpm por 10min

Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima mediante la técnica antibiograma de disco

La investigación de la actividad antimicrobiana en cepas Gram positivo y Gram negativo sigue un método totalmente aleatorio, para la siembra de bacterias tanto en Gram Positivo como en Gram Negativo se utilizarán 16 cajas Petri en las cuales se colocará 6 discos de 5mm, 4 discos blancos serán cargados con 20uL del nanohíbrido los cuales serán colocados de manera aleatoria con los distintos tipos de nanopartículas, concentraciones y métodos de obtención. (Taroco, Seija y Vignoli, 2008: pp. 663-671). Los discos restantes serán utilizados, 1 disco de control y 1 disco con el Óxido de Grafeno (Figura.4-2).



Figura 4-2: Diseño Experimental del Antibiograma.
Realizado por: Barba. M & Pachacama.J,2021.

Determinación de la Concentración Mínima Bactericida mediante la técnica dilución en Caldo y difusión en Agar.

La concentración ideal para las pruebas de CMI, CMB y el conteo de UFC fue de 10^{-7} utilizando bacterias activadas *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, para obtener esa concentración ideal utilizamos una aza de metal previamente esterilizada para recoger la bacteria en el tubo que contiene agua destilada y esterilizada hasta que llegue a presentar una turbiedad, 1mL de esta bacteria fue pipeteada y puesta en un tubo de ensayo que contenía 9mL de agua de peptona

siendo esta la concentración de 10^{-1} , así sucesivamente hasta llegar a la dilución de 10^{-7} (HORN QUINTANA et al., 2012: p. 39) (Figura 5-2).

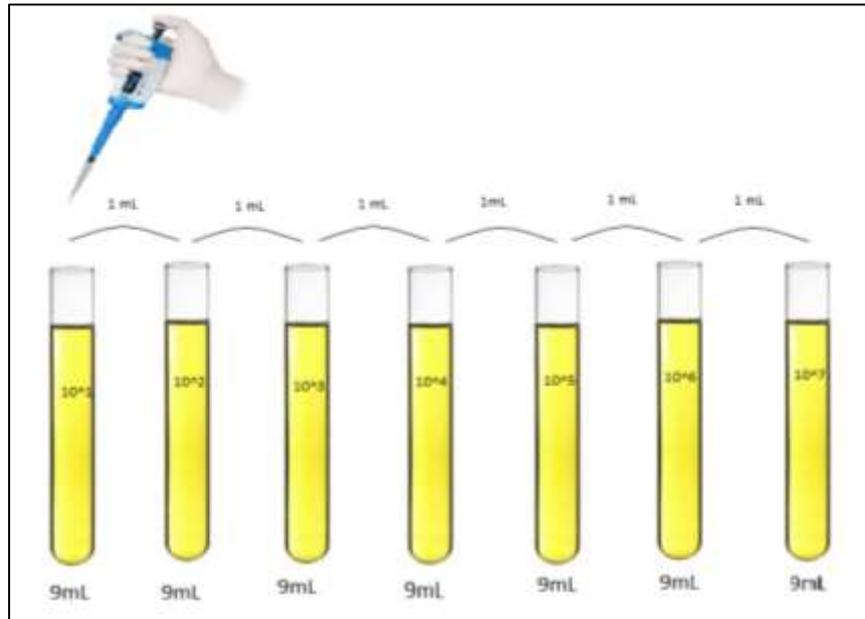


Figura 5-2: Diluciones de Bacteria
Realizado por: Barba. M & Pachacama.J,2021.

El diseño experimental consistió en las etapas que se detallan a continuación en el esquema.

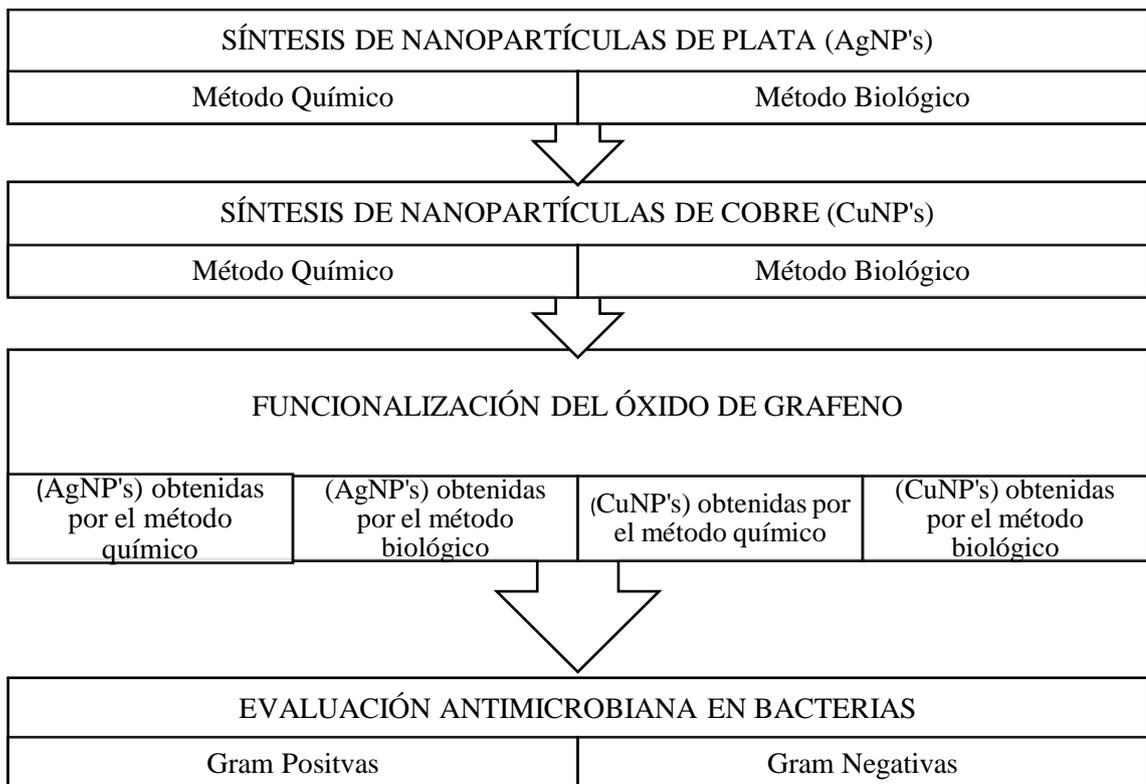


Figura 6-2: Esquema experimental
Realizado por: Barba. M & Pachacama.J,2021.

Identificación de Variables

Variable dependiente: Tamaño de las nanopartículas de cobre y plata, acción antimicrobiana en las sepas de *E. coli* y *S. aureus*: Concentración inhibitoria mínima, Concentración bactericida mínima y Unidades Formadoras de Colonias.

Variable independiente: Los métodos de obtención de las nanopartículas de cobre y de plata, concentración del Óxido de Grafeno y Concentración de las Nanopartículas.

2.2.3. Operacionalización de las variables

Tabla 1-2: Obtención de Nanopartículas Metálicas de Plata y Cobre

VARIABLE	CONCEPTO	INDICADOR	INSTRUMENTO
Variable independiente: Método de Obtención	El método de obtención es el proceso mediante el cual se sintetizarán las nanopartículas de plata. Para estos experimentos se utilizará un método químico y biológico.	Absorbancia nos da a conocer la cantidad de luz absorbida y se define como: A=log 1/T	UV-VIS FTIR
Variable dependiente: Morfología de la nanopartícula de plata	Morfología de la nanopartícula es el estudio de las estructuras y características de los objetos.	Tamaño de nanopartículas en nanómetros	Microscopía electrónica de barrido SEM

Realizado por: Barba. M & Pachacama.J,2021.

Tabla 2-2: Evaluación Antimicrobiana en Gram Positivo

VARIABLE	CONCEPTO	INDICADOR	INSTRUMENTO
Variable independiente: alternativa antimicrobiana Óxido de Grafeno	Para este experimento las nanopartículas de la plata y cobre, obtenidas en un método biológico y químico son funcionalizadas con el óxido de grafeno.	UFC/mL= [No. colonias en placa * factor de la dilución] / mL de la muestra.	Reporte de conteo de Colonias
Variable dependiente: La acción antibacteriana sobre las cepas Gram Positiva <i>Staphylococcus aureus</i>	Gram Positivas Grupo de bacterias que no poseen membrana externa, capaz de proteger el citoplasma bacteriano.	CMI: De un antibiótico frente a una determinada bacteria será la solución más diluida de todos los pocillos en donde no se observa crecimiento alguno.	
		CMB: Concentración de antimicrobiano que ha matado el 99,9% del inóculo original.	

Realizado por: Barba. M & Pachacama.J,2021.

Tabla 3-2: Evaluación Antimicrobiana en Gram Negativo

VARIABLE	CONCEPTO	INDICADOR	INSTRUMENTO
Variable independiente: Alternativa antimicrobiana Óxido de Grafeno	Para este experimento las nanopartículas de la plata y cobre, obtenidas en un método biológico y químico son funcionalizadas con el óxido de grafeno	UFC/mL= [No. colonias en placa* factor de la dilución] / mL de la muestra.	Reporte de conteo de Colonias
Variable dependiente: La acción antibacteriana sobre las cepas Gram Negativa <i>E. coli</i>	Gram Negativas Se caracterizan por tener una membrana externa que está compuesta por un complejo lipopolisacárido	CMI: De un antibiótico frente a una determinada bacteria será la solución más diluida de todos los pocillos en donde no se observa crecimiento alguno. CMB: Concentración de antimicrobiano que ha matado el 99,9% del inóculo original.	

Realizado por: Barba. M & Pachacama.J,2021.

2.2.5. Localización del estudio

El estudio y el desarrollo experimental se desarrolló en el Laboratorio de Investigación y en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH) en la ciudad de Riobamba.

2.2.6. Población de estudio

La población de estudio de la presente investigación está conformada por el óxido de grafeno, nanopartículas de plata y cobre, y por microorganismos patógenos Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y Gram negativas como *Escherichia coli*.

2.2.7. Tamaño de la muestra

Para este estudio se utilizará 10mL de Óxido de Grafeno a una concentración de 580ppm el mismo que será funcionalizado tanto con AgNP's y CuNP's cuyas concentraciones varían de (32;62.5; 125; 250) [ug/mL]. Para el tratamiento de actividad antimicrobiana se empleará 50uL

de sepas bacterianas Gram Positivo *S.Aureus* y Gram Negativo *E.coli* cuyo factor de dilución es 10^{-7} .

2.2.8. Método de muestreo

El estudio posee un tipo de muestreo no probabilístico por conveniencia ya que las muestras con las que se trabajaron fueron seleccionadas de acuerdo con las propiedades que posee cada una de ellas y por el aporte que tendrán dentro de este. Se seleccionó el GO, puesto que es el nanomaterial de más fácil obtención que otros derivados el grafeno; se escogieron las muestras microbiológicas de especies tanto Gram positivas como Gram negativas que son muy comunes en las infecciones del ser humano como *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus*.

2.2.9. Técnicas de recolección de datos

Los datos son recopilados mediante hojas de cálculo de Excel.

2.2.10. Instrumentación

Tabla 4-2: Espectrofotómetro

Equipo	Esquema	Modelo
Espectrofotómetro		Thermo Fisher Scientific Model: Evolution 220
<p>Se basa en la absorción de radiación UV por parte de las partículas presentes en una sustancia. Brinda información detallada en un rango de 190 a 800 nm de los estados moleculares de la materia. Normalmente se compone por una lámpara de deuterio, wolframio o xenón un prisma de dispersión y un colimador que va a elegir la longitud de onda dirigida a la muestra, y finalmente un detector encargado de medir la longitud de onda emitida por la muestra formando un espectro de transmisión o absorción según lo deseado.</p>		

Realizado por: Barba. M & Pachacama.J,2021.

Tabla 5-2: Espectrómetro de infrarrojo

Equipo	Esquema	Modelo
Espectrómetro		Jasco FT/IR 4700
<p>Analiza la interacción de la materia con energía del espectro infrarrojo la cuál una parte de la molécula o la molécula en su totalidad absorbe y produce excitación provocando un cambio en la intensidad de la vibración. El interferograma es como se lo llama a el tipo de la señal dada por un espectrómetro de infrarrojo y es una señal relativamente compleja para poder ser analizada. A pesar de todo este formato puede ser traducido a lo que conocemos como un espectro de infrarrojo.</p>		

Realizado por: Barba. M & Pachacama.J,2021.

Tabla 6-2: Microscopio de fuerza atómica

Equipo	Esquema	Modelo
Microscopio de fuerza atómica		NaioAFM
<p>El Microscopio de Fuerza Atómica da imágenes monitoreando la superficie de la muestra con una punta de radio de curvatura de 20 a 60 nm. La fuerza provocada de la punta a la muestra provoca un cambio de dirección de un haz de electrones que a su vez llega a un detector y este da una microimagen o micrografía 3D de la superficie de la muestra.</p>		

Realizado por: Barba. M & Pachacama.J,2021.

Tabla 7-2: Microscopio electrónico de barrido

Equipo	Esquema	Modelo
Microscopio electrónico de barrido		JSM-IT100 Intouchscope™
<p>El SEM se basa en que los electrones transmitidos por un cátodo de tungsteno atraviesan una columna en la cual se ha hecho un vacío aproximado de 10^{-7} Torr. El haz inicial de electrones es concentrado por una serie en paralelo de lentes electromagnéticas desde unos 25.000-50.000 nm hasta unos 10 nm; es decir, su radio va disminuyendo gradualmente hasta hacerse casi puntual. Dando un aumento de hasta 140 000 veces y emitiendo una imagen tridimensional de la muestra que está siendo estudiada.</p>		

Realizado por: Barba. M & Pachacama.J,2021.

Tabla 8-2: Materiales

MATERIAL	CARACTERISTICAS
Balón de tres bocas	GLASSCO 1000mL
Bomba de Vacío	BOECO GERMANY R-400
Bureta	GLASSCO (25mL)
Erlenmeyer	GLASSCO BORO 3.3 (500 mL)
Espátula	FISHER
Frascos de Vidrio	BOECO GERMANY (1000mL)
Kitasato	PYREX USA 1000mL
Papel aluminio	GOLDERY
Pera de succión	FRANCE 8
Pipetas	BOECO GERMANY 10mL
Probeta	BOECO GERMANY (100mL)
Tubos Falcon	BOECO GERMANY (50mL)
Vasos de Precipitación	GLASSCO BORO 3.3
Agitador magnético	FISHER SCIENTIFIC CAT NO.1152016SH
Balanza Analítica	RADWAG MODEL AS 220.R2
Baño Ultrasonico Sonificador	SOLITEC SOLUZIONI TECNOLOGICHE (SONICA 3300ETH S3)
Centrífuga	ORTO ALRESA MODEL: DIGITOR 21 C
Estufa	GREAT LAB - IB- 9052 ^a
Medidor de pH	FISHER SCIENTIFIC ACCUMET xl150
Reverbero	HOMETECH
Termómetro digital	TRACEABLE -50°C ~+300°C

Realizado por: Barba. M & Pachacama.J,2021.

Tabla 9-2: Reactivos

REACTIVOS	PUREZA	MARCA
Ácido sulfúrico	95-97 %	Merck EMSURE
Nitrato de plata	100%	BRITTANY-ASOCIADOS
Sulfato de cobre pentahidratado	99%	Loba Chemie
Citrato de sodio	99%	AppliChem Panreac
Grafito	99%	ALGIN
Almidón	100%	PANREAC QUIMICA SAU
Ácido clorhídrico	37%	FERMONT
Agua ultrapura	100%	Laboratorios Nova
Ácido ascórbico	100%	FoodChem

Realizado por: Barba. M & Pachacama.J,2021.

2.2.11. Análisis estadístico

Se realizará un test de ANOVA y en el caso de que exista una diferencia estadísticamente significativa entre las varianzas de los tratamientos se realizará una prueba de hipótesis mediante una prueba F.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Síntesis de nanomateriales y nanopartículas

3.1.1. Síntesis del Óxido de Grafeno

El cambio de tonalidad del grafito durante la síntesis del óxido de grafeno es un indicador de que el procedimiento de síntesis es correcto, en la (Figura 7-3) se muestra los cambios de color que sufre el material, al principio el grafito con el ácido sulfúrico H_2SO_4 forman una mezcla de color negro (Figura 7-3.a), al ser agregado el permanganato de potasio $KMnO_4$ la mezcla sufre un primer cambio de color de negro a verde oscuro (Figura 7-3. b), según Dreyer et al. afirman que el color se debe a la formación de heptaóxido de dimanganeso (Mn_2O_7) que es responsable de la oxidación del grafito (Dreyer, Todd and Bielawski, 2014). A medida que el heptaóxido de dimanganeso interacciona con los dominios de grafito se observa que la mezcla toma una tonalidad café púrpura debido a la liberación de dióxido de manganeso MnO_2 , (Saini et al., 2019: pp.67-68) color que se muestra en la (Figura 7-3. c), al agregar el agua destilada el color de la mezcla se torna café (Figura 7-3. d). Tras adicionar el peróxido de hidrógeno H_2O_2 , la mezcla toma un color amarillo (Figura 7-3. e) esto es por la reducción del permanganato de potasio $KMnO_4$ residual y del dióxido de manganeso MnO_2 en sales solubles incoloras. Finalmente, después del lavado de ácido clorhídrico HCl y agua destilada la disolución muestra un color café (Figura 7-3. f) esto se debe a que el agua permite la formación de enlaces C=C lo que da como resultado formación de grupos carbonilo. El Óxido de Grafeno sintetizado tuvo una concentración de 580ppm.

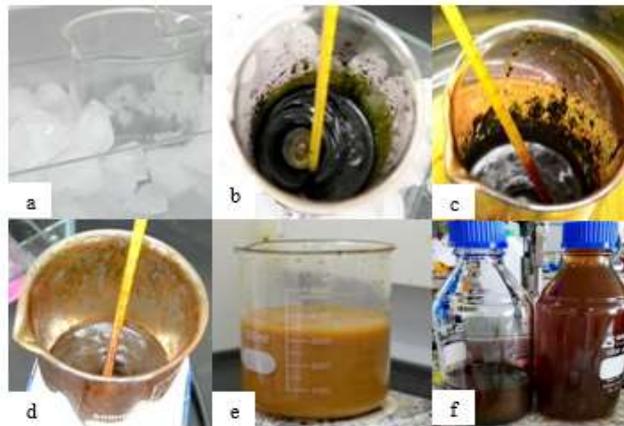


Figura 7-3: Síntesis Óxido de Grafeno
Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

El material resultante fue secado por 24 horas y tomó un color oscuro (Figura 8-3), el mismo que ha sido reportado por (Chen et al., 2013: pp. 225-229). Estas características según (Dimiev *et al.*, 2014: pp. 3060-3068) se deben a las fuerzas de atracción de dominios aromáticos que poseen las capas del óxido de grafeno GO aún después de ser exfoliadas y secas.



Figura 8-3. Óxido de Grafeno seco
Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

3.1.2. Síntesis de nanopartículas de plata por el método químico

Las nanopartículas de plata AgNP's fueron obtenidas mediante síntesis química para la cual se utilizó nitrato de plata como sal precursora y citrato de sodio como agente reductor, Ramadhani Khija, ludovick Uttoh mencionan que la síntesis de las nanopartículas de plata toman un color amarillo véase en (Figura 9-3) (Ramadhani Khija, ludovick Uttoh, 2015: pp. 1576-1580).

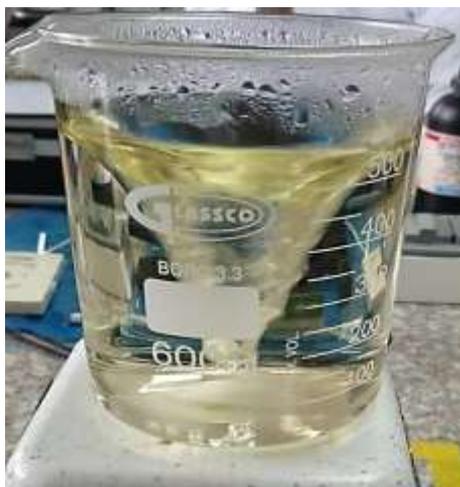


Figura 9-3: Síntesis química de nanopartículas de plata.
Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

Debido que el citrato de sodio es un agente reductor débil es necesario que la síntesis sea preparada en temperaturas que oscilen los 90°C, esta es la causa para que se produzca

intercambio de moléculas entre el citrato y plata lo que provoca que las nanopartículas permanezcan en la solución y que no se depositen en la superficie, además el tiempo de la agitación aumenta ya que la reacción es lenta, por otro lado, influye en el tamaño y dispersión de las partículas.

Posteriormente las nanopartículas fueron secadas a 80°C por 24 horas adquiriendo un color negro grisáceo (Figura 10-3).



Figura 10-3: Nanopartículas de Plata síntesis química.
Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

3.1.3. Síntesis de nanopartículas de plata por el método biológico

Para la síntesis biológica de nanopartículas de plata se empleó nitrato de plata como sal precursora y extracto de semilla de *Caléndula Officinalis* como agente reductor y estabilizante, la formación de nanopartículas se manifestó con el cambio de coloración de amarillo pálido (Figura 11-3.a) a marrón (Figura 11-3.b) esto se debe a las excitaciones de las vibraciones de plasmones superficiales en las nanopartículas de plata similar al reportado por (Baghizadeh et al., 2015: pp. 159-163). Así mismo, el cambio de tonalidad nos indica que los iones de plata se reducen confirmando la formación de nanopartículas de plata.



Figura 11-3: Síntesis biológica de nanopartículas de plata
Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

Las nanopartículas al ser secada por 24 horas a 80°C cambian su tonalidad a negro (Figura 12-3.)

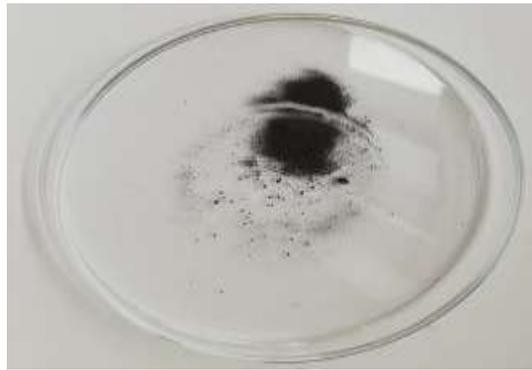


Figura 12-3: Nanopartículas de plata síntesis verde.
Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

3.1.4. Síntesis de nanopartículas de cobre método químico

Las nanopartículas de cobre fueron preparadas por el método de reducción química en la que se utilizó al sulfato de cobre pentahidratado como sal precursora, la función del almidón fue agente de remate en la reacción , el color azul característico del sulfato de cobre pentahidratado (Figura 13-3.a) se transforma a verde azulado (Figura 13-3.b) al ser agregado el ácido ascórbico el cuál actúa como agente reductor débil, consecuentemente al adicionar el hidróxido de sodio se incrementa la producción de Cobre debido a que se oxida con facilidad con pequeñas proporciones de oxígeno dando como resultado un color ocre (Figura 13-3.c) similar al color que reporta (Khan et al., 2016: p.26).

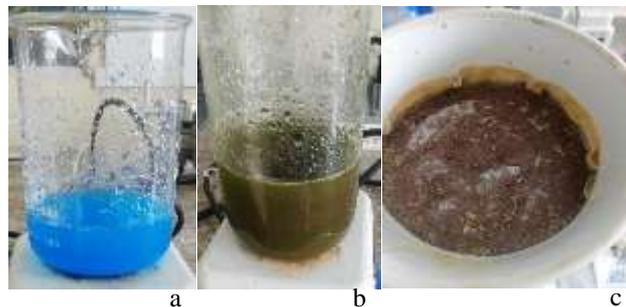


Figura 13-3: Síntesis química de nanopartículas de cobre.
Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

El material fue filtrado y secado a temperatura ambiente tomando un color café rojizo véase (Figura14-3).



Figura 14-3: Nanopartículas de cobre método químico.
Realizado por: Barba. M & Pachacama.J,2021.

3.1.5. Síntesis de nanopartículas de cobre método biológico

Las nanopartículas de cobre fueron preparadas mediante extracto de *Citrus limon* (Figura 15-3.a) que fue el agente reductor y como sal precursora se empleó sulfato de cobre pentahidratado, el color celeste (Figura 15-3.b) de la solución precursora cambia a amarillo claro o a veces se vuelve incoloro (Figura 15-3.c), al cabo de 10 minutos en las paredes del recipiente de aluminio se formó partículas pequeñas de color rojizo, esta deposición del brillo nos indica la formación de las nanopartículas de cobre (Figura 15-3.d).

Según (Shende et al., 2015: pp. 865-873) la deposición de cobre sobre aluminio es un proceso de cementación donde un metal menos pesado remueve otro metal menos reactivo, produciendo una reacción redox de un solo sentido, a medida que prosigue la reacción el cobre se precipita formando una fina capa conocida como revestimiento de la pared del recipiente.

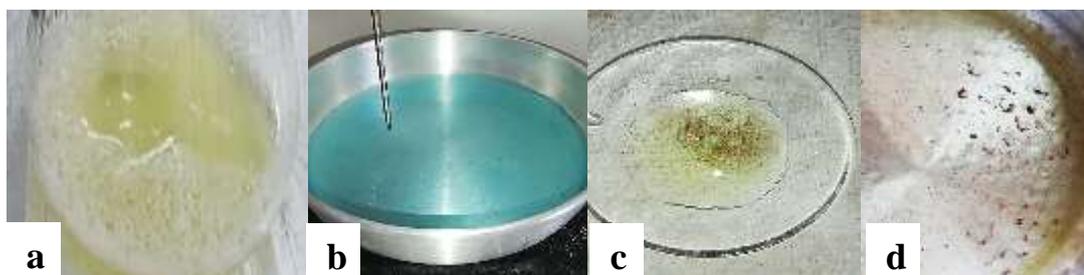


Figura 15-3: Síntesis biológica de nanopartículas de cobre.
Realizado por: Barba. M & Pachacama.J,2021.

El material fue secado a 80°C por 24 horas obteniendo finalmente un color café oscuro como se muestra en la (Figura 16-3).



Figura 16-3: Nanopartículas de cobre método biológico.
Realizado por: Barba M & Pachacama J, 2021.

3.1.6. Funcionalización de las nanopartículas metálicas con el óxido de grafeno

Las nanopartículas metálicas fueron funcionalizadas con disoluciones de óxido de grafeno a un mismo volumen, para cada una de esta disolución se utilizó un volumen de 5mL de Óxido de Grafeno y un peso de 160mg; 312,5mg; 625mg y 1250mg respectivamente para cada una de las diferentes concentraciones(Figura 17-3.a), los reactivos utilizados se colocaron en vasos de precipitación (Figura 17-3.b) y fueron mantenidas en agitación magnética por 15min (Figura 17-3.c), después sonicadas por otros 15min (Figura 17-3.d), y finalmente agitadas por 15min en este último paso se aprecia una unificación dando a lugar a una solución completamente uniforme (Figura 17-3.c) aunque esta dependía de las nanopartículas utilizadas en este proceso de la funcionalización.

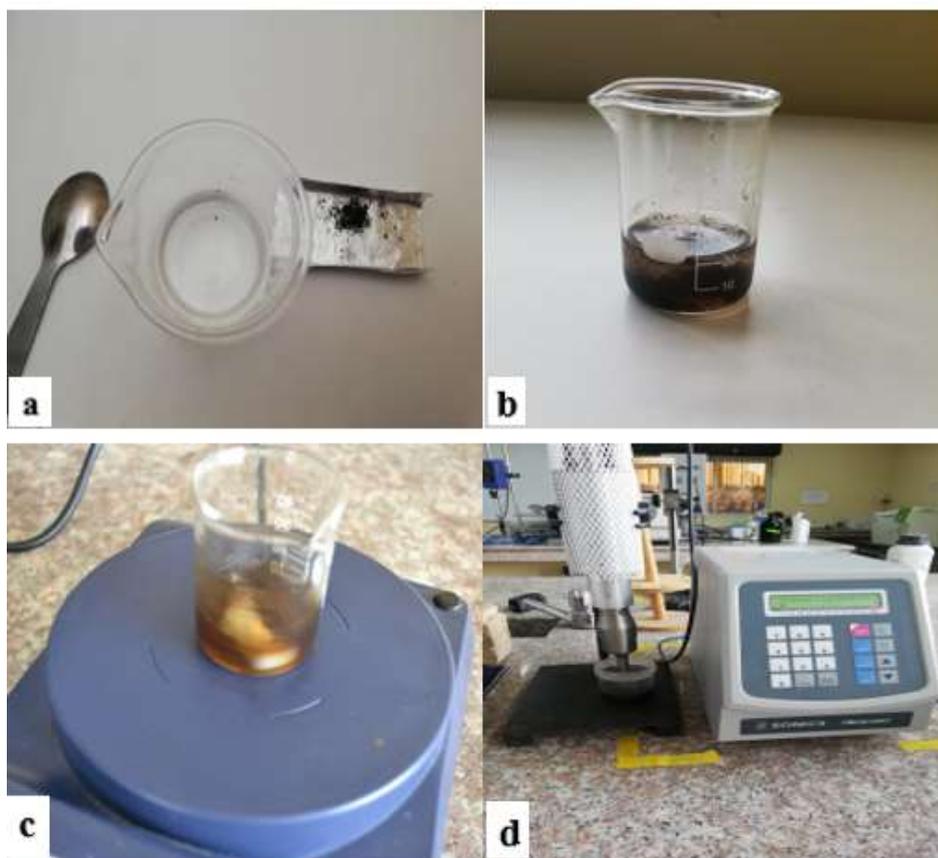


Figura 17-3: Funcionalización de las nanopartículas metálicas
Realizado por: Barba. M & Pachacama.J,2021.

3.2. Caracterización de las Nanopartículas y Nanomateriales

3.2.1. Espectroscopía Ultravioleta Visible (UV-Vis)

La espectroscopía UV-Vis es un método analítico que se basa en el proceso de absorción de luz o radiación ultravioleta visible, la región ultravioleta ocupa un rango de 190 a 400 [nm] y la región del visible se encuentra en un rango de 400 a 800 [nm].

Esta técnica espectroscópica es denominada electrónica ya que cuando una molécula absorbe un fotón de radiación UV-Vis, provoca la promoción de un electrón de estado basal a un estado excitado. Los electrones de enlace de las moléculas son los que se excitan al absorber la radiación por lo que se correlaciona los picos de absorción con los distintos enlaces que existe en la muestra, permitiendo así un análisis cualitativo.

3.2.1.1. Espectroscopía UV-Vis Óxido de Grafeno

En la Figura 18-3 se presenta el espectro UV-Vis del Óxido de Grafeno el cuál muestra un pico máximo de absorción a los 232[nm] y un hombro a 301 [nm], lo que se atribuye a la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ de los enlaces C-C; y transición característica $n \rightarrow \pi^*$ de los enlaces C=O respectivamente. La característica general de este espectro es idéntica a la del GO obtenido por (Chen et al., 2013: pp. 225-229), además el valor de los picos concuerdan con los picos reportados en literatura (Marcano et al., 2010: p. 4810; Tene et al., 2020: p.5).

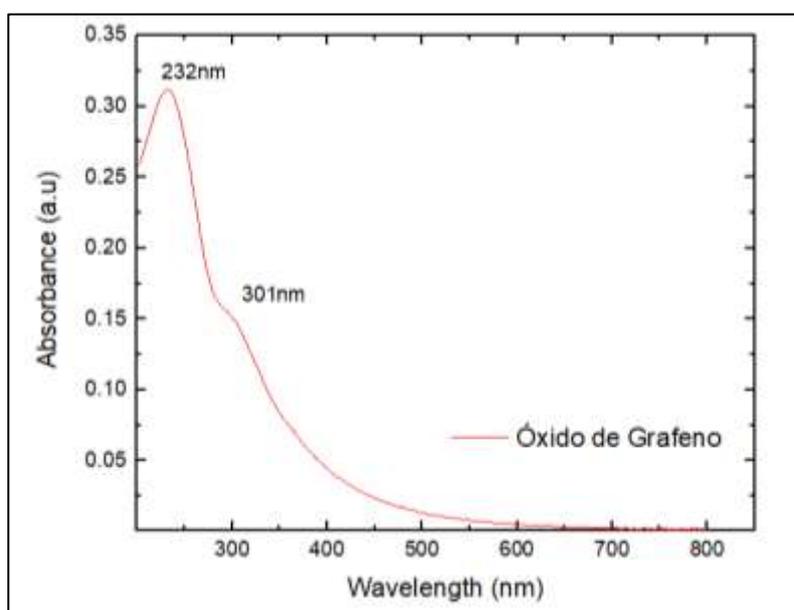


Figura 18-3: Espectro UV-Vis del Óxido de Grafeno
Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

3.2.1.2. Espectroscopía UV-Vis Nanopartículas de Plata

La espectroscopía UV-Vis en la síntesis de nanopartículas se usa para examinar el tamaño y forma de NP's en suspensión. El espectro de absorción de nanopartículas de plata obtenidas por el método químico o reducidas con citrato de sodio (Figura 19-3.a) muestra un pico máximo de absorbancia a los 445[nm], mientras que la banda de absorción de las nanopartículas de plata obtenidas por el método biológico o reducidas por *Caléndula Officinalis* (Figura 19-3. b) presentan un pico en los 437[nm], el comportamiento de estos espectros es típico de suspensiones cuyo tamaño de partícula no es uniforme, por lo que suponemos que en nuestra síntesis tenemos diferentes tamaños de nanopartículas. Por literatura se conoce que la presencia de una banda de absorción a los 400 [nm] indica la formación de nanopartículas resultantes de la reducción de iones de plata (Bouchareb et al., 2020: p.160).

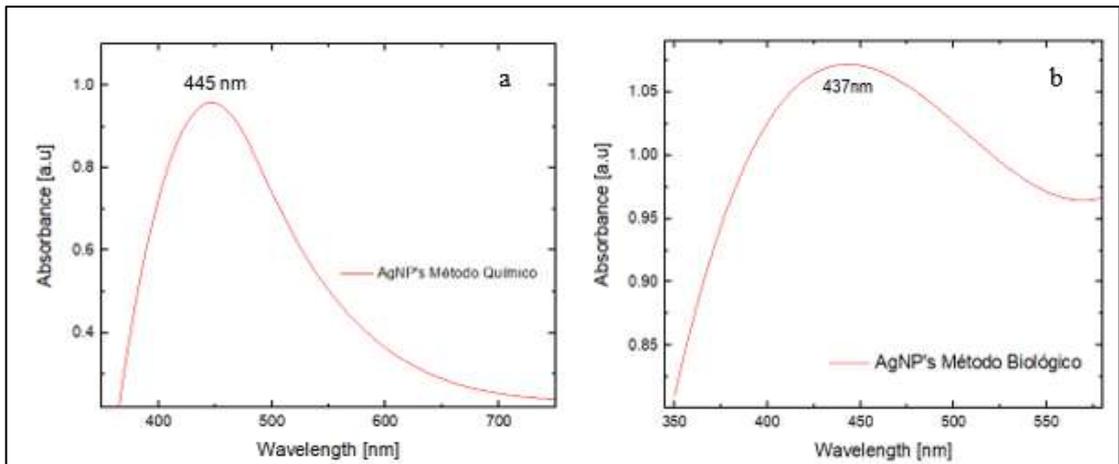


Figura 19-3: Espectroscopía visible AgNP's. **a** síntesis química. **b** síntesis biológica.
 Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

3.2.1.3. Espectroscopía UV-Vis Nanopartículas de Cobre

Las nanopartículas de cobre obtenidas por síntesis química empleando al ácido ascórbico como agente reductor muestra un pico de máxima absorción en 515[nm] véase en la (Figura 20-3.a), esta banda de absorción se aproxima al valor de adsorción máximo de las nanopartículas de cobre mencionadas en literatura, suponemos que se debe a la inestabilidad de las nanopartículas y al disolvente utilizado en la caracterización (Khanna et al., 2007: pp. 4711-4714).

En la Figura 20-3.b se evidencia un pico de absorción a los 400[nm] en el espectro UV-Vis de las CuNP's obtenidas mediante síntesis biológica ocupando al limón como agente reductor, el valor de este pico nos indica que dentro de nuestra síntesis se formó nanopartículas de cobre puras y nanopartículas de óxido de cobre, el porcentaje de estas nanopartículas serán analizadas mediante EDS (Solache-carranco y Ju, 2009: pp. 393-398).

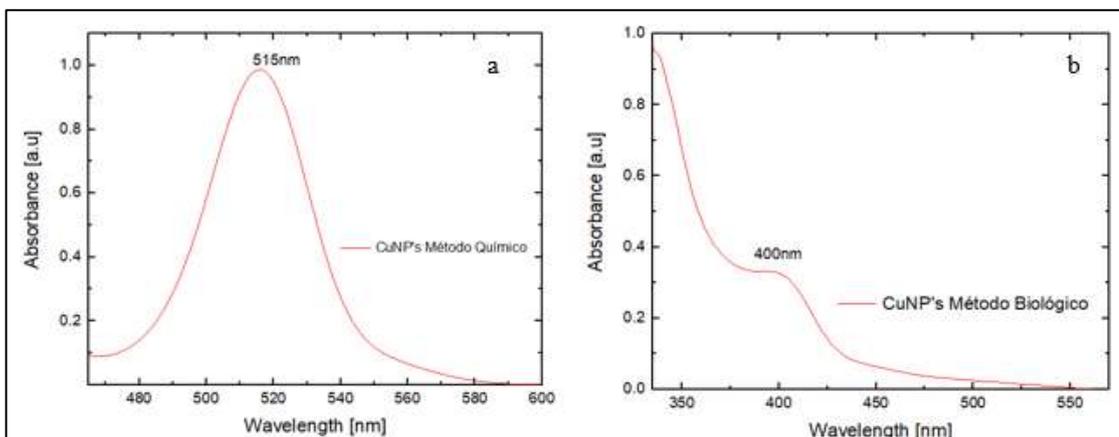


Figura 20-3: Espectro UV-Vis CuNP's. **a** síntesis química. **b** síntesis biológica.
 Realizado por: Barba. M, & Pachacama. J, 2021.

3.2.1.4. Espectroscopía UV-Vis Óxido de Grafeno funcionalizado con Nanopartículas de Plata

La espectroscopía UV-Vis se utilizó para comprobar la formación de nanohíbridos de GO-AgNP's y GO-CuNP's. La Figura 21-3 se muestra el espectro UV-Vis del GO funcionalizado con AgNP's obtenidos por síntesis química (Figura 21-3.a) y nanopartículas de plata obtenidas por síntesis biológica o también denominada síntesis verde (Figura 21-3. b). En el que se puede apreciar un corrimiento del pico máximo que presenta el óxido de grafeno de los 232 a los 230[nm] mediante la síntesis química, este valor está dentro del rango establecido en literatura (Marcano *et al.*, 2010: pp. 4810; Cobos *et al.*, 2020: pp. 15; Tene *et al.*, 2020: p.7). En la síntesis biológica se aprecia un corrimiento de 232 a 210[nm] lo que nos indica una reducción parcial del material durante los diferentes procesos de síntesis del nanohíbrido además el espectro muestra la banda característica de las AgNP's (Cobos *et al.*, 2020: pp.15-20).

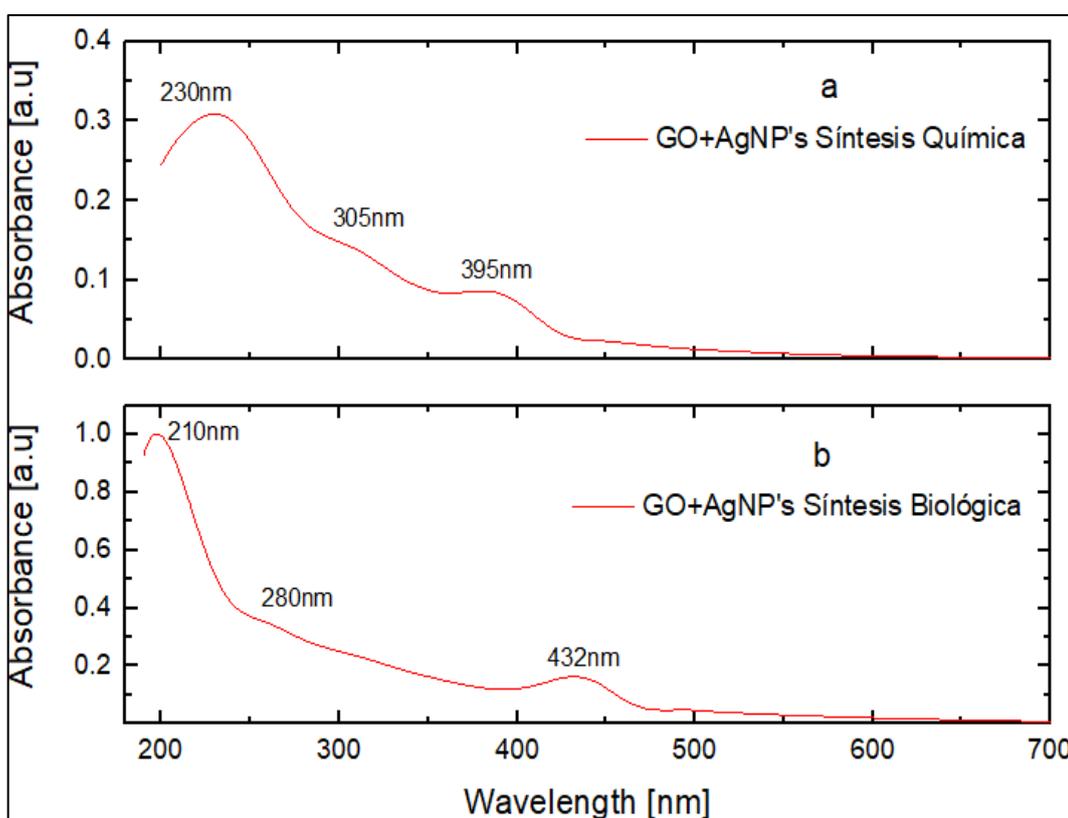


Figura 21-3: UV-Vis del GO funcionalizado AgNP's. **a** síntesis química. **b** síntesis biológica. Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

3.2.1.5. Espectroscopía UV-Vis Óxido de Grafeno funcionalizado con Nanopartículas de Cobre

El espectro UV-Vis de los nanohíbridos de GO-CuNP's por síntesis química y síntesis biológica representados en la (Figura 22-3. a) y (Figura 22-3. b) respectivamente, representa la

funcionalización del GO con las nanopartículas de cobre en donde observamos que el pico de máxima absorción del GO se reduce de 232 a 200[nm] y que el pico característico del cobre se oxida comprimiendo el pico máximo hacia el rango de (200-250)[nm], esto sucede ya que el cobre también presenta transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$, deduciendo así la formación de nanopartículas de cobre puro y nanopartículas de óxido de cobre (Jahan, Liu and Loh, 2013: pp. 5363-5372).

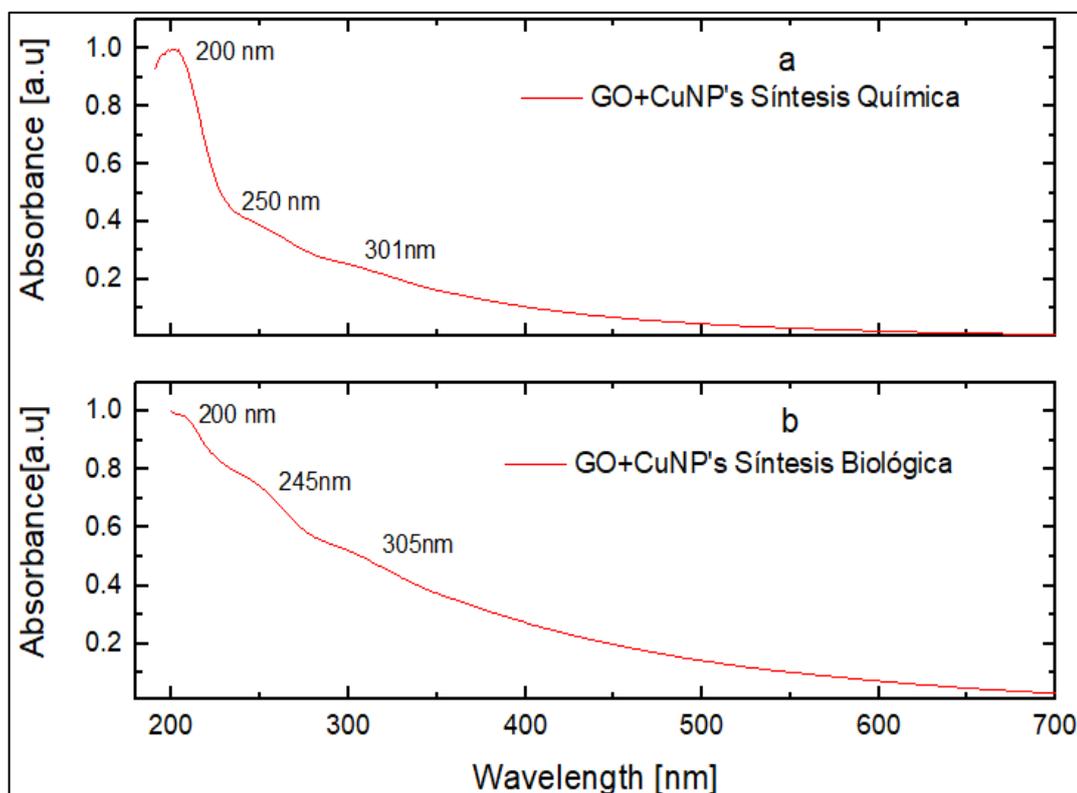


Figura 22-3: Espectro UV-Vis GO + CuNP's. **a** síntesis química. **b** síntesis biológica.
Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

3.2.2. Espectroscopía Transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopia infrarroja es una técnica la cuál es utilizada para medir todas las longitudes de onda al mismo tiempo además de poder dar una lectura precisa de los grupos funcionales presentes en una muestra determinada por la reacción que tenga una molécula al rayo de luz incidente que proviene del equipo a ser utilizado entre estos están torsión, estiramiento, entre otras. Además de que los datos obtenidos son traducidos por medio de operaciones matemáticas la cuál trasforma la señal del interferograma a un espectro IR totalmente entendible, además de que las principales ventajas de este espectro obtenido se caracterizan por precisión, alta resolución, sin dejar de lado la velocidad alta a la cual se trabaja.

3.2.2.1. Espectroscopía FTIR del Óxido de Grafeno

La banda presente a los 3290 cm^{-1} corresponde a los enlaces O - H de grupos hidroxilo presentes en el óxido ya que no es reducido, la banda de los 2832 cm^{-1} presenta los estiramientos C - H que poseen los átomos de carbono juntamente con los hidrógenos aun presentes en el óxido. La señal captada a la banda de los 2333 cm^{-1} es de la vibración de tensión del CO_2 , las bandas referentes a 1727 cm^{-1} y 1580 cm^{-1} representan de una forma muy específica los grupos carbonilos y sus estiramientos en los enlaces C = O, el pico en 1425 cm^{-1} representa el estiramiento de los enlaces C = C además de las dos bandas presentes de 1149 y 985 cm^{-1} da la existencia de torsión y estiramiento de los grupos funcionales C - O - C, el espectro obtenido es similar al obtenido por (Tene et al., 2020: pp. 4-7).

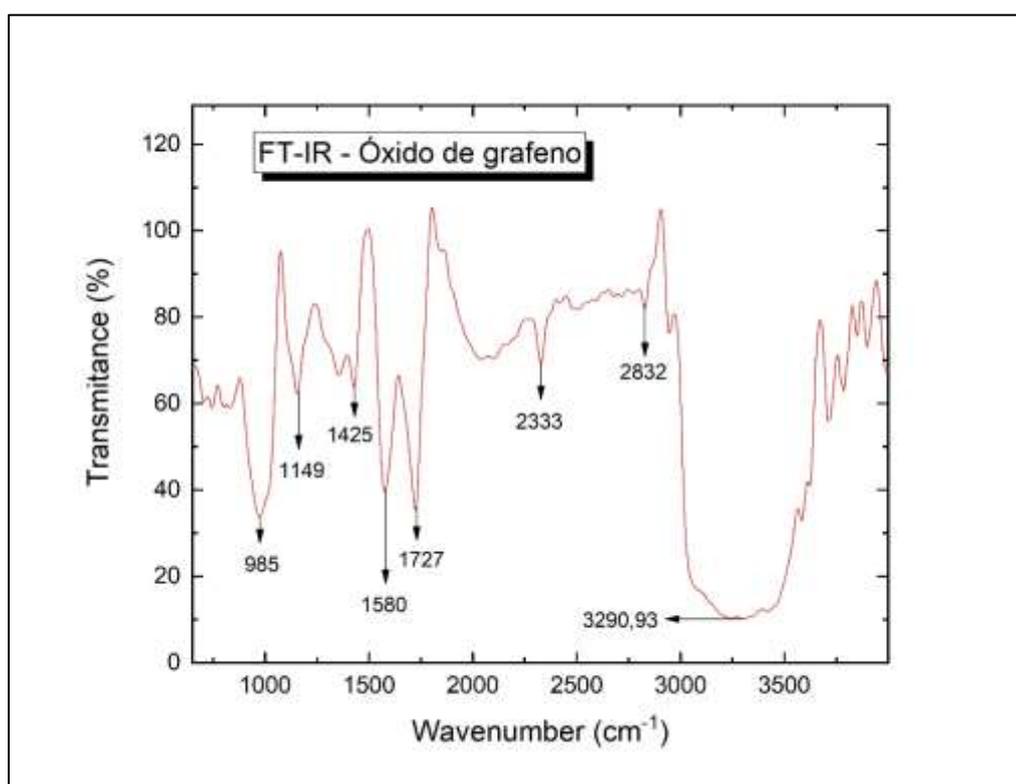


Figura 23-3: Espectroscopia infrarroja del GO.

Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

3.2.2.2. Espectroscopía FTIR de reductores químicos y biológicos para la reducción a Nanopartículas de Plata

Para la obtención de nanopartículas de plata por el método químico y biológico (véase en la Figura 24-3) se utilizó como agentes oxidantes al Citrato de sodio y a la *Callendula Officinalis* respectivamente, mediante la caracterización FTIR se logró visualizar el estiramiento O-H a los 3336 cm^{-1} , en la banda de 2815 cm^{-1} se presenta el grupo funcional $-\text{CH}_2$, además, la vibración

de tensión del -CO_2 se manifiesta en el rango 2324 cm^{-1} en ambas síntesis. La señal en la banda de 1589 cm^{-1} con la señal de 1297 cm^{-1} da a conocer la estabilidad de las nanopartículas del grupo -CO- , la banda mostrada en la síntesis química en 1023 cm^{-1} presentan los enlaces -C-C (El-Kemary et al., 2016: pp. 10795-10805).

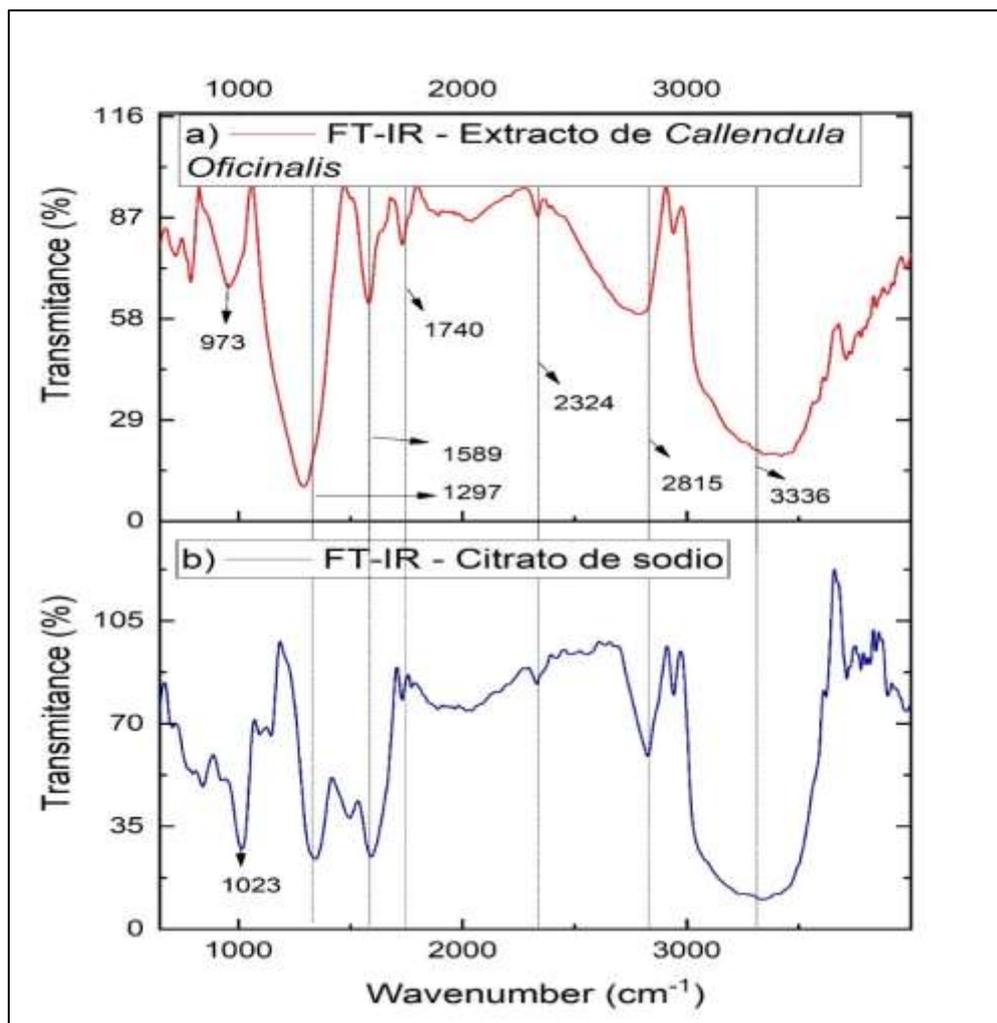


Figura 24-3: agentes reductores AgNP's. **a** síntesis biológica. **b** síntesis química.
Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

3.2.2.3. Espectroscopía FTIR de reductores químicos y biológicos para la reducción Nanopartículas de Cobre

La obtención de nanopartículas de cobre por el método químico se produjo por la presencia de ácido ascórbico que actuó como gente reductor, en cambio para la síntesis por el método biológico el agente reductor fue el Citrus limon, en la caracterización espectroscópica de FTIR el pico en el rango de $3000\text{ a }3500\text{ cm}^{-1}$ nos indica la presencia de grupos OH libres, las bandas en 2686 cm^{-1} y 2830 cm^{-1} en cada una de las síntesis representa el grupo CO_2 , además las bandas entre $1600\text{ a }1900\text{ cm}^{-1}$ dan a conocer el grupo funcional C=O y están presentes en ambos

espectros, el ácido ascórbico presente en el limón que fue utilizado para la síntesis biológica y además de que este es utilizado en su forma natural para su síntesis química que poseen C-C en su estructura y estos son representados en las bandas de 1326 cm^{-1} y en 1352 cm^{-1} , de una manera concreta el análisis espectral de los picos presentes dan a conocer los grupos funcionales que ayudan a la formación de iones de cobre que componen las nanopartículas, el espectro obtenido en nuestra investigación tiene similitudes al obtenido por (Issaabadi, Nasrollahzadeh y Sajadi, 2017: pp. 3584-3591).

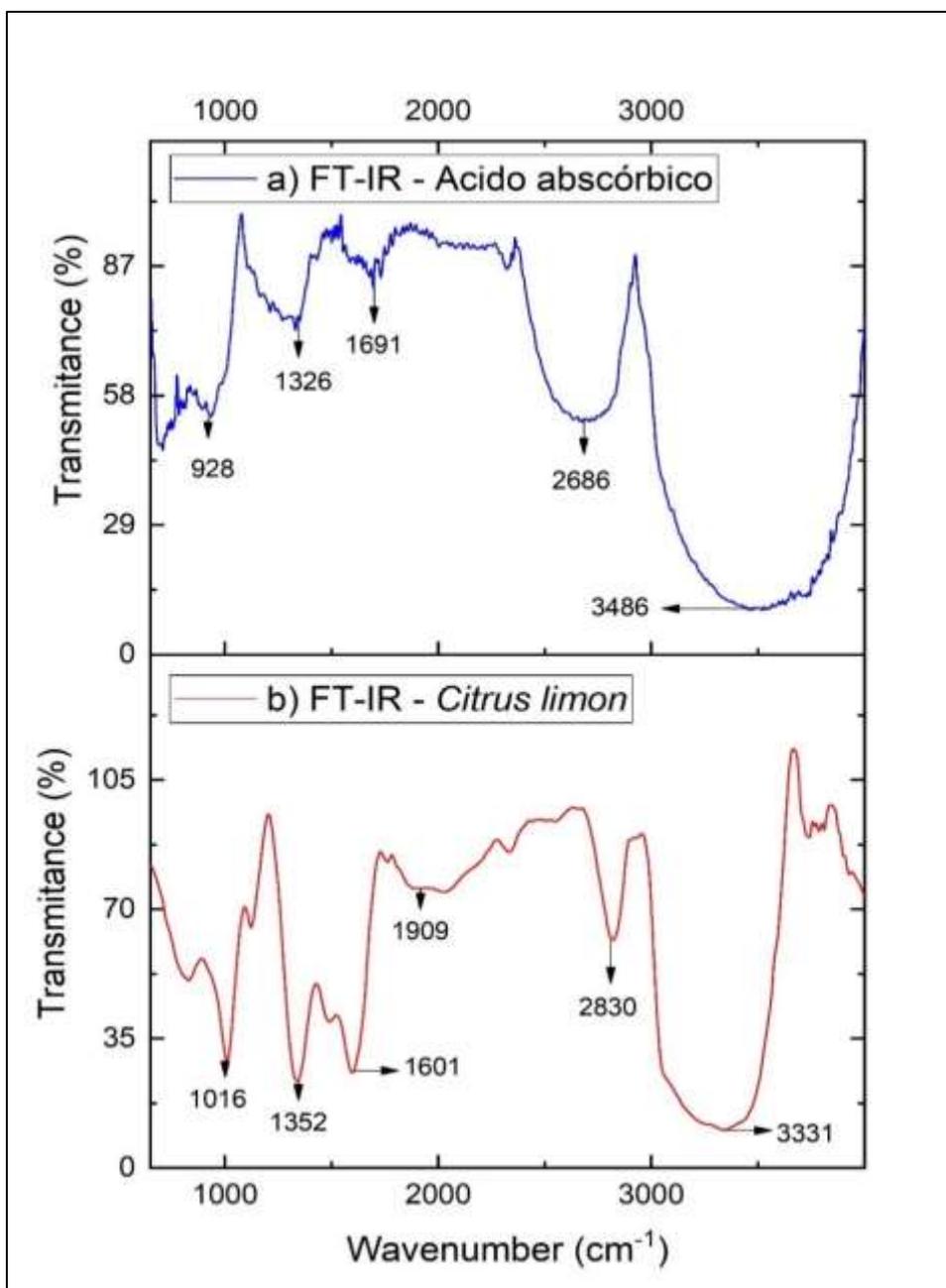


Figura 25-3: Agentes reductores CuNP's. **a)** síntesis química. **b)** síntesis biológica. Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

3.2.2.4. Espectroscopía FTIR de Óxido de Grafeno funcionalizado con Nanopartículas metálicas

El análisis de las bandas espectrales en el GO funcionalizado con las AgNP's y CuNP's es muy similar a los ya vistos anteriormente (figura 23-3)(figura 23-4)(figura 23-5) y con facilidad podemos indicar que a la banda aproximada de los 3330 cm^{-1} como ya es conocido tenemos los enlaces libres de OH, en los 2841 cm^{-1} los estiramientos de los C-H, La vibración de la tensión del CO_2 , 1729 cm^{-1} y 1548 cm^{-1} representan una vez más de una forma muy concreta los grupos carbonilos y sus respectivos estiramientos en los enlaces $\text{C}=\text{O}$, el enlace de estiramiento $\text{C}=\text{C}$ está mostrando un pico en 1431 cm^{-1} , los posteriores picos en números de onda inferiores dan a conocer a las torsiones de los enlaces C-C el espectro de este FT-IR es similar al obtenido por (Menazea, Abdelbadie y Ahmed, 2020: pp.9).

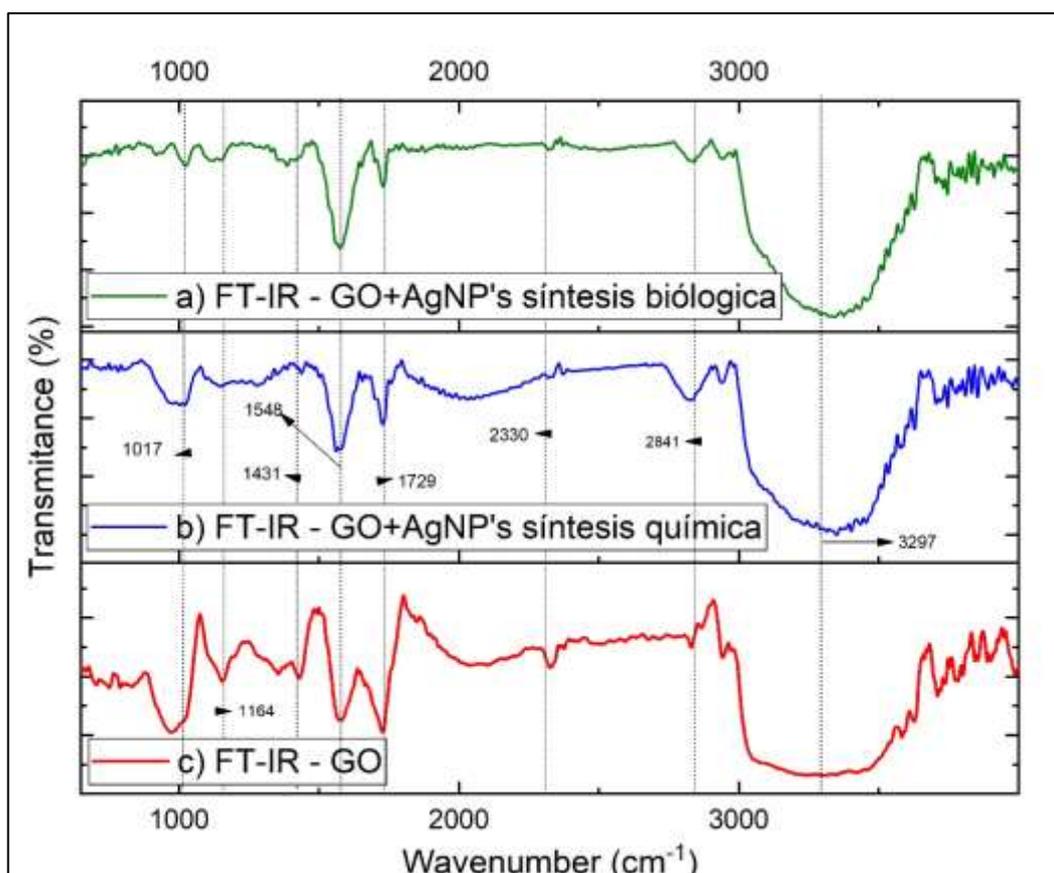


Figura 26-3: FTIR GO + AgNP's. **a)** síntesis biológica. **b)** síntesis química **c)** GO
Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

El FT-IR de las funcionalizaciones de las CuNP's con el GO tanto de síntesis químicas como biológicas muestran una similitud con el espectro del GO con la diferencia de que las bandas de 1000 a 1600 cm^{-1} disminuyen de una manera significativa por la presencia de las nanopartículas

adheridas en el GO y además de también posee una poca presencia de los reductores utilizados para la síntesis de las nanopartículas (Figura 27-3).

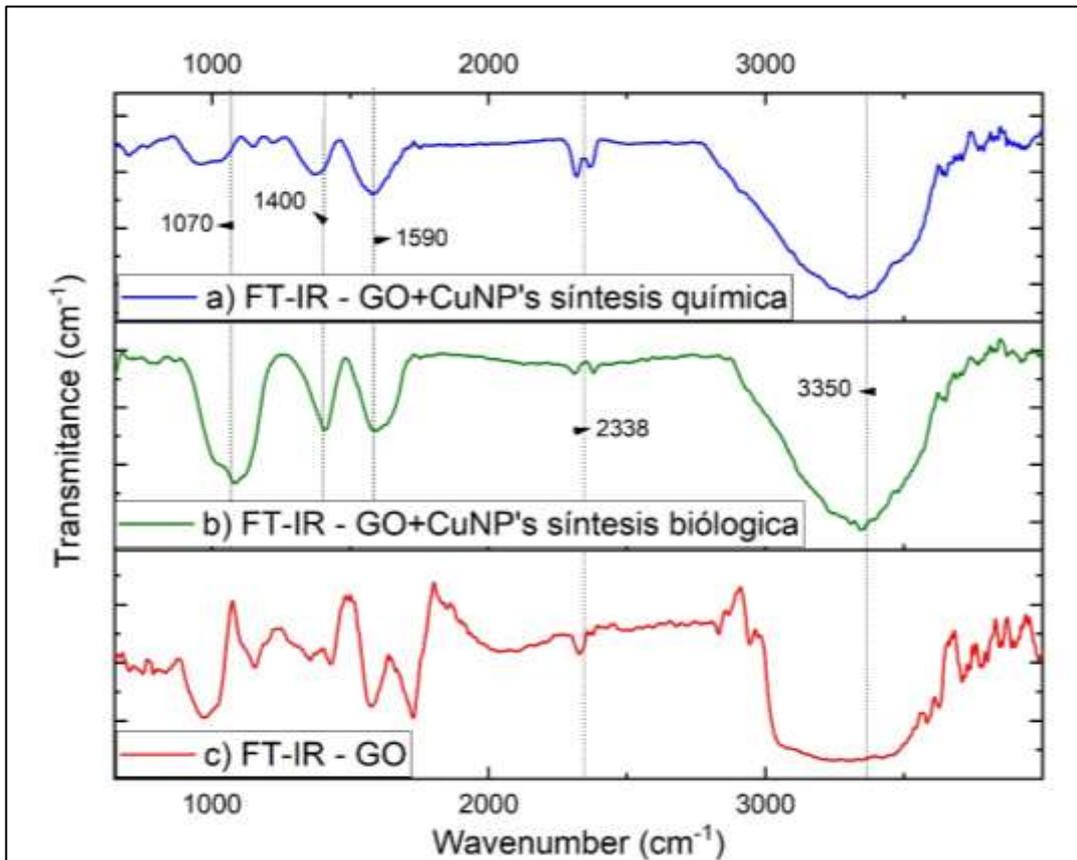


Figura 27-3. FTIR GO + CuNP's. **a)** síntesis química. **b)** síntesis biológica **c)** GO
Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

3.2.3. Espectroscopía de Rayos X por Dispersión de Energía (EDS)

La espectroscopía de rayos X de dispersión de energía EDS es una técnica analítica que permite la caracterización química elemental de materiales. Una muestra excitada por un haz de electrones de un microscopio electrónico disipa una parte de energía absorbida liberando un electrón de las capas del núcleo. Un electrón que se encuentre en una capa exterior procede a tomar el lugar o hueco liberando cierta diferencia de energía en forma de un rayo X, lo que permite un análisis de composición de la muestra.

3.2.3.1. Espectro EDS de las Nanopartículas de Plata

El espectro EDS de las nanopartículas de plata producidas por síntesis química (Figura 28-3.a) y síntesis biológica (Figura 28-3.b) muestran la presencia de una señal característica de nanopartículas de plata metálica a los 3keV (Govindappa et al., 2018: pp. 400-408), además se en la

(Tabla 10-3) se presenta la composición química en porcentaje de masa de las nanopartículas obtenidas.

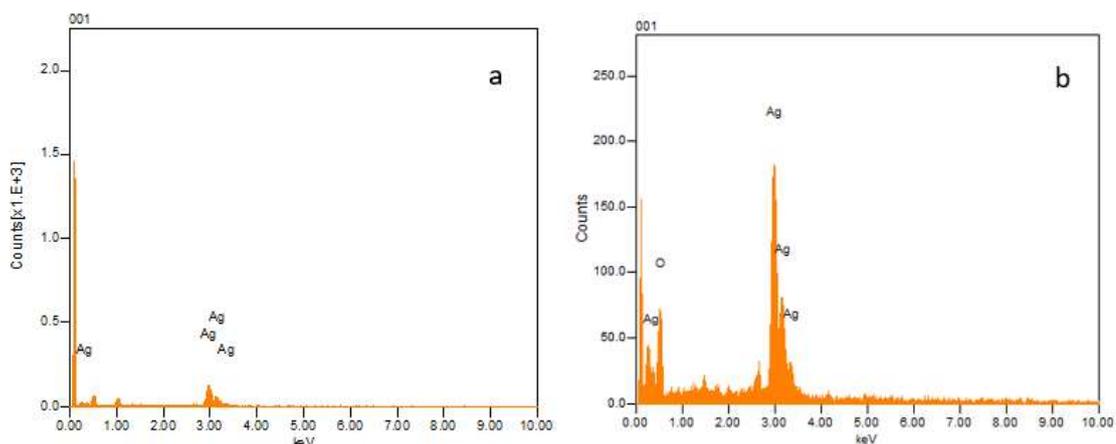


Figura 28-3: Espectro EDS de las nanopartículas de plata. **a** ruta química. **b** ruta biológica. Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

Tabla 10-3: Composición Química de AgNP's

Composición Química Elemental de Nanopartículas de Plata		
Síntesis Química		
Elemento	% en masa	% atómico
Ag	0.68	100
Total	0.68	100
Síntesis Biológica		
Ag	1.2	66.25
O	0.35	33.75
Total	1.55	100

Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

Observando el porcentaje en masa de las nanopartículas de plata nos damos cuenta de que existe una mayor producción utilizando la síntesis biológica, esto se debe a que *Caléndula Officinalis* juega un papel importante como agente oxidante debido a la presencia de grupos funcionales que mejoran la reducción de la Ag, a la vez estudios muestran que la concentración del sustrato puede cambiar tanto la morfología como la geometría de las nanopartículas.

3.2.3.2. Espectro EDS de las Nanopartículas de Cobre

En la Figura 29-3 presentamos el espectro de dispersión de energía correspondiente a las nanopartículas de cobre, la (Figura 29-3.a) representa las nanopartículas de cobre obtenidas por síntesis química y en la (Figura 29-3. b) se presenta a las nanopartículas obtenidas por la síntesis

biológica, así como también se da a conocer la composición en porcentaje de masa y porcentaje atómico de las nanopartículas obtenidas por los dos procesos de síntesis véase en la Tabla 11-3. El espectro de las nanopartículas de Cu confirma la existencia de Cobre, Carbono y Oxígeno, lo que claramente nos indica la formación tanto de Cu como Cu₂O. El pico alrededor de los 0.5[keV] pertenece a la energía del enlace del oxígeno, mientras el pico en los 0.27[keV] corresponde al enlace del carbono, finalmente los picos localizados en las energías 0.85, 0.94, 8.04 y 8.94 [keV] corresponden al cobre. El espectro EDS es similar al reportado por (Khan *et al.*, 2016: pp. 21-26) .

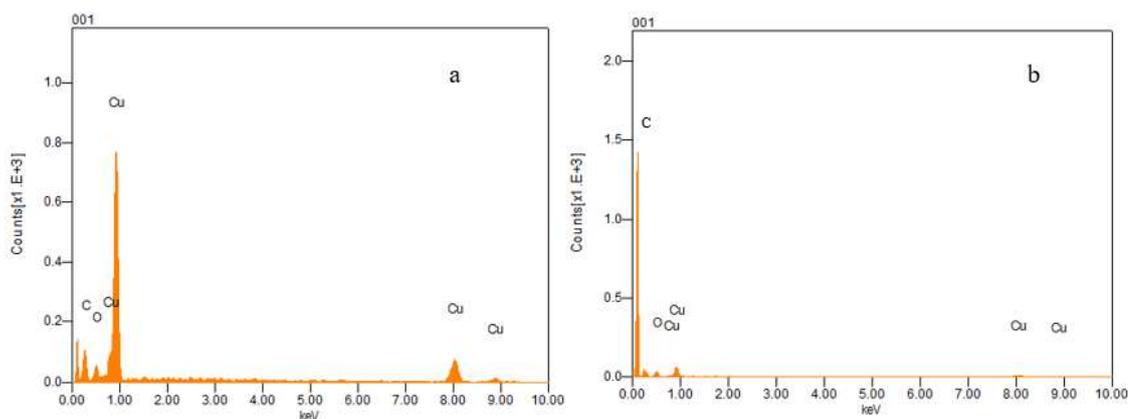


Figura 29-3: Espectro EDS de nanopartículas de cobre. **a** ruta química. **b** ruta biológica.
Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

Tabla 11-3: Composición Química de CuNP's

Composición Química Elemental de Nanopartículas de Cobre		
Síntesis Química		
Elemento	% en masa	% atómico
Cu	2.43	37.72
C	0.67	54.94
O	0.12	7.34
Total	3.22	100
Síntesis Biológica		
Cu	0.25	55.24
C	0.12	28.31
O	0.05	16.45
Total	0.42	100

Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

El porcentaje en masa muestra una mayor cantidad de cobre metálico mediante la reducción química, con lo que podemos asumir que el agente oxidante de la síntesis biológica *citrus limon* es muy bajo a comparación de ácido ascórbico que se utiliza en la síntesis química. (Shrestha and Bhattarai, 2016: pp. 9-14).

3.2.3.3. Espectro EDS de Óxido de Grafeno funcionalizado con Nanopartículas de Plata

El espectro EDS del nanohíbrido de GO + AgNP's de nanopartículas obtenidas mediante síntesis biológica y química, en la Figura 30-3 observamos que el nanohíbrido obtenido mediante reducción química y biológica presenta carbono, el cuál es el elemento base de la estructura grafítica, el oxígeno aparece ya que el material fue oxidado al convertirse en Óxido de Grafeno, finalmente tenemos a la plata metálica a los 3[keV].

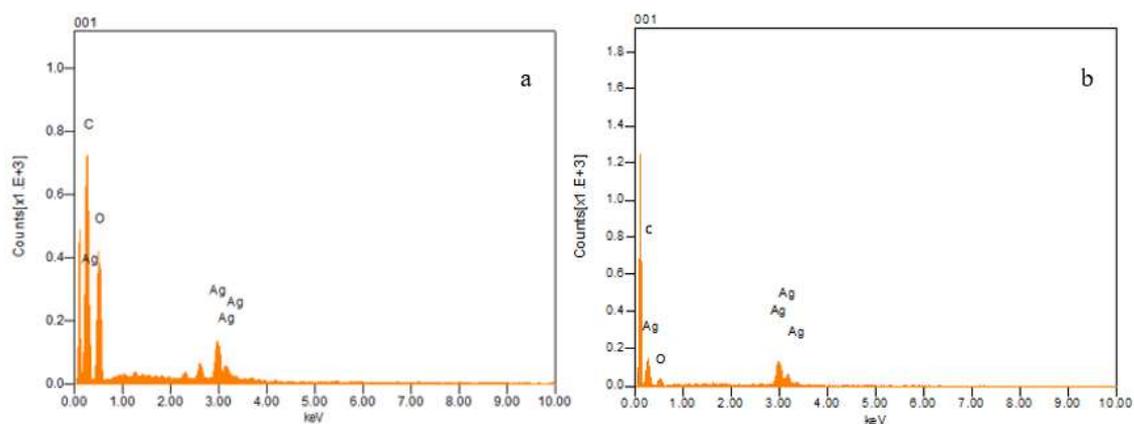


Figura 30-3: Espectro EDS de GO + AgNP's. **a** síntesis biológica. **b** síntesis química.
Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

Tabla 12-3: Composición Química de GO + AgNP's

Composición Química Elemental GO + AgNP's		
Síntesis Biológica		
Elemento	% en masa	% atómico
Ag	1.2	28.3
C	2.13	50.23
O	2.36	21.47
Total	5.69	100
Síntesis Química		
Ag	0.68	2.60
C	2.31	53.23
O	2.36	44.18
Total	5.35	100

Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021

En la Tabla 12-3 se observa la composición química elemental de las nanopartículas de plata funcionalizadas con el óxido de grafeno y nuevamente se nota un incremento en el porcentaje de masa de la síntesis biológica ante el de la síntesis química. Podemos deducir que el método eco-friendly además de ser amigable con el ambiente proporciona mayor estabilidad y producción de las nanopartículas.

3.2.3.4. Espectro EDS de Óxido de Grafeno funcionalizado con Nanopartículas de Cobre

El nanohíbrido de GO funcionalizado con CuNP's se presenta en la Figura 31-3 muestra picos alrededor de los 0.5 [keV] pertenecientes a la energía del enlace de carbono, también encontramos picos en torno a 1.0 [keV] correspondientes al cobre, por último, tenemos un pico aproximadamente en 0.3[keV] perteneciente al oxígeno.

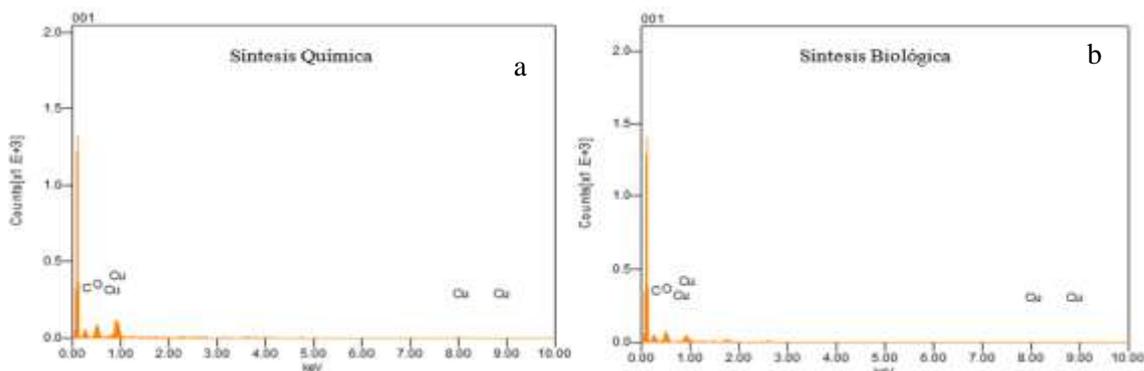


Figura 31-3: Espectro EDS de GO + CuNP's. **a** síntesis química. **b** síntesis biológica.
Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

Tabla 13-3: Composición Química de GO + CuNP's

Composición Química Elemental GO + CuNP's		
Síntesis Biológica		
Elemento	% en masa	% atómico
Cu	0.24	14.25
C	0.22	83.23
O	0.23	2.52
Total	0.69	100
Síntesis Química		
Cu	0.55	17.3
C	0.29	48.4
O	0.27	34.3
Total	1.11	100

Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

El análisis químico elemental de las nanopartículas de cobre se encuentra en la Tabla 13-3. En la que podemos observar un incremento del 23% de nanopartículas de cobre por el método químico como mencionamos anteriormente el agente oxidante de esta síntesis es mucho mejor que el de la síntesis biológica.

3.2.4. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

La Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) permite obtener imágenes de superficie de los materiales en escala nanométrica, además, nos da a conocer la morfología de una muestra proporcionándonos información cuantitativa como la distribución de tamaños o rugosidad.

3.2.4.1. Microscopía AFM del Óxido de Grafeno

En la Figura 32-3 se aprecia las láminas de Óxido de Grafeno tomada por microscopía AFM, se obtuvieron los datos de espesor de 20 láminas las cuales presentaron un espesor máximo de 1.6[nm] con una frecuencia del 40 %, véase en el histograma de la Figura 33-3

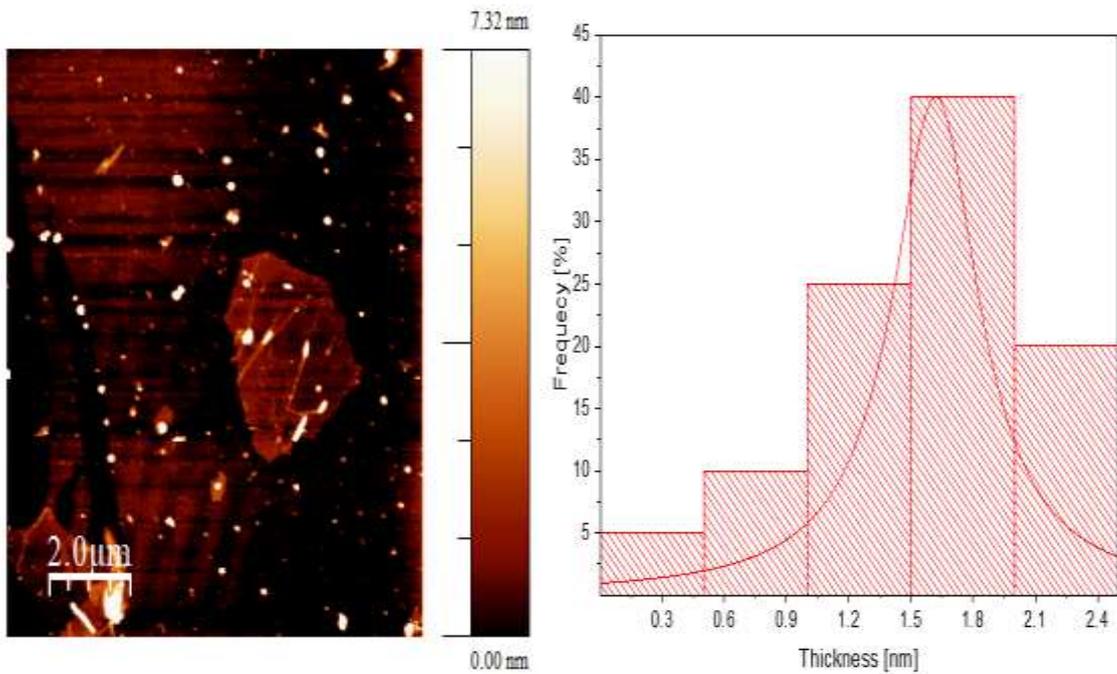


Figura 32-3: Imágenes AFM del GO a 2.0μm.
Realizado por: Barba. M & Pachacama. J,2021.

Figura 33-3: Dispersión de Tamaño GO.
Realizado por: Barba. M & Pachacama. J,2021.

3.2.4.2. Microscopía AFM de las Nanopartículas de Plata por síntesis química y síntesis biológica

Las nanopartículas de plata sintetizadas por ruta química y ruta biológica se representan en las Figuras 34-3 y 35-3 respectivamente, además se presenta los histogramas de ambas síntesis en los cuales se puede observar que para la síntesis química el diámetro de las nanopartículas oscila entre los 35 y 40 [nm] con una frecuencia del 60 % (Figura 36-3), mientras que las nanopartículas mediante ruta biológica presentan un diámetro máximo entre los 40 y 60 [nm] con una frecuencia del 42% (Figura 37-3).

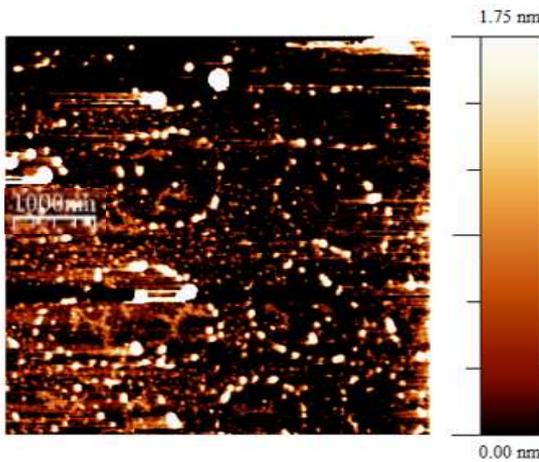


Figura 34-3: Imágenes AFM de AgNP's síntesis química a escala 1000[nm].

Realizado por: Barba. M, Pachacama. J,2021.

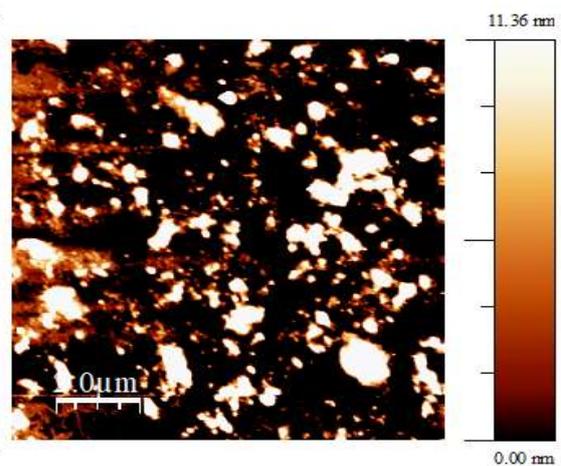


Figura 35-3: Imágenes AFM de AgNP's síntesis biológica a escala 2.0[μm].

Realizado por: Barba. M, Pachacama. J,2021.

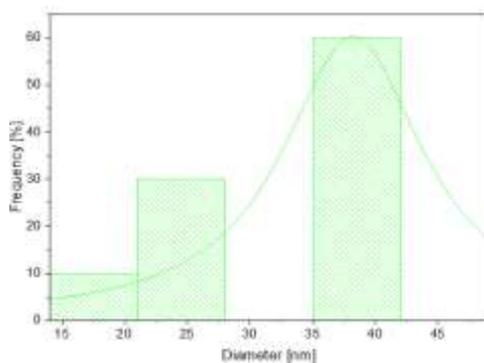


Figura 36-3: Histograma del tamaño de las nanopartículas de plata por ruta química.

Realizado por: Barba. M & Pachacama. J,2021.

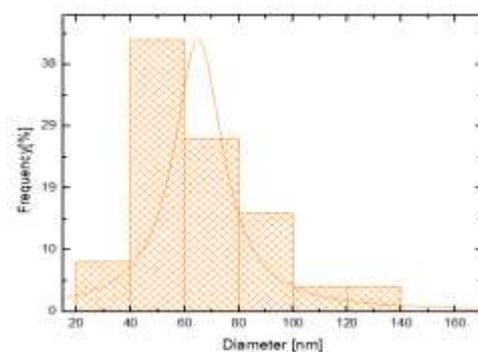


Figura 37-3: Histograma del tamaño de las nanopartículas de plata por ruta biológica.

Realizado por: Barba. M & Pachacama. J,2021.

3.2.4.3. Microscopía AFM de las Nanopartículas de Cobre por síntesis química y síntesis biológica

Las nanopartículas de cobre por síntesis química y biológica fueron caracterizadas mediante Microscopía de Fuerza Atómica (Figura 38-3) y (Figura 39-3) las primeras presentan un espesor promedio de 70[nm] en una frecuencia del 36% obtenidas de 50 nanopartículas de cobre. El diámetro de las CuNP's obtenidas mediante síntesis biológica se muestran en los 60[nm] con un porcentaje de frecuencia del 40%.

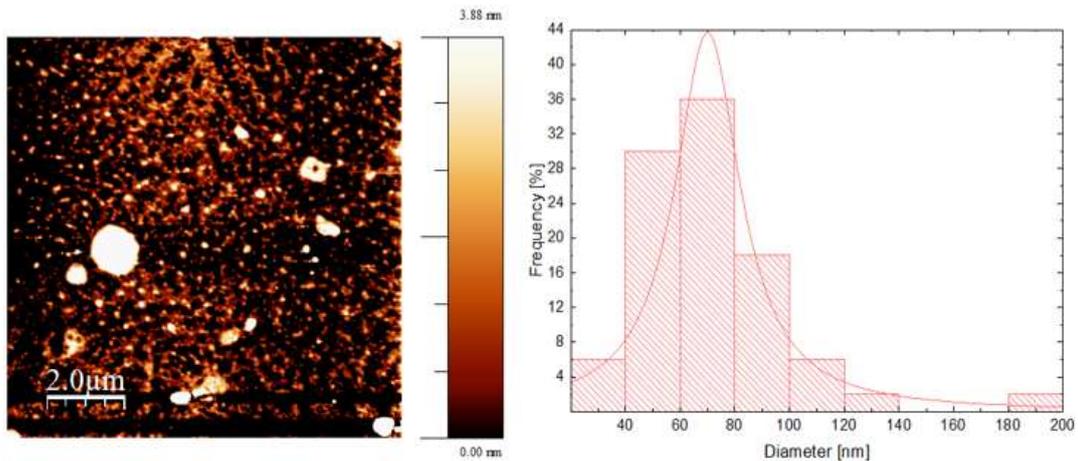


Figura 38-3: Microscopía AFM a 2.0[μm] e Histograma de CuNP's por ruta química
Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

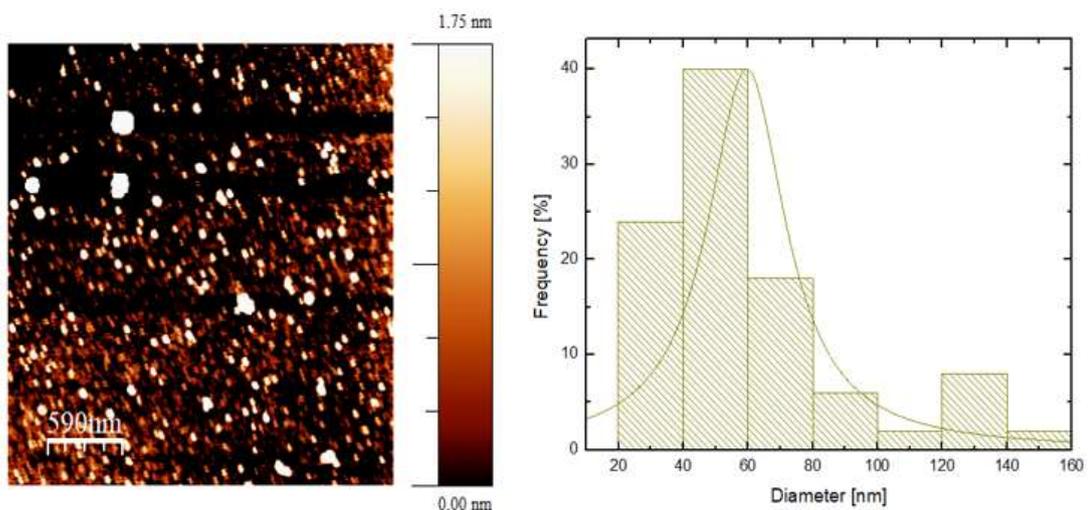


Figura 39-3: Microscopía AFM a 599[nm] e Histograma de CuNP's por ruta biológica
Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

3.2.4.4. Microscopía AFM del Óxido de Grafeno con AgNP's

En la Figura 40-3 se muestra una imagen AFM de diferentes láminas de Óxido de Grafeno con incrustaciones de pequeñas nanopartículas de plata las cuales están evidenciadas en círculos.

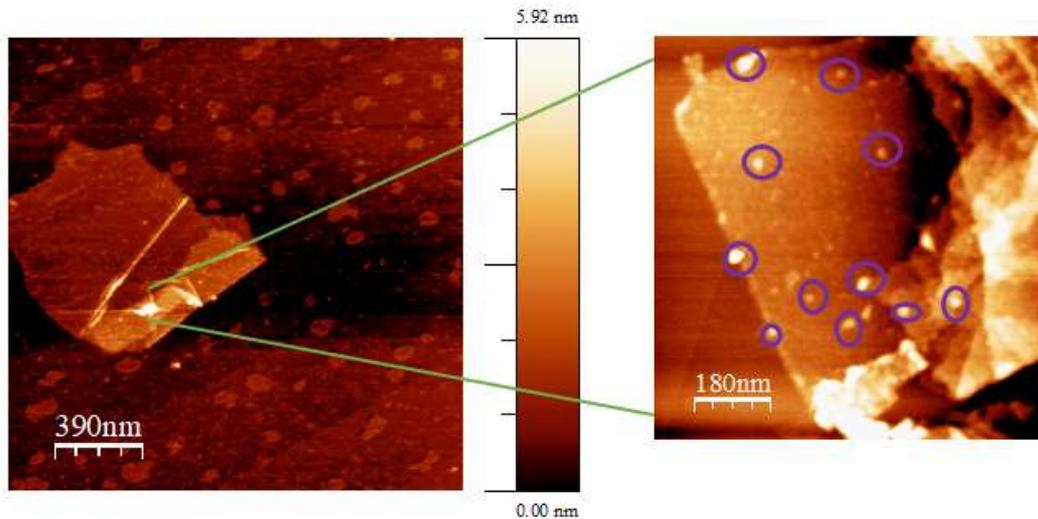


Figura 40-3: Microscopía AFM a 390[nm] con incremento a 180[nm] de GO + AgNP's
Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

3.2.5. Microscopía AFM del Óxido de Grafeno con CuNP's

En la Figura 41-3 se presenta mediante círculo la adherencia de pequeñas nanopartículas de cobre sobre las láminas de GO.

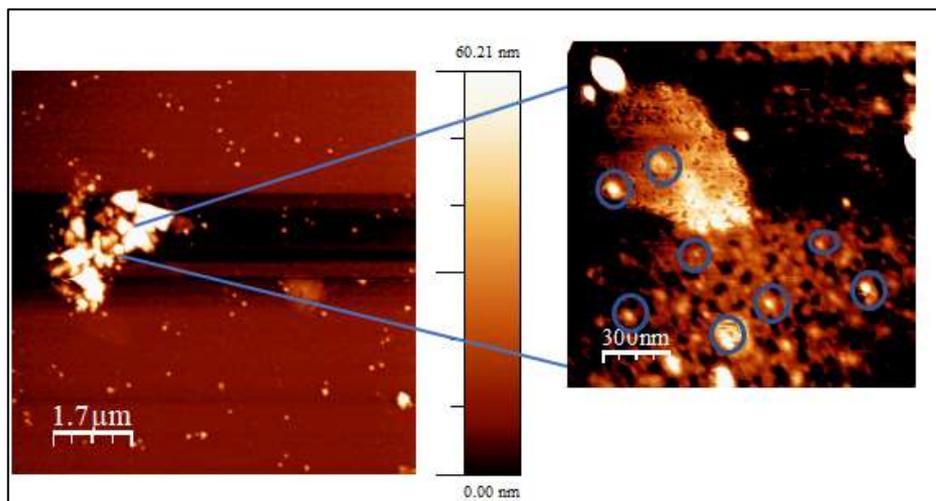


Figura 41-3: Microscopía AFM a 1.7[µm] y aumento a 300[nm] del nanohíbrido GO + CuNP's
Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

3.2.5. Espectroscopía Raman

3.2.5.1. Espectro Raman del Óxido de Grafeno

El pico presentado en la banda D a un valor de 1348 cm^{-1} muestra la aspiración de fonones de punto k de simetría. Mientras que el pico G se muestra un poco hacia la derecha a un valor de 1576 cm^{-1} . Los picos D y D' están relacionados con el cambio de la hibridación sp^2 a sp^3 por la oxidación del grafito (Tene et al., 2020: pp. 7).

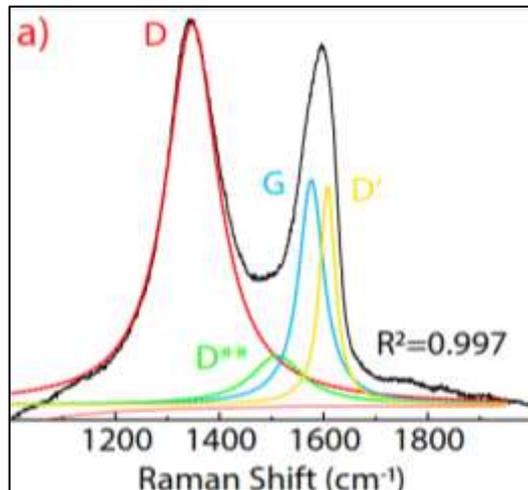


Figura 42-3: Espectroscopía Raman del GO.
Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

3.2.5.2. Espectro Raman de Óxido de Grafeno funcionalizado con Nanopartículas de Plata

El espectro Raman del GO funcionalizado tiene similitud con el espectro del GO sin funcionalizar principalmente en los picos D y G observándose valores similares. Además, el espectro Raman del grafito muestra una curva muy fina al no estar aún oxidado por lo tanto carece de la presencia de átomos de oxígeno que si están presentes en el GO ya oxidado y exfoliado. Ciertamente en el espectro raman del GO funcionalizado prevalece la curva obtenida en la figura 42-3 ya que al igual que la espectroscopia IR este presenta los grupos funcionales que contiene nuestra muestra y en este caso el GO presenta los enlaces C-C y no puede reconocer los enlaces de los iones de plata con los carbonos presentes en el GO.

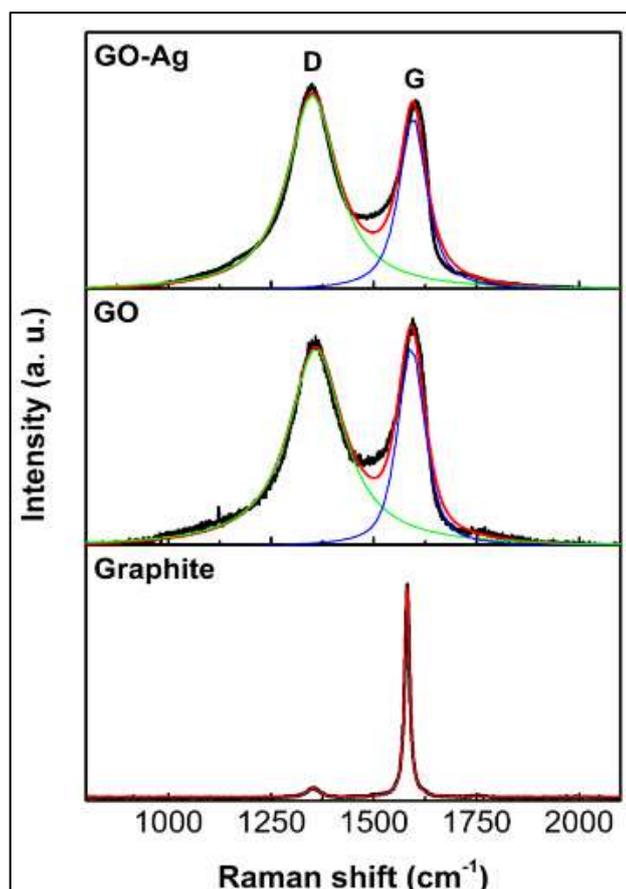


Figura 43-3: Espectroscopia Raman de GO+AgNP's.
Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

3.2.5.3. Espectro Raman de Óxido de Grafeno funcionalizado con Nanopartículas de Cobre

Los picos D y G del espectro del GO funcionalizado con CuNP's tiene similitud a los espectros analizados en las figuras anteriores (figura 43-2) (figura 43-3), con el ligero cambio en que la intensidad del espectro GO+CuNP's es levemente mayor en las bandas características analizadas antes mencionadas, de la misma manera este espectro muestra los grupos funcionales presentes en el GO sin presentar un cambio drástico en los grupos funcionales que lo componen.

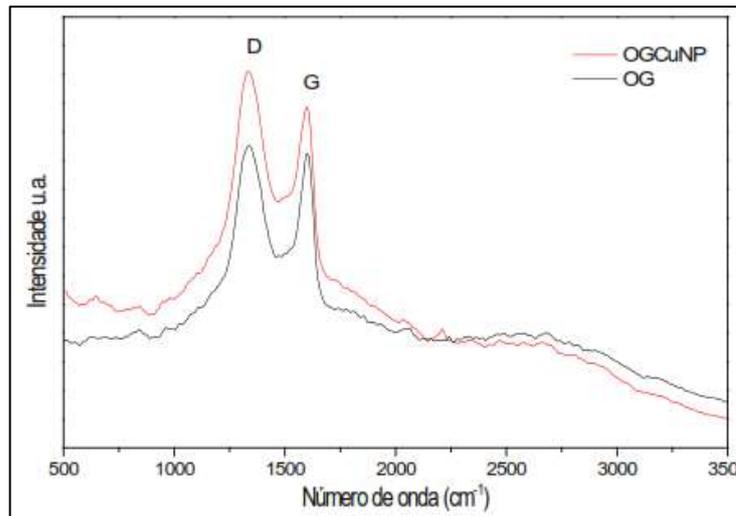


Figura 44-3: Espectroscopia Raman de GO+CuNP's.
Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

3.2.6. Microscopía de Barrido Electrónico (SEM)

La Microscopía de Barrido Electrónico nos da a conocer la morfología externa de las muestras, ya que utiliza un haz de electrones con alta energía generando señales que interactúan con la superficie de la muestra, estas señales electrón-muestra revelan información sobre textura, composición, y estructura cristalina (Renau-piqueras and Faura, 1965: pp. 9-14).

3.2.6.1. Microscopía SEM del Óxido de Grafeno

En la Figura 45-3 se muestra la microscopía de las láminas de Óxido de Grafeno a 50 [μm] Figura 45-3. a) en la que se observa láminas grandes del Óxido de Grafeno y 1.0 [μm] Figura 45.3.b) observamos capas superpuestas de nuestro material.

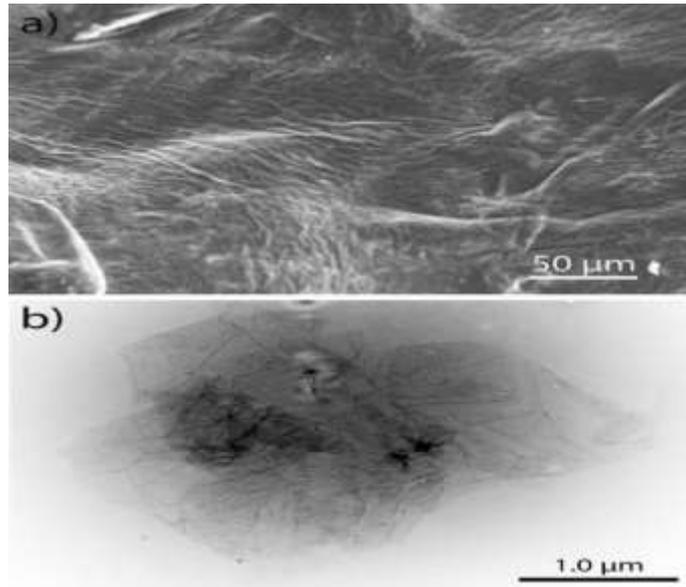


Figura 45-3: SEM del Óxido de Grafeno. **a)** escala 50[μm]. **b)** escala 1.0[μm]

Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

3.2.6.2. Microscopía SEM del Óxido de Grafeno funcionalizado con Nanopartículas de Plata

En la microscopía SEM se puede evidenciar en círculos la incrustación de las nanopartículas de plata por síntesis química sobre las láminas del Óxido de Grafeno en una escala de 10[μm], véase en la Figura 46-3, en la Figura 47-3 en cambio los círculos demuestran la adherencia de las nanopartículas de plata por ruta biológica a una escala de 200[μm] sobre las láminas del GO.

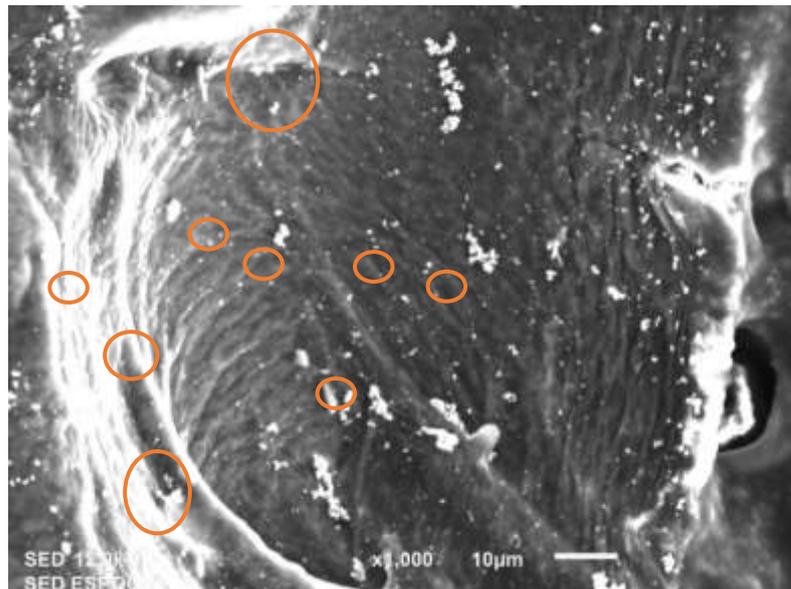


Figura 46-3: SEM de GO + AgNP's ruta química a 10[μm].

Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

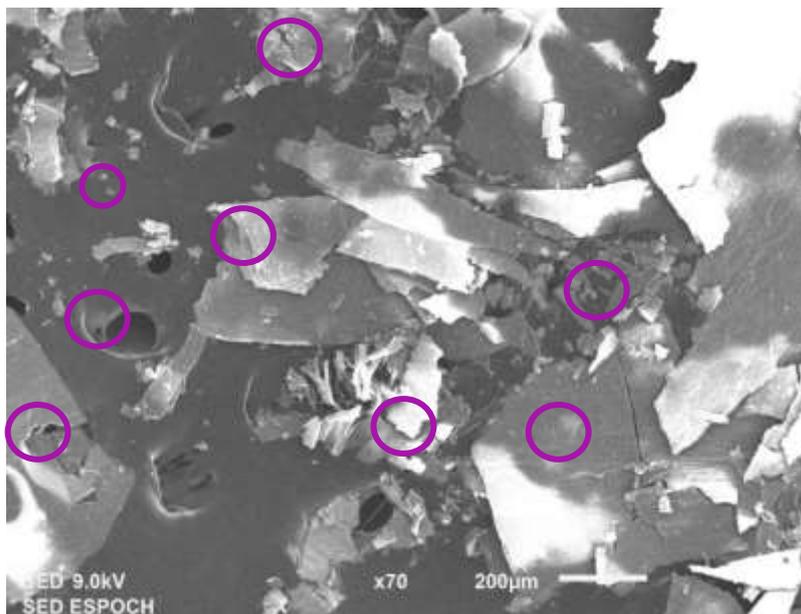


Figura 47-3: SEM de GO +AgNP's ruta biológica a 200[μm].
Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

3.2.6.3. Microscopía SEM del Óxido de Grafeno funcionalizado con Nanopartículas de Cobre

En la Figura 48-3 se muestra una distribución de las nanopartículas de cobre sintetizadas por ruta química sobre las láminas de Óxido de Grafeno, en esta imagen podemos observar que la producción de nanopartículas es mayor, mientras que en la Figura 49-3 se observa una menor cantidad de CuNP's incrustadas en las láminas de GO, esto se debe a la ruta de síntesis de las nanopartículas. Las dos imágenes están en una escala de 10[μm].

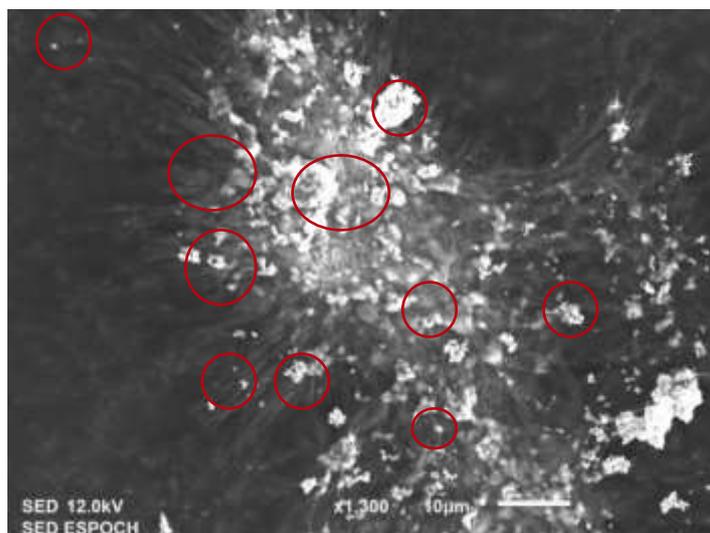


Figura 48-3: SEM de GO +CuNP's ruta química a 10[μm].
Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

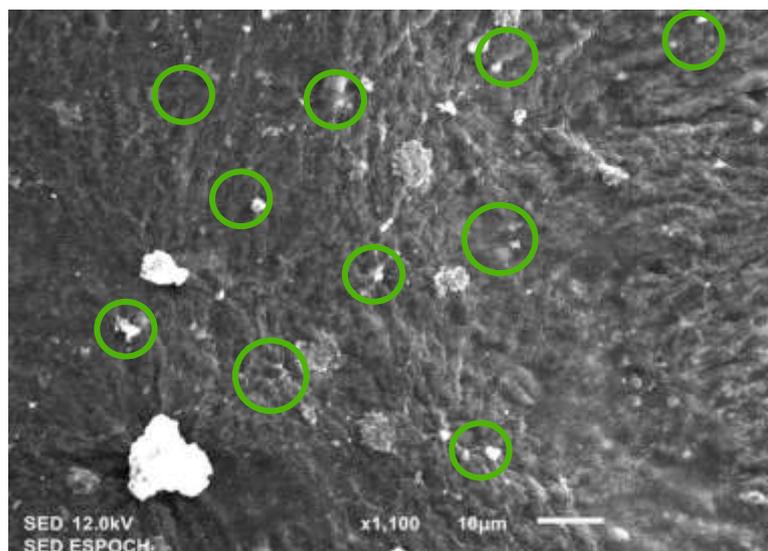


Figura 49-3: SEM de GO + Cu NP's ruta biológica a10[μm]
Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

3.3. Análisis antibacteriano

3.3.1. Concentración inhibitoria mínima

CMI es un método cualitativo que se define como la concentración mínima de antibiótico que en un tiempo determinado es capaz de inhibir el crecimiento in vitro de una cepa bacteriana en condiciones normalizadas. La CIM puede determinarse mediante micro y macro dilución ya sea en caldo o en agar, así como también un método cualitativo utilizando la técnica de disco difusión en la que un microorganismo puede clasificarse de una manera sencilla entre resistente o sensible (Taroco, Seija y Vignoli, 2008: pp. 663-671).

3.3.1.1 Concentración inhibitoria mínima en Gram Positivo.

Para el análisis de inhibición de *Staphylococcus aureus* se utilizó un total de 8 cajas Petri que contenían Agar Mueller Hinton, cada caja contenía 6 discos de 5mm, en 4 de estos discos se colocó 20 μL del nanohíbrido a diferentes concentraciones (32, 62.5, 125, 250) [$\mu\text{g}/\text{mL}$] de manera aleatoria, 1 disco fue de control en el que se depositó 20 μL de agua destilada y estilizada y en el último disco fue ocupado con 20 μL óxido de grafeno. Para medir la CMI se utilizó el método de antibiograma y posteriormente se calculó el diámetro del halo a las 24 horas en *Staphylococcus aureus* mostrado en la Tabla 16-3, además el diámetro a la 48 horas presentado en la Tabla 17-3. Para el experimento CIM en cada caja se enumeraron 4 discos del 1 al 16 aleatoriamente, los datos de cada número se encuentran expresados en la Tabla 14-3.

Tabla 14-3: Concentración y tipo de nanohíbrido

Nomenclatura de Discos	Concentración [$\mu\text{g/mL}$]	Tipo de Nanohíbrido
C	0	CONTROL
1	62.5	GO+ CuNP's-B
2	62.5	GO+ AgNP's-B
3	125	GO+ CuNP's-B
4	250	GO+ AgNP's-B
5	125	GO+ CuNP's-Q
6	125	GO+ AgNP's-B
7	125	GO+ AgNP's-Q
8	250	GO+ CuNP's-B
9	32	GO+ CuNP's-B
10	32	GO+ AgNP's-Q
11	250	GO+ CuNP's-Q
12	32	GO+ AgNP's-B
13	250	GO+ AgNP's-Q
14	32	GO+ CuNP's-Q
15	62.5	GO+ CuNP's-Q
16	62.5	GO+ AgNP's-Q
GO	580	Óxido de Grafeno

B= síntesis biológica

Q= síntesis química

Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

En la tabla 15-3 se da a conocer la distribución de los nanohíbridos en las diferentes cajas, como también los números de discos que presentaron inhibición y los que no presentaron.

Tabla 15-3: Presencia de inhibición y resistencia de los discos *S.aureus*

Número de caja	Número de discos que constituyen la caja	Discos que presentan inhibición	Discos que no presentan inhibición
1	5,6,13, 14 y GO	5,6 y GO	13 y 14
2	1,4,7,9 y GO	7	1,4,9 y GO
3	1,3,10,11 y GO	11	1,3,10 y GO
4	2,8,10,16 y GO	2,10 y GO	8 y 16
5	5,6,9 ,14 y GO	6 y GO	5,9 y 14
6	3,8,12,15 y GO	12 y GO	3,8 y 15
7	2,4,7, 12 y GO	2,4,7,12 y GO	
8	11,13,15,16 y GO	11 y GO	13,15 y 16

Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

De manera general podemos observar que los nanohíbridos (GO+ AgNP's B, AgNP's Q) a 32[ug/mL], GO+ CuNP's B a 62.5[ug/mL], (GO+ AgNP's B, GO+ AgNP's Q) a 125[ug/mL], (GO+ CuNP's B y GO+ AgNP's B) a 250 [ug/mL] y el nanomaterial GO a 580 [ug/mL] presentan inhibición bacteriana, es decir que *S. aureus* se muestra sensible ante estos nanohíbridos, por otra parte observamos que las nanopartículas de plata y cobre funcionalizadas con el óxido de grafeno presentan una inhibición bacteriana, comprobando que estos nanomateriales mejoran las propiedades bactericidas. La actividad antimicrobiana de los compuestos híbridos puede ser explicado en su gran mayoría por la forma de las nanopartículas, la estructura atómica de la superficie de las partículas afecta en la interacción con las células bacterianas dando lugar a una eficacia antimicrobiana (Whitehead et al., 2017: pp. 182-190).

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram Positiva que presenta una membrana celular compuesta por una gran cantidad de peptidoglicano, conocida como una bacteria resistente a diversos antibióticos, en esta experimentación muestra que la bacteria es susceptible a los materiales usados, ya que, al combinar la forma de los compuestos y las estructuras cristalinas pueden influir en el mecanismo de internalización bacteriana de la pared celular (Sirelkhathim et al., 2015: pp. 182-190).

Tabla 16-3: CMI Cuantitativo Gram Positivo *S. aureus* a las 24 horas. Diámetro de disco 5mm

Concentración	Tipo de nanohíbrido	Medida del halo (disco-inhibición)	Incertidumbre medida halo	Incertidumbre porcentual	Medida del halo (disco-inhibición)	Incertidumbre medida halo	Incertidumbre porcentual	Valor medio	Desviación estándar medida del halo
ug/mL		Mm	mm	%	mm	mm	%	mm	mm
		24 horas repetición 1			24 horas repetición 2				
62.5	GO+ CuNP's-B	0	0.0	0.00	0	0.0	0.00	0.00	0.00
62.5	GO+ AgNP's-B	7	0.5	7.14	5	0.5	10.00	6.00	1.41
125	GO+ CuNP's-B	0	0.0	0.00	0	0.5	0.00	0.00	0.00
250	GO+ AgNP's-B	0	0.0	0.00	2	0.5	25.00	1.00	1.41
125	GO+ CuNP's-Q	0	0.0	0.00	1	0.5	50.00	0.50	0.71
125	GO+ AgNP's-B	7	0.5	7.14	4	0.5	12.5	5.50	2.12
125	GO+ AgNP's-Q	6	0.5	8.33	0	0.0	0.00	3.00	4.24
250	GO+ CuNP's-B	0	0.0	0.00	0	0.0	0.00	0.00	0.00
32	GO+ CuNP's-B	0	0.0	0.00	1	0.5	50.00	0.50	0.71
32	GO+ AgNP's-Q	1	0.5	50.00	1	0.5	50.00	1.00	0.00
250	GO+ CuNP's-Q	1	0.5	50.00	1	0.5	50.00	1.00	0.00
32	GO+ AgNP's-B	5	0.5	10.00	6	0.5	8.33	5.50	0.71
250	GO+ AgNP's-Q	0	0.0	0.00	0	0.0	0.00	0.00	0.00
32	GO+ CuNP's-Q	0	0.0	0.00	0	0.0	0.00	0.00	0.00
62.5	GO+ CuNP's-Q	0	0.0	0.00	0	0.0	0.00	0.00	0.00
62.5	GO+ AgNP's-Q	0	0.0	0.00	0	0.0	0.00	0.00	0.00
	GO	4	0.5	12.5	4	0.5	12.5	4.00	0.00

Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

Tabla 17-3: CMI Cuantitativo Gram Positivo *S. aureus* a las 48 horas. Diámetro de disco 5mm

Concentración	Tipo de nanohíbrido	Medida del halo (disco-inhibición)	Incertidumbre medida halo	Incertidumbre porcentual	Medida del halo (disco-inhibición)	Incertidumbre medida halo	Incertidumbre porcentual	Valor medio	Desviación estándar medida del halo
ug/mL	mm	mm	mm	%	mm	mm	%	mm	mm
		48horas repetición 1			48horas repetición 2				
62.5	GO+ CuNP's-B	0	0.0	0.00	0	0.0	0.00	0.00	0.00
62.5	GO+ AgNP's-B	8	0.5	6.25	6	0.5	8.33	7.00	1.41
125	GO+ CuNP's-B	2	0.5	25.00	0	0.0	0.00	1.00	1.41
250	GO+ AgNP's-B	0	0.0	0.00	0	0.0	0.00	0.00	0.00
125	GO+ CuNP's-Q	6	0.5	8.33	3	0.5	16.67	4.50	2.12
125	GO+ AgNP's-B	11	0.5	4.55	6	0.5	8.33	8.50	3.54
125	GO+ AgNP's-Q	4	0.5	12.50	0	0.0	0.00	2.00	2.83
250	GO+ CuNP's-B	0	0.0	0.00	0	0.0	0.00	0.00	0.00
32	GO+ CuNP's-B	1	0.5	50.00	3	0.5	16.67	2.00	1.41
32	GO+ AgNP's-Q	2	0.5	25.00	2	0.5	25.00	2.00	0.00
250	GO+ CuNP's-Q	4	0.5	12.50	1	0.5	50.00	2.50	2.12
32	GO+ AgNP's-B	5	0.5	10.00	7	0.5	7.14	6.00	1.41
250	GO+ AgNP's-Q	0	0.0	0.00	0	0.0	0.00	0.00	0.00
32	GO+ CuNP's-Q	0	0.0	0.00	0	0.0	0.00	0.00	0.00
62.5	GO+ CuNP's-Q	0	0.0	0.00	0	0.0	0.00	0.00	0.00
62.5	GO+ AgNP's-Q	0	0.0	0.00	0	0.0	0.00	0.00	0.00
	GO	4	0.5	12.50	4	0.5	12.50	4.00	0.00

Realizado por: Barba. M & Pachacama. J,2021.

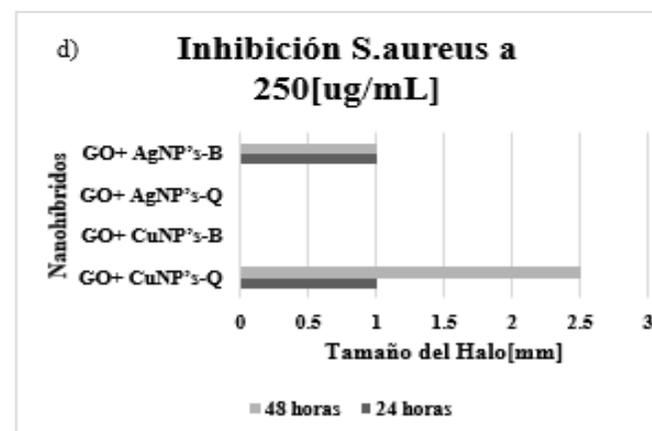
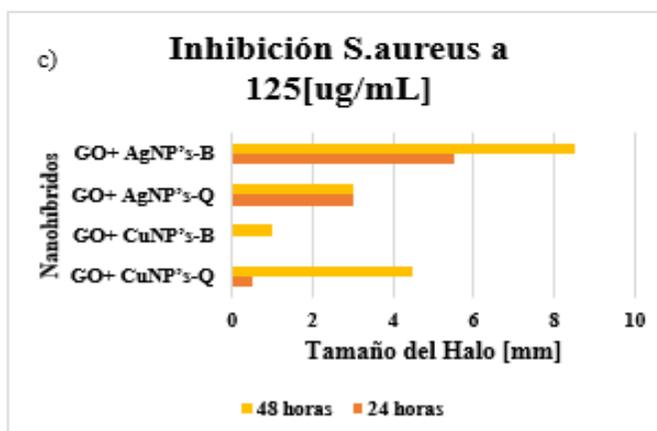
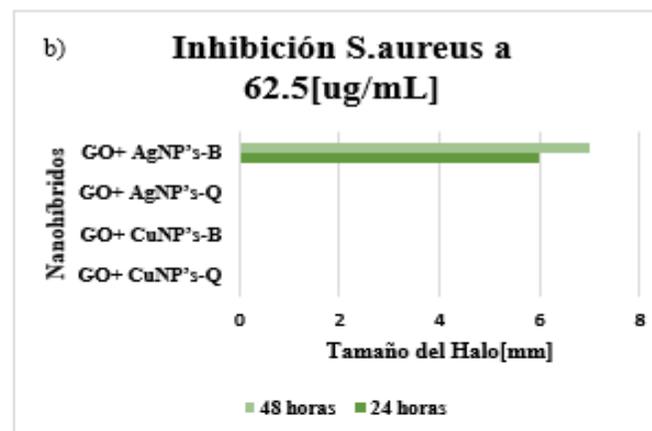
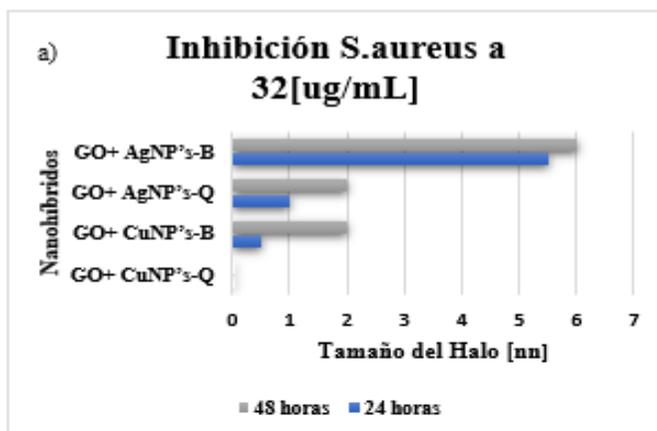


Figura 50-3: Variación de Halo a) 32, b) 62.5, c) 125y d) 250 [ug/mL].
Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

En la Figura 50-3 encontramos el análisis de inhibición de *S. aureus* con respecto a las diferentes concentraciones de los nanohíbridos. En la Figura 50-3. a) los diferentes nanohíbridos tienen una concentración de 32[ug/mL] y claramente se puede ver que el nanohíbrido GO+ AgNP's-B presenta un tamaño de halo superior a los otros nanohíbridos tanto a las 24 horas presentando un tamaño de halo de 5.5 [mm] y a las 48 horas presenta un tamaño de 6 [mm], seguido por el nanohíbrido GO+AgNP's Q sintetizado químicamente mostrando a las 24 horas un tamaño de 1[mm] y a las 48 horas un tamaño de 2[mm], además el nanohíbrido GO+CuNP's B presenta un tamaño de 0.5[mm] a las 24 horas y a las 48 horas un tamaño de 2[mm]. En la Figura 50-3. b) tenemos los nanohíbridos a una concentración de 62.5[ug/mL] en la que visualizamos nuevamente que el nanohíbrido GO+AgNP's B muestra un tamaño superior en las 24 horas y 48 horas obteniendo 6[mm] y 7 [mm]. La Figura 50-3. c) representa la inhibición a 125[ug/mL], reiteradamente tenemos que GO+AgNP'sB presenta un tamaño de halo superior a los otros nanohíbridos, a las 24 horas presenta un tamaño de 5.5[mm] y a las 48 horas un tamaño de 8.5[mm], el nanohíbrido GO+AgNP'sQ en las 24 horas presenta un tamaño de 5[mm] mientras que en las 48 horas existe una disminución del tamaño a 2[mm]; el nanohíbrido GO+CuNP's Q presentó un crecimiento de 0.5[mm] a las 24 horas y a las 48 horas presentó un tamaño de 4.5[mm], además el nanohíbrido GO+CuNP's B mostró 1[mm] de tamaño de halo a las 48 horas. En Figura 50-3. d) se representa la inhibición de *S. aureus* a una concentración de 250 [ug/mL], en la cual el nanohíbrido GO+CuNP's B presenta un mayor crecimiento cuyo tamaño de halo a las 24 horas es de 1[mm] y a las 48 horas es de 2.5[mm], además el nanohíbrido GO+Ag NP's B se presenta tanto a las 24 como 48 horas con un valor de Halo de 1[mm]. El tamaño del halo del óxido de grafeno sobre *E.coli* en las 24 y 48 horas es de 4[mm].

Una vez analizados los valores del tamaño de halo observamos que el nanohíbrido GO+AgNP's-B presenta un tamaño grande en las concentraciones (32;62.5 y 125)[ug/mL], esto nos indica que el nanomaterial utilizado inhibió de mejor manera a la bacteria, ya que el *S. aureus* se mostró sensible ante este nanohíbrido. El material GO+CuNP's-B a una concentración de 250 [ug/mL] presentó un mayor tamaño de halo a las 48 horas es decir que *S. aureus* mostró sensibilidad inhibitoria después de 24 horas de estar en contacto con el nanohíbrido. Dentro del análisis de inhibición el nanohíbrido GO+CuNP's-Q a una concentración de 32[ug/mL] no presenta crecimiento en el tamaño del halo, por lo que no inhibe a la bacteria, sin embargo a una concentración de 150 [ug/mL] se evidencia el aumento del halo de inhibición dentro de las 48 horas por lo que a concentraciones bajas de nanohíbrido el *S. aureus* presenta resistencia frente al material. La actividad antimicrobiana del GO a 580[ug/mL] presenta una menor eficacia con respecto a los materiales funcionalizados con nanopartículas de plata, como se puede observar en el *S.aureus* el material funcionalizado incrementó la actividad antimicrobiana entre el 50 y 100%, mientras que en la funcionalización de óxido de grafeno con nanopartículas del cobre la actividad

anticrobina es inferior. La concentración mínima de antibiótico capaz de inhibir a *Staphylococcus aureus* en 24 horas es el nanohíbrido (GO+ AgNP's-B) a las concentraciones de 32[ug/mL] y 125[ug/mL], mientras que a las 48 horas es el mismo nanomaterial pero con una concentración de 125[ug/mL], por lo que concluimos que esta concentración es la óptima para inhibir la cepa de *S.aureus* ATCC29213.

El mecanismo antimicrobiano de los derivados del grafeno en células y bacterias se produce en tres etapas, la primera es la deposición inicial del material, el estrés de la membrana causada por el contacto directo de los bordes que constituyen las láminas del OG permiten la destrucción de la pared celular. Finalmente, la presencia de grupos hidroxilo (OH) considerados como uno de los iones más activos para el proceso de muerte bacteriana, provoca la peroxidación de los lípidos lo que causa daño celular permitiendo inhibición. (Menazea and Ahmed, 2020). Por el contrario las nanopartículas de plata revelan una mayor actividad bactericida y biocompatibilidad con los nanomateriales antibacterianos incluso presenta aplicaciones sanitarias, alimentarias y textiles. El efecto antimicrobiano del nanocompuesto GO+AgNP's muestra que la concentración del nanohíbrido, el tiempo de exposición y factores físico-químicos influyen en la viabilidad bacteriana de *S. aureus*, además en varios estudios demuestran que el GO-Ag presenta una propiedad biocida alta con una concentración inhibitoria mínima. (Bouchareb et al. 2020: p. 122598).

3.3.1.2. Concentración Inhibitoria mínima en Gram Negativa

Para el análisis de inhibición de *E. Coli* se utilizó el mismo proceso para la concentración mínima inhibitoria de *S. aureus*, también se calculó el diámetro del halo de *Staphylococcus Aureus* a las 24 horas mostrado en la Tabla 19-3, y el diámetro a las 48 horas presentado en la Tabla 20-3.

Tabla 18-3: Presencia de inhibición y resistencia de los discos *E. coli*

Número de caja	Número de discos que constituyen la caja	Discos que presentan inhibición	Discos que no presentan inhibición
1	1,4,8,12 y GO	4,12 y GO	1 y 8
2	1,8,10,15 y GO	1,8 y GO	10 y 15
3	3,4,6,12 y GO	4,6,12	3 y GO
4	3,5,6,9 y GO	6	3,5,9 y GO
5	10,11,14, 15 y GO	GO	10,11,14 y15
6	2,9,11,16 y GO	2,9, 11, y GO	16
7	2,7,13,16 y GO	2 y 13	7, 16 y GO
8	5,7,13,14 y GO	GO	5,7,13 y 14

Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

Mediante un análisis general los nanohíbridos GO+ AgNP's-B y GO+ CuNP's-B a (32 y 62.5) [ug/mL]; GO+ AgNP's-B a 125[ug/mL]; GO+ AgNP's-B, GO+ AgNP's-Q, GO+ CuNP's-B, GO+ CuNP's-Q a 250[ug/mL] y el óxido de grafeno a 580[ug/mL] presentan inhibición bactericida sobre *Escherichia coli*, lo que nos dice es que la bacteria Gram Negativo es sensible a estos nanomateriales.

Escherichia coli es una bacteria que pertenece a las Gram Negativo constituida por membrana citoplasmática, membrana externa y peptidoglucano el que permite dar la rigidez y resistir a presiones osmóticas elevadas. En la experimentación se muestra que la cepa bacteriana es susceptible a los nanomateriales, ya que al combinar el GO con otros compuestos formamos un complejo mucho más eficiente para la actividad antimicrobiana.

Tabla 19-3: CMI Cuantitativo Gram Negativo *E. coli* a las 24 horas

Concentración	Tipo de nanohíbrido	Medida del halo(disco-inhibición)	Incertidumbre medida halo	Incertidumbre porcentual	Medida del halo(disco-inhibición)	Incertidumbre medida halo	Incertidumbre porcentual	Valor medio	Desviación estándar medida del halo
ug/mL		mm	mm	%	mm	mm	%	mm	mm
		24 horas repetición 1			24 horas repetición 2				
62.5	GO+ CuNP's-B	1	0.5	50.00	0	0.0	0.00	0.50	0.71
62.5	GO+ AgNP's-B	5	0.5	10.00	3	0.5	16.67	4.00	1.41
125	GO+ CuNP's-B	2	0.5	25.00	0	0.0	0.00	1.00	1.41
250	GO+ AgNP's-B	0	0.0	0.00	0	0.0	0.00	0.00	0.00
125	GO+ CuNP's-Q	0	0.0	0.00	0	0.0	0.00	0.00	0.00
125	GO+ AgNP's-B	4	0.5	12.50	4	0.5	12.50	4.00	0.00
125	GO+ AgNP's-Q	2	0.5	25.00	2	0.5	25.00	2.00	0.00
250	GO+ CuNP's-B	4	0.5	12.50	0	0.0	0.00	2.00	2.83
32	GO+ CuNP's-B	0	0.0	0.00	0	0.0	0.00	0.00	0.00
32	GO+ AgNP's-Q	3	0.5	16.67	1	0.5	50.00	2.00	1.41
250	GO+ CuNP's-Q	2	0.5	25.00	3	0.5	16.67	2.50	0.71
32	GO+ AgNP's-B	7	0.5	7.14	10	0.5	5.00	8.50	2.12
250	GO+ AgNP's-Q	0	0.0	0.00	0	0.0	0.00	0.00	0.00
32	GO+ CuNP's-Q	0	0.0	0.00	0	0.0	0.00	0.00	0.00
62.5	GO+ CuNP's-Q	0	0.0	0.00	0	0.0	0.00	0.00	0.00
62.5	GO+ AgNP's-Q	3	0.5	16.67	1	0.5	50.00	2.00	1.41
	GO	2	0.5	25.00	3	0.5	16.67	2.50	0.71

Realizado por: Barba. M & Pachacama. J,2021.

Tabla 20-3: CMI Cuantitativo Gram Negativo *E. coli* a las 48 horas

Concentración	Tipo de nanohíbrido	Medida del halo(disco-inhibición)	Incertidumbre e medida halo	Incertidumbre porcentual	Medida del halo(disco-inhibición)	Incertidumbre medida halo	Incertidumbre porcentual	Valor medio	Desviación estándar medida del halo
ug/mL		mm	mm		mm	mm			mm
48horas repetición 1				48horas repetición 2					
62.5	GO+ CuNP's-B	1	0.5	50.00	0	0.0	0.00	0.50	0.71
62.5	GO+ AgNP's-B	5	0.5	10.00	3	0.5	16.67	4.00	1.41
125	GO+ CuNP's-B	2	0.5	25.00	0	0.0	0.00	1.00	1.41
250	GO+ AgNP's-B	1	0.5	50.00	1	0.5	50.00	1.00	0.00
125	GO+ CuNP's-Q	1	0.5	50.00	0	0.0	0.00	0.50	0.71
125	GO+ AgNP's-B	6	0.5	8.33	4	0.5	12.50	5.00	1.41
125	GO+ AgNP's-Q	2	0.5	25.00	2	0.5	25.00	2.00	0.00
250	GO+ CuNP's-B	5	0.5	10.00	1	0.5	50.00	3.00	2.83
32	GO+ CuNP's-B	0	0.0	0.00	0	0.0	0.00	0.00	0.00
32	GO+ AgNP's-Q	3	0.5	16.67	1	0.5	50.00	2.00	1.41
250	GO+ CuNP's-Q	4	0.5	12.50	3	0.5	16.67	3.50	0.71
32	GO+ AgNP's-B	8	0.5	6.25	12	0.5	4.17	10.00	2.83
250	GO+ AgNP's-Q	0	0.0	0.00	0	0.0	0.00	0.00	0.00
32	GO+ CuNP's-Q	0	0.0	0.00	0	0.0	0.00	0.00	0.00
62.5	GO+ CuNP's-Q	0	0.0	0.00	0	0.0	0.00	0.00	0.00
62.5	GO+ AgNP's-Q	3	0.5	16.67	1	0.5	50.00	2.00	1.41
	GO	2	0.5	25.00	3	0.5	16.67	2.50	0.71

Realizado por: Barba. M & Pachacama. J,2021.

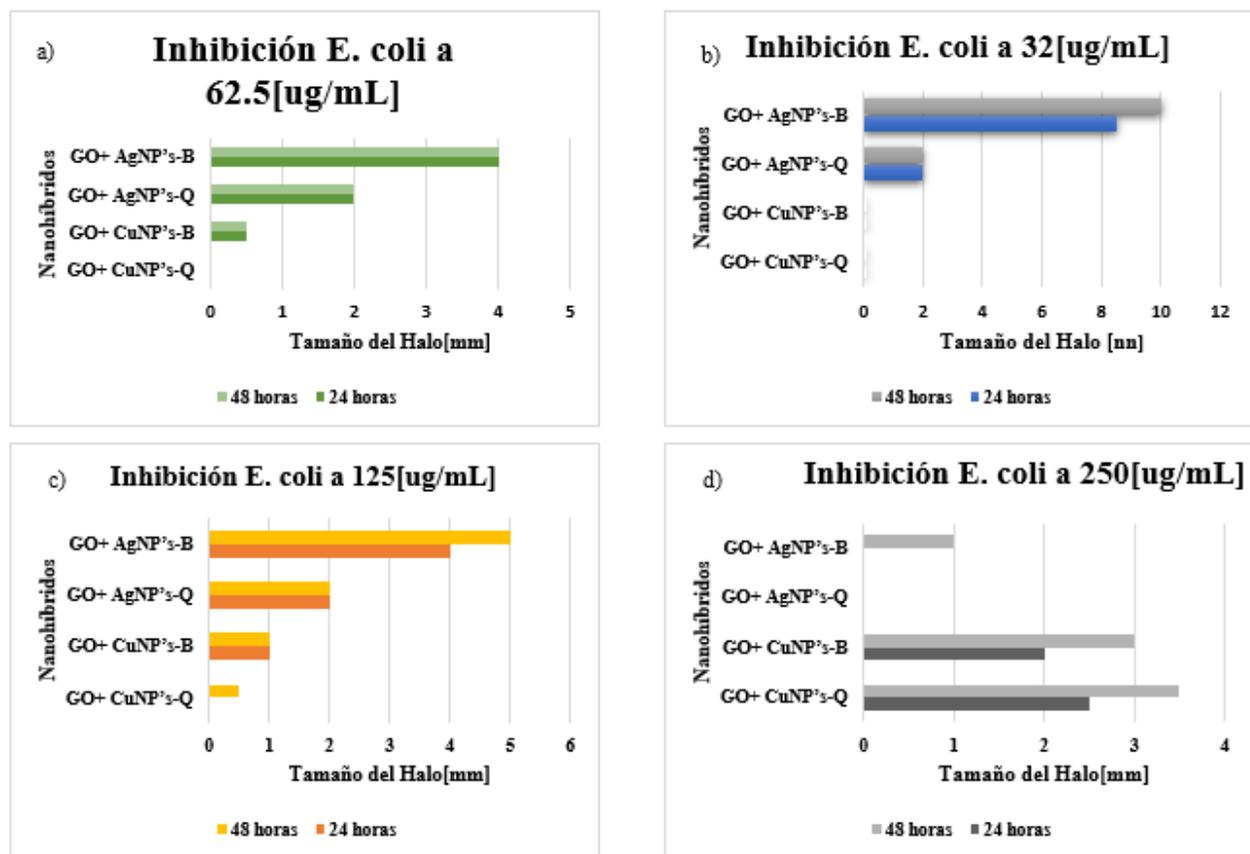


Figura 51-3: Variación del Halo a) 32, b) 62.5, c) 125 y d) 250 [ug/mL].
 Realizado por: Barba. M & Pachacama. J,2021.

La Figura 51-3 representa la inhibición de los diferentes nanohíbridos sobre la cepa de *Escherichia coli*, en la Figura 51-3.a observamos que el nanohíbrido GO+ AgNP's-B presenta un tamaño de halo superior a los otros nanomateriales teniendo un valor a las 24 horas de 8.5[mm] y a las 48 horas llega a un valor de 10[mm], el otro nanohíbrido que presentó crecimiento en el tamaño del halo fue el GO+ AgNP's-Q con un tamaño de 2[mm] tanto en las 24 como 48 horas. En la Figura 51-3. b) visualizamos que el nanohíbrido GO+ AgNP's-B nuevamente presenta un crecimiento en el tamaño del halo de 4[mm] tanto a las 24 como 48 horas. Seguido del nanohíbrido GO +AgNP's-Q el cuál presenta un tamaño de 2[mm] en las 24 y 48 horas, finalmente el nanohíbrido GO+ CuNP's-B se presenta con un tamaño de 0.5[mm] tanto a las 24 como 48 horas. En el caso de los nanohíbridos cuya concentración fue de 125[ug/mL] representados en la Figura 51-3. c) se aprecia que el nanohíbrido GO+ AgNP's-B presenta un mayor tamaño del halo a las 24 horas el tamaño es de 4[mm] y a las 48 horas es de 5[mm], el nanohíbrido GO+ AgNP's-Q muestra un tamaño de 2[mm] en ambos registros, el GO+ CuNP's- B presentó un crecimiento de 1[mm] tanto a las 24 como 48 horas. Finalmente, en esta concentración tenemos que GO+ Cu NP's-Q a las 48 horas presenta un crecimiento de 0.5[mm]. La Figura 51-3. d) demuestra que el nanohíbrido que presenta mayor crecimiento del halo es GO+ CuNP's-Q con un tamaño de 3.5[mm] a las 48 horas y 2.5[mm] a las 24 horas, en este caso el GO+ Cu NP's-B presenta un crecimiento de 3[mm] a las 48 horas y de 2[mm], además, GO+ AgNP's-B a las 48 horas presenta un crecimiento de 1[mm]. La actividad antimicrobiana del GO a 580[ug/mL] presenta una menor eficacia con respecto a los materiales funcionalizados con nanopartículas de plata y cobre, ya que la actividad antimicrobiana incrementa entre el 40 y 100%. La concentración mínima de antibiótico capaz de inhibir la cepa de *Escherichia coli* ATCC25922 es el óxido de grafeno funcionalizado con nanopartículas de plata sintetizadas por el método biológico (GO+ AgNP's-B) a una concentración de 32[ug/mL]. El mecanismo antimicrobiano de los derivados del grafeno en células y bacterias se produce de la misma manera que en *Staphylococcus aureus*, ya que *Escherichia coli* al estar en contacto directo con estos nanohíbridos se produce la ruptura de la membrana por las láminas del GO, además por los grupos hidroxilos pertenecientes al óxido de grafeno permiten que la célula bacteriana sufra peroxidación provocando muerte celular.

3.2.3. Concentración mínima bactericida

La técnica CMB se define como la concentración de antimicrobiano el cual elimina un 99.9% de microorganismos después de cierto tiempo de incubación por lo general son 24 horas. (Quintana et al., 2005: p.39).

Para conocer la CMB en Gram Positivo y Gram Negativo se utilizó 20µL de una dilución bactericida de 10^{-7} UFC con 20µL de las concentraciones de los diferentes nanohíbridos, las mismas que fueron inoculadas en tubos de ensayo que contenían 10mL de caldo *Luria Bertani* el cual fue preparado a partir de 10gr de triptona, 5gr de extracto de levadura y 10gr de cloruro de sodio disueltos en 1000mL de agua destilada, llegando a un pH- de 7,15 véase en la (Figura 52-3).



Figura 52-3: Medición del pH del caldo LB.
Realizado por: Barba. M & Pachacama. J,2021.

3.2.3.1. Concentración mínima bactericida en *Escherichia coli*

Se realizó una siembra de la bacteria *Escherichia coli* ATCC25922 en 33 tubos de ensayo que contenían Caldo *Luria Bertani*, la incubación de los tubos fue a 37°C por 24 horas, los tubos que presentaron turbidez son los que contenían un crecimiento bactericida caso contrario los tubos que no presentaron turbidez los nanohíbridos fueron capaces de inhibir el crecimiento bacteriano. Para obtener el resultado de CMB se obtuvo 100uL de los tubos que no presentaron turbidez y fueron sembrados en cajas Petri en medio de cultivo Agar Triptona de Soya para verificar el crecimiento bacteriano.

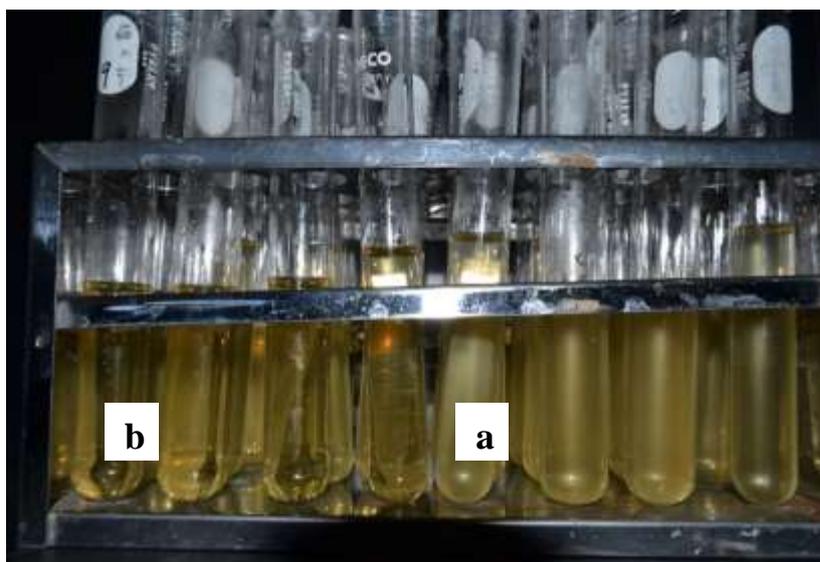


Figura 53-3: Turbidez *E. coli*. **a)** presencia de bacteria. **b)** ausencia de bacteria.
Realizado por: Barba. M & Pachacama.J,2021.

Tabla 21-3: CMB Cualitativo Escala Bimodal Gram Negativo (*E. coli*)

Concentración del nanohíbrido	Tipo de nanohíbrido	24 horas repetición 1				24 horas repetición 2			
		Presentó turbidez		Presentó crecimiento bacteriano		Presentó turbidez		Presentó crecimiento bacteriano	
		Sí	No	Sí	No	Sí	No	Sí	No
62.5	GO+ CuNP's B	X		X		X		X	
62.5	GO+ AgNP's B	X			X		X		X
125	GO+ CuNP's B		X		X		X		X
250	GO+ AgNP's B	X		X		X		X	
125	GO+ CuNP's Q		X		X		X		X
125	GO+ AgNP's B	X		X		X		X	
125	GO+ AgNP's Q	X		X			X	X	
250	GO+ CuNP's B	X		X		X		X	
32	GO+ CuNP's B		X		X	X			X
32	GO+ AgNP's Q	X		X		X		X	
250	GO+ CuNP's B	X		X		X		X	
32	GO+ AgNP's B		X		X		X		X
250	GO+ AgNP's Q	X		X		X		X	
32	GO+ CuNP's Q		X	X		X		X	
62.5	GO+ CuNP's Q	X			X		X		X
62.5	GO+ AgNP's Q	X		X		X		X	

Realizado por: Barba. M & Pachacama. J,2021.

En la Tabla 21-3 se muestran los datos cualitativos de la primera y segunda repetición de los tubos de ensayo, dado que existen algunos datos que en la primera repetición no coinciden con

los de la segunda repetición señalados en color celeste, se procedió a resembrar 100µL de la solución de los tubos en cajas Petri con Agar Triptona de Soya para observar el crecimiento bacteriano, para determinar la concentración mínima bactericida de los nanohíbridos en la cepa *Escherichia coli*, se utilizó una placa de control sin nanohíbrido, la lectura de los resultados se realizó en aquellas placas donde los nanohíbridos fueron capaz de eliminar el 99.9% de bacterias comparándolas con la placa de control.

En la placa control se determinó 1.73E+08 colonias equivalentes al 100%, los nanohíbridos a 62.5 ug/mL presentaron un menor número de colonias bacterianas, el nanohíbrido GO+CuNP's B mostró 5.00E+06 colonias representando una concentración mínima bactericida del 0.0289%, el composite GO + AgNP's B presentó 2.00E+06 colonias equivalentes al 0.0116%, el siguiente material fue el GO +CuNP's Q en el que se evidenció 4.00E+06 colonias bacterianas constituyendo el 0.0231%, finalmente el nanohíbrido GO +AgNP's Q cuyo número de colonias fue de 6.00E+06 representó el 0.0347%. Estos valores están dentro de la norma de la concentración mínima bactericida ya que los nanohíbridos permiten sobrevivir menos del 0.1% de la cepa original.

3.2.3.2. Concentración mínima bactericida en *Staphylococcus aureus*

En *Staphylococcus aureus* ATCC29213 la técnica CMB se desarrolló con la siembra de 33 tubos de ensayo de los cuales 16 pertenecen a las diferentes concentraciones del material al ser una experimentación por duplicado tenemos 32 tubos, y 1 tubo de control los cuales fueron incubados a 37°C, después de un periodo de incubación de 24 horas se observó la turbidez en los tubos véase (Figura 54-3) lo que nos indica el desarrollo bacteriano, para medir la CMB se realiza la prueba de actividad bactericida para ello a partir de los tubos que no presentaron crecimiento bacteriano se inoculó 100 µL de la disolución sobre Agar Triptona de Soya y se verificó el crecimiento bacteriano, la concentración mínima de los nanohíbridos que permiten sobrevivir menos del 0.1% de la cepa original se denomina concentración mínima bactericida.

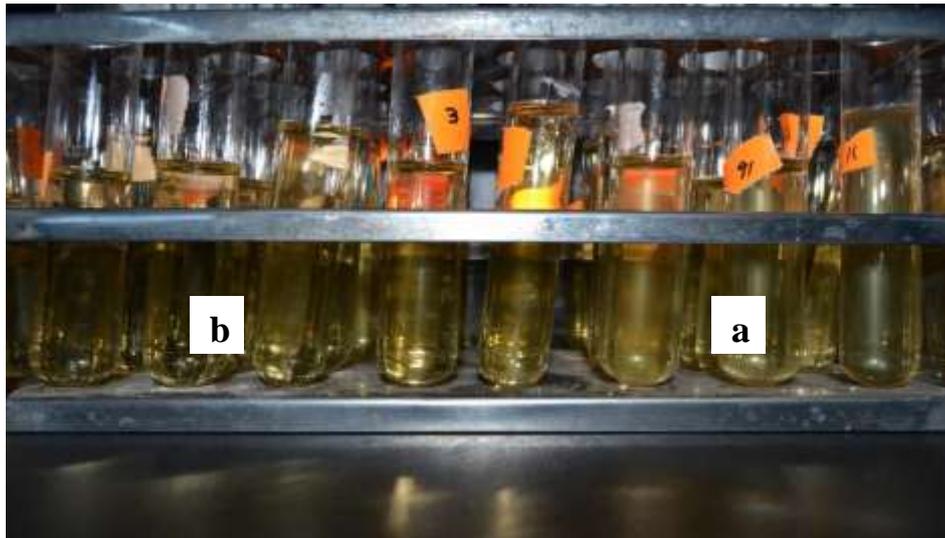


Figura 54-3: Turbidez *S. aureus*. **a)** crecimiento bacteriano **b)** ausencia de bacteria.
Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

Tabla 22-3: CMB Cualitativo Escala Bimodal Gram Negativo (*S. aureus*)

Concentración del nanohíbrido	Tipo de nanohíbrido	24 horas repetición 1				24 horas repetición 2			
Ug/mL		Presentó turbidez		Presentó crecimiento bacteriano		Presentó turbidez		Presentó crecimiento bacteriano	
		SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
62.5	GO+ CuNP's-B	X		X			X	X	
62.5	GO+ AgNP's-B		X		X		X		X
125	GO+ CuNP's-B		X	X			X	X	
250	GO+ AgNP's-B		X	X			X	X	
125	GO+ CuNP's-Q		X		X		X		X
125	GO+ AgNP's-B	X			X		X		X
125	GO+ AgNP's-Q	X		X		X		X	
250	GO+ CuNP's-B		X		X		X		X
32	GO+ CuNP's-B		X		X		X		X
32	GO+ AgNP's-Q	X		X			X	X	
250	GO+ CuNP's-B		X	X		X		X	
32	GO+ AgNP's-B		X		X		X		X
250	GO+ AgNP's-Q		X		X		X		X
32	GO+ CuNP's-Q		X		X		X		X
62.5	GO+ CuNP's-Q	X		X		X		X	
62.5	GO+ AgNP's-Q	X		X			X	X	

Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

En la Tabla 22-3 se muestran los datos de la turbidez y del crecimiento bacteriano que tuvieron los tubos tanto de la primera como de la segunda repetición sobre la cepa *S. Aureus*, vemos que

los nanohíbridos actúan favorablemente eliminando el 99.9% de bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC29213.

En la placa control se calculó 1.20E+08 colonias equivalentes al 100%, los nanohíbridos GO + AgNP's B y GO +AgNP's Q a 62.5 ug/mL presentaron 3.00E+06 y 1.00E+07 colonias en placa equivalentes a una concentración mínima bactericida del 0.025% y 0.083% respectivamente. Finalmente, el composite GO +CuNP's Q a una concentración de 125ug/mL mostró 7.00E+06 colonias lo que representó una concentración del 0.0583%. Estos valores están dentro de la norma de la concentración mínima bactericida ya que los nanohíbridos permiten sobrevivir menos del 0.1% de la cepa original.

3.4. Unidades formadoras de colonias

3.4.1. *Conteo de UFC en bacterias Gram Positivo*

Para el conteo de las unidades formadoras de colonias en *S. Aureus* se prepararon 17 cajas Petri con Agar Mueller Hinton en las 16 cajas se sembró 100µL de la bacteria a una dilución de 10⁻⁷ con 50µL del nanohíbrido a diferentes concentraciones y 1 caja fue de control en la que solo se colocó la bacteria, después de 24 horas se procedió a contar las colonias presentes en la placa para luego conocer las unidades formadoras de colonias mediante la Ecuación 1 las que se reportan en la Tabla 23-3.

Ecuación 1-3. Ecuación Unidades Formadoras de Colonias

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{(\text{número de colonias por placa}) * (\text{factor de dilución})}{ml \text{ de muestra sembrada}}$$

Fuente: (IDDEX, 2018: p.3); (HORNA QUINTANA et al., 2012: p.39).

Donde:

(*número de colonias por placa*) : Cuenta de colonias por caja Petri.

(*factor de dilución*): Dilución de la Bacteria 10⁻⁷.

ml de muestra sembrada: 100mL de bacteria.

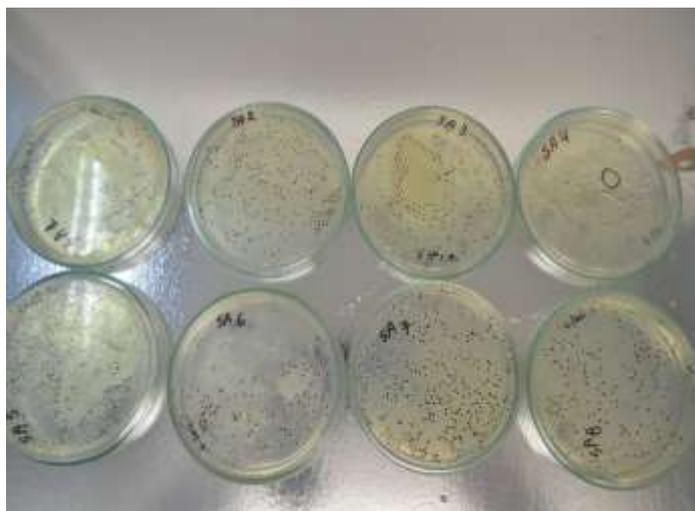


Figura 55-3: Reporte de colonias en la bacteria Gram Positivo.
Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

Tabla 23-3: Registro de conteo de colonias bacteria Gram Positivo

Concentración del nanohíbrido	Tipo de nanohíbrido	Conteo por placa	Factor de dilución	Volumen de la muestra	Unidades formadoras de colonias
ug/mL				mL	UFC /mL
CONTROL		120	1.00E+07	0.1	1.20E+08
32	GO+ CuNP's B	96	1.00E+07	0.1	9.60E+07
32	GO+ AgNP's B	20	1.00E+07	0.1	2.00E+07
32	GO+ CuNP's Q	36	1.00E+07	0.1	3.60E+07
32	GO+ AgNP's Q	26	1.00E+07	0.1	2.60E+07
62.5	GO+ CuNP's B	100	1.00E+07	0.1	1.00E+08
62.5	GO+ AgNP's B	3	1.00E+07	0.1	3.00E+06
62.5	GO+ CuNP's Q	31	1.00E+07	0.1	3.10E+07
62.5	GO+ AgNP's Q	10	1.00E+07	0.1	1.00E+07
125	GO+ CuNP's B	34	1.00E+07	0.1	3.40E+07
125	GO+ AgNP's B	15	1.00E+07	0.1	1.50E+07
125	GO+ CuNP's Q	7	1.00E+07	0.1	7.00E+06
125	GO+ AgNP's Q	15	1.00E+07	0.1	1.50E+07
250	GO+ CuNP's B	31	1.00E+07	0.1	3.10E+07
250	GO+ AgNP's B	10	1.00E+07	0.1	1.00E+07
250	GO+ CuNP's Q	14	1.00E+07	0.1	1.40E+07
250	GO+ AgNP's Q	30	1.00E+07	0.1	3.00E+07

Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

3.4.2. *Conteo UFC en bacterias Gram Negativo*

Para el conteo de las unidades formadoras de colonias en *E. Coli* de la misma manera se prepararon 17 cajas Petri con Agar Mueller Hinton en las 16 cajas sembramos 100µL de la bacteria a una dilución de 10^{-7} con 100µL del nanohíbrido a diferentes concentraciones, la última caja se consideró la de control, después de 24 horas se procedió a contar las colonias presentes en la placa para ello dividimos en cuadrantes y se contabilizó las colonias en 1 de los cuadrantes luego multiplicamos por 4 para obtener el número de colonias formadas, una vez conocido este número se aplicó la Ecuación 1 para conocer el número total de unidades formadoras de colonias reportadas en la Tabla 24-3.

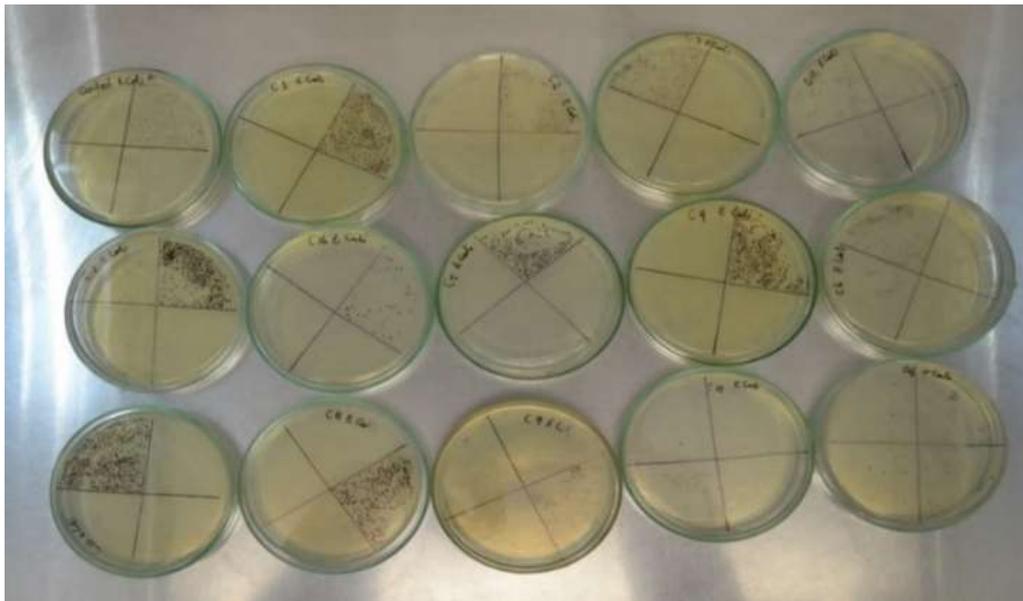


Figura 56-3: Conteo por cuadrante de colonias en la bacteria Gram negativo
Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

Tabla 24-3: Registro de conteo de colonias bacteria Gram negativo

Concentración del nanohíbrido	Tipo de nanohíbrido	Conteo por placa	Factor de dilución	Volumen de la muestra	Unidades formadoras de colonias
ug/mL				mL	UFC /mL
CONTROL		173	1.00E+07	0.1	1.73E+08
32	GO+ CuNP's B	9	1.00E+07	0.1	9.00E+06
32	GO+ AgNP's B	7	1.00E+07	0.1	7.00E+06
32	GO+ CuNP's Q	9	1.00E+07	0.1	9.00E+06
32	GO+ AgNP's Q	7	1.00E+07	0.1	7.00E+06
62.5	GO+ CuNP's B	5	1.00E+07	0.1	5.00E+06
62.5	GO+ AgNP's B	2	1.00E+07	0.1	2.00E+06
62.5	GO+ CuNP's Q	4	1.00E+07	0.1	4.00E+06
62.5	GO+ AgNP's Q	6	1.00E+07	0.1	6.00E+06
125	GO+ CuNP's B	70	1.00E+07	0.1	7.00E+07
125	GO+ AgNP's B	14	1.00E+07	0.1	1.40E+07
125	GO+ CuNP's Q	16	1.00E+07	0.1	1.60E+07
125	GO+ AgNP's Q	23	1.00E+07	0.1	2.30E+07
250	GO+ CuNP's B	10	1.00E+07	0.1	1.00E+07
250	GO+ AgNP's B	14	1.00E+07	0.1	1.40E+07
250	GO+ CuNP's Q	15	1.00E+07	0.1	1.50E+07
250	GO+ AgNP's Q	23	1.00E+07	0.1	2.30E+07

Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

3.5. Test de ANOVA

Después de haber realizado los experimentos correspondientes se realizó un test de ANOVA a los resultados obtenidos aleatoriamente, para dar un resultado a la hipótesis formulada. En donde el Factor A son las concentraciones de las nanopartículas, el Factor B es el método de obtención el cual influye de una manera significativa en el tamaño de estas nanopartículas sintetizadas. Los resultados obtenidos después de realizar los test resultaron favorables, el factor A y el factor B son significativamente diferentes es decir estos influyeron de manera directa al crecimiento de la bacteria, como en la inhibición bacteriana.

3.5.1. Test de ANOVA para la bacteria Gram positiva

Tabla 25-3: ANOVA para la bacteria Gram Positiva con AgNP's a las 24 horas

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Valor de P
Factor A	3	15,75	5,25	--	--
Factor B	1	15,125	15,125	--	--
Interacción	3	12,625	4,20833	--	--
Modelo	7	43,5	6,21429	--	--
Error	0	0	--	--	--
Total	7	43,5	--	--	--

Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

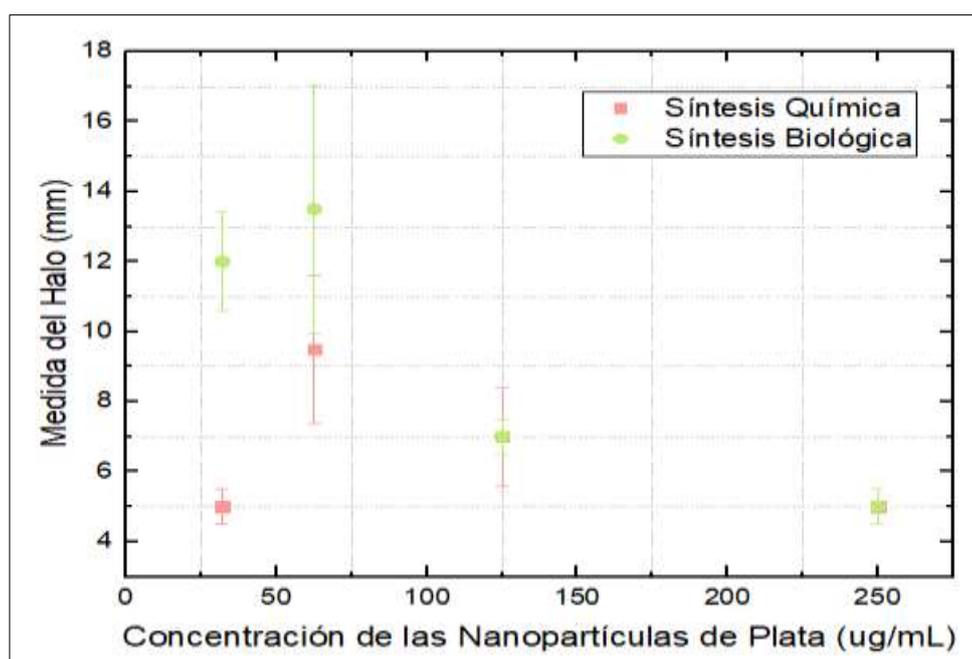


Figura 57-3: Influencia de la concentración en la actividad inhibitoria en (Gram+) a 24h.
Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

Tabla 26-3: Test de ANOVA para la bacteria Gram positiva con AgNP's a las 48 horas

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Valor de P
Factor A	3	45	15	--	--
Factor B	1	15,125	15,125	--	--
Interacción	3	17,375	5,79167	--	--
Modelo	7	77,5	11,07143	--	--
Error	0	0	--	--	--
Total	7	77,5	--	--	--

Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

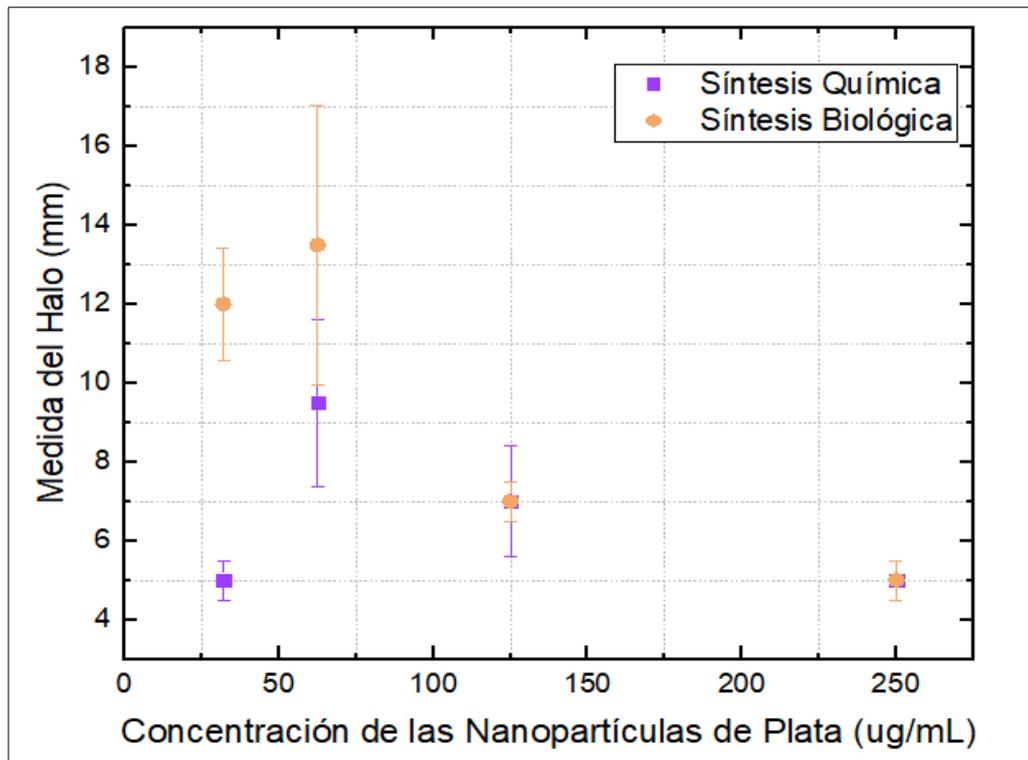


Figura 58-3: Influencia de la concentración en la actividad inhibitoria en (Gram+) a 48 h.
 Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

Tabla 27-33: Test de ANOVA para la bacteria Gram Positiva con AgNP's, conteo de UFC

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Valor de P
Factor A	3	2,26234E21	7,54115E20	--	--
Factor B	1	4,27812E19	4,27812E19	--	--
Interacción	3	6,80634E21	2,26878E21	--	--
Modelo	7	9,11147E21	1,30164E21	--	--
Error	0	0	--	--	--
Total	7	9,11147E21	--	--	--

Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

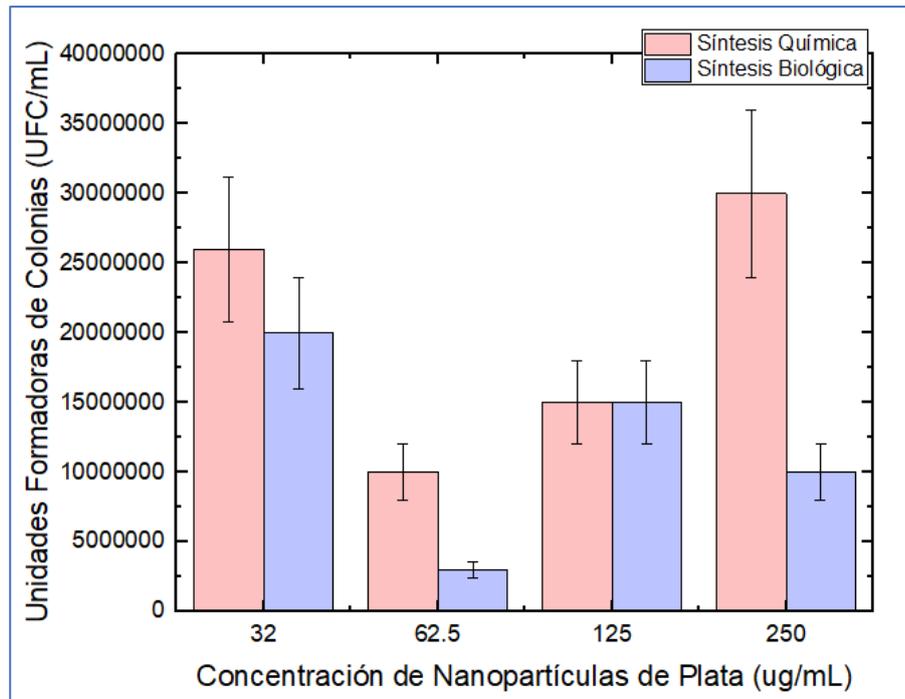


Figura 59-3: Influencia de la concentración de AgNP's en el conteo de colonias
 Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

Tabla 28-3: Test de ANOVA para la bacteria Gram Positiva con CuNP's a las 24 horas

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Valor de P
Factor A	3	16,09375	5,36458	--	--
Factor B	1	3,78125	3,78125	--	--
Interacción	3	9,34375	3,11458	--	--
Modelo	7	29,21875	4,17411	--	--
Error	0	0	--	--	--
Total	7	29,21875	--	--	--

Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

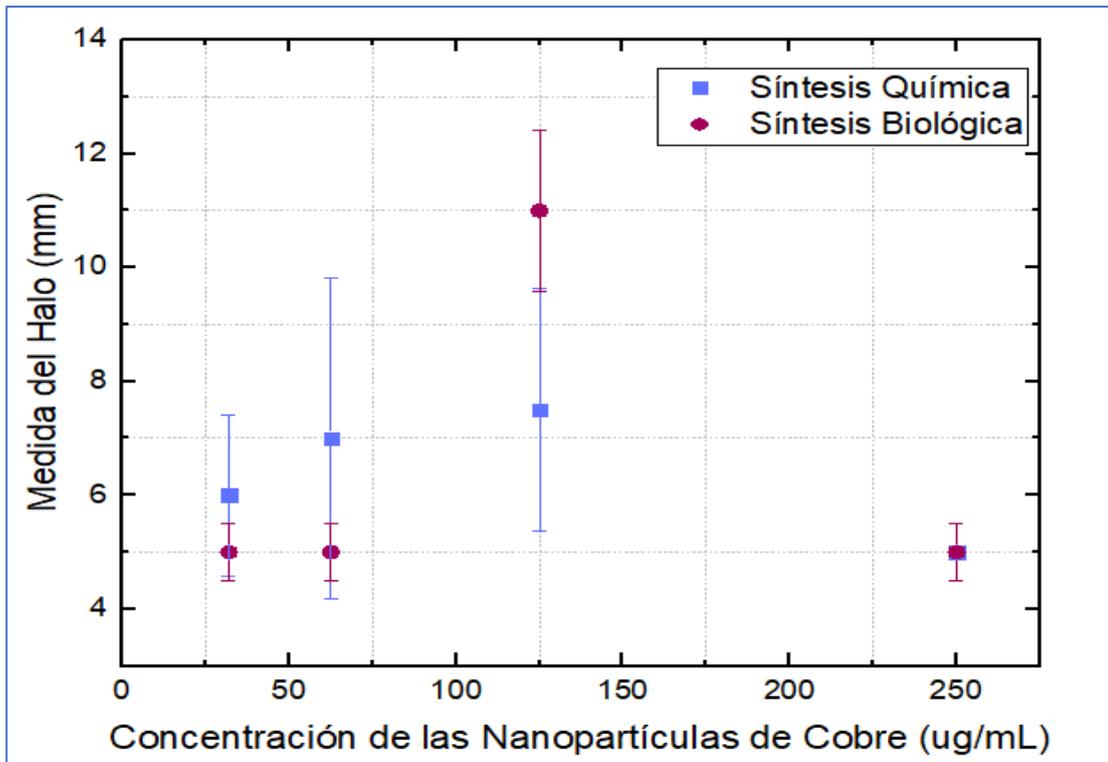


Figura 60-3: Influencia de la concentración en la actividad inhibitoria en (Gram +) a 24 h.
Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

Tabla 29-3: Test de ANOVA para la bacteria Gram Positiva con CuNP's a las 48 horas

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Valor de P
Factor A	3	22,09375	7,36458	--	--
Factor B	1	0,03125	0,03125	--	--
Interacción	3	8,59375	2,86458	--	--
Modelo	7	30,71875	4,38839	--	--
Error	0	0	--	--	--
Total	7	30,71875	--	--	--

Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

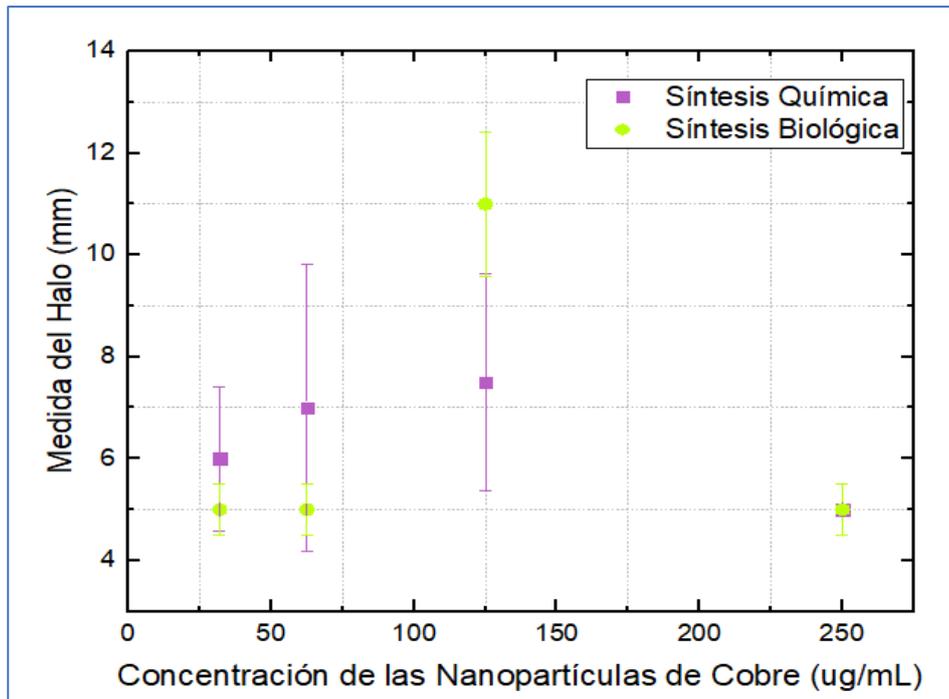


Figura 61-3: Influencia de la concentración en la actividad inhibitoria en (Gram+) a 48 h.
 Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

Tabla 30-3: Test de ANOVA para la bacteria Gram Positiva con CuNP's, conteo de UFC

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Valor de P
Factor A	3	2,81309E21	9,37698E20	--	--
Factor B	1	3,44531E20	3,44531E20	--	--
Interacción	3	2,32159E21	7,73865E20	--	--
Modelo	7	5,47922E21	7,82746E20	--	--
Error	0	0	--	--	--
Total	7	5,47922E21	--	--	--

Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

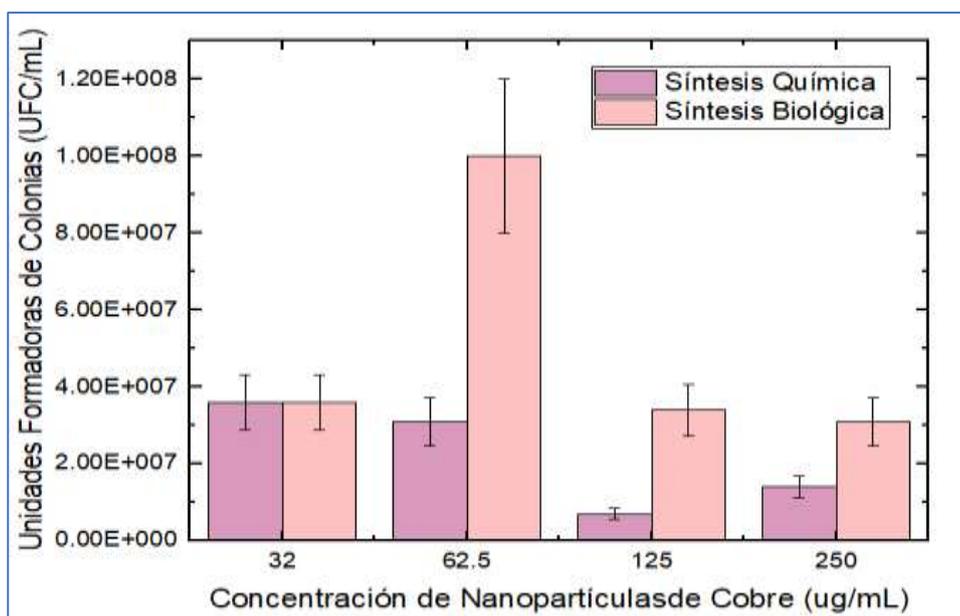


Figura 62-3: Influencia de la concentración de CuNP's en el conteo de colonias.
Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

3.5.2. Test de ANOVA para la bacteria Gram negativa

Tabla 31-3: Test de ANOVA para la bacteria Gram Negativa con AgNP's a las 24 horas

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Valor de P
Factor A	3	28,125	9,375	--	--
Factor B	1	10,125	10,125	--	--
Interacción	3	13,125	4,375	--	--
Modelo	7	51,375	7,33929	--	--
Error	0	0	--	--	--
Total	7	51,375	--	--	--

Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

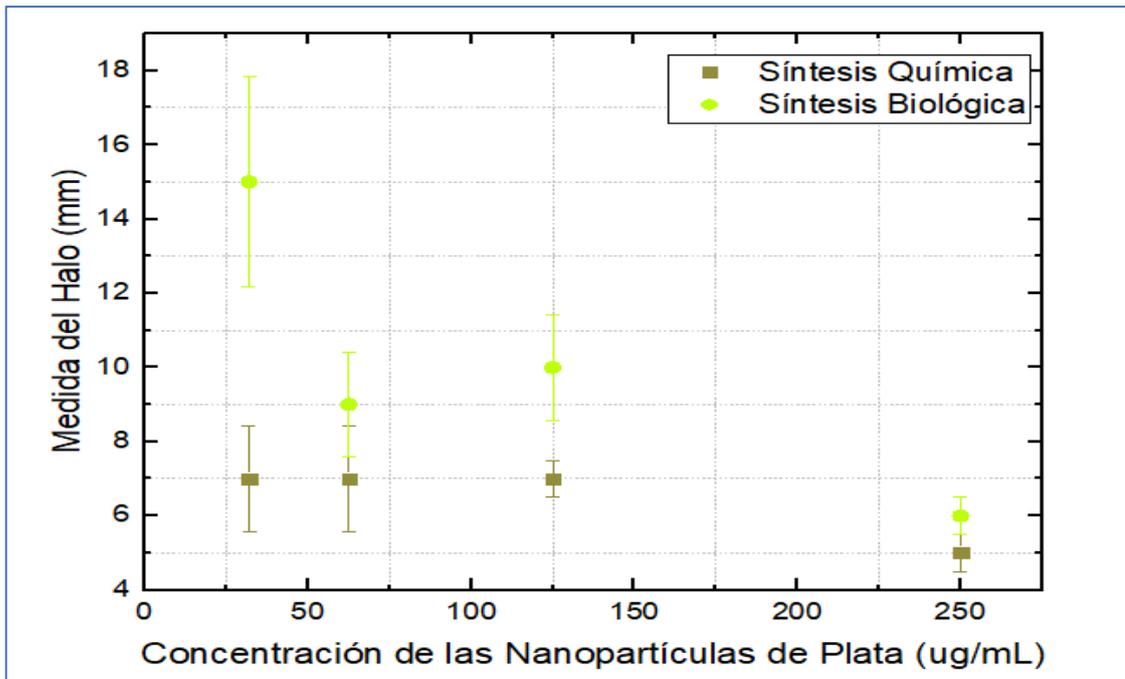


Figura 63-3: Influencia de la concentración en la actividad inhibitoria en (Gram-) a 24 h.
 Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

Tabla 32-3: Test de ANOVA para la bacteria Gram Negativa con AgNP's a las 48 h

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Valor de P
Factor A	3	30,5	10,16667	--	--
Factor B	1	24,5	24,5	--	--
Interacción	3	14,5	4,83333	--	--
Modelo	7	69,5	9,92857	--	--
Error	0	0	--	--	--
Total	7	69,5	--	--	--

Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

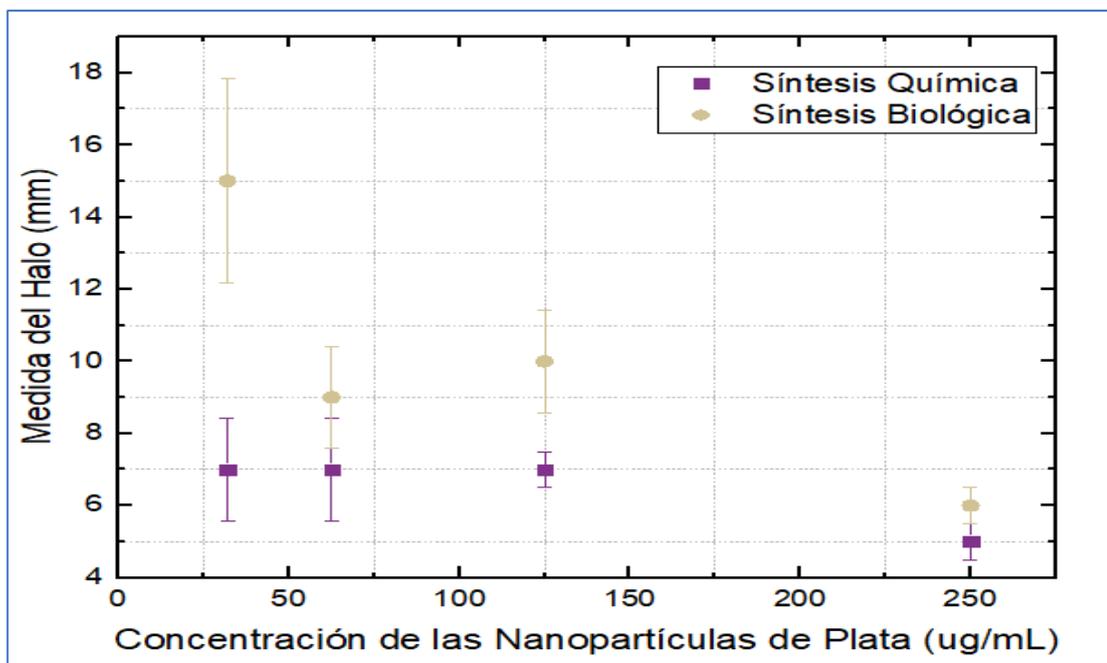


Figura 64-3: Influencia de la concentración en la actividad inhibitoria en (Gram-) a 48 h.
 Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

Tabla 33-3: Test de ANOVA para la bacteria Gram Negativa con AgNP's, conteo de UFC

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Valor de P
Factor A	3	5	1,66667	--	--
Factor B	1	1	1	--	--
Interacción	3	1	0,33333	--	--
Modelo	7	7	1	--	--
Error	0	0	--	--	--
Total	7	7	--	--	--

Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

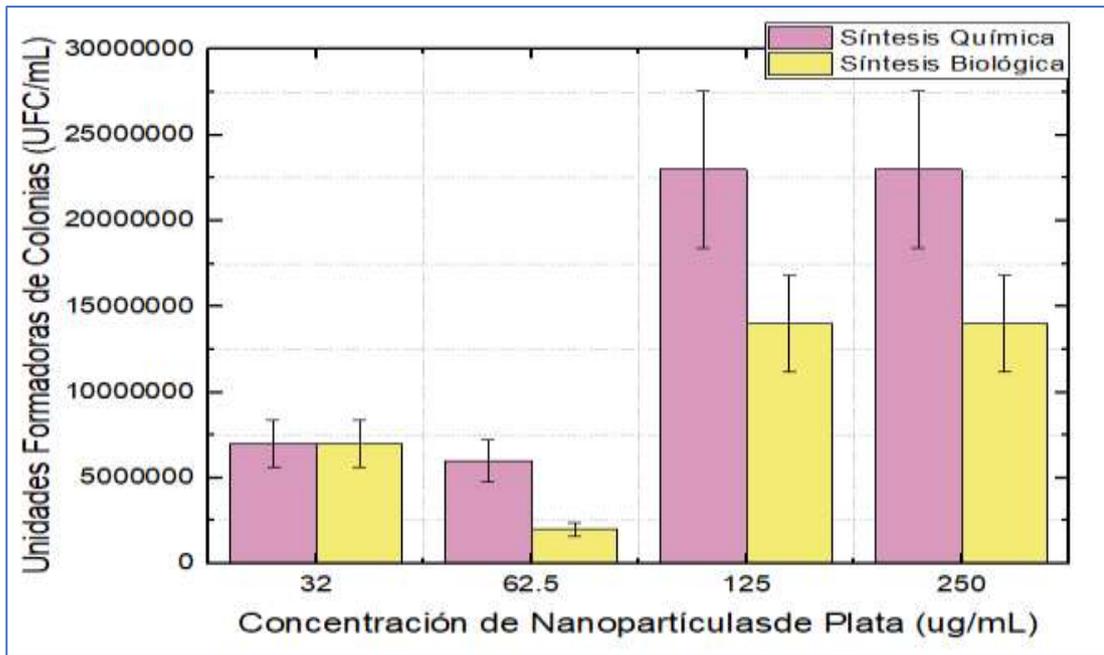


Figura 65-3: Influencia de la concentración de AgNP's en el conteo de colonias.
 Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

Tabla 34-3: Test de ANOVA para la bacteria Gram Negativa con CuNP's a las 24 horas

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Valor de P
Factor A	3	8,84375	2,94792	--	--
Factor B	1	0,03125	0,03125	--	--
Interacción	3	0,09375	0,03125	--	--
Modelo	7	8,96875	1,28125	--	--
Error	0	0	--	--	--
Total	7	8,96875	--	--	--

Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

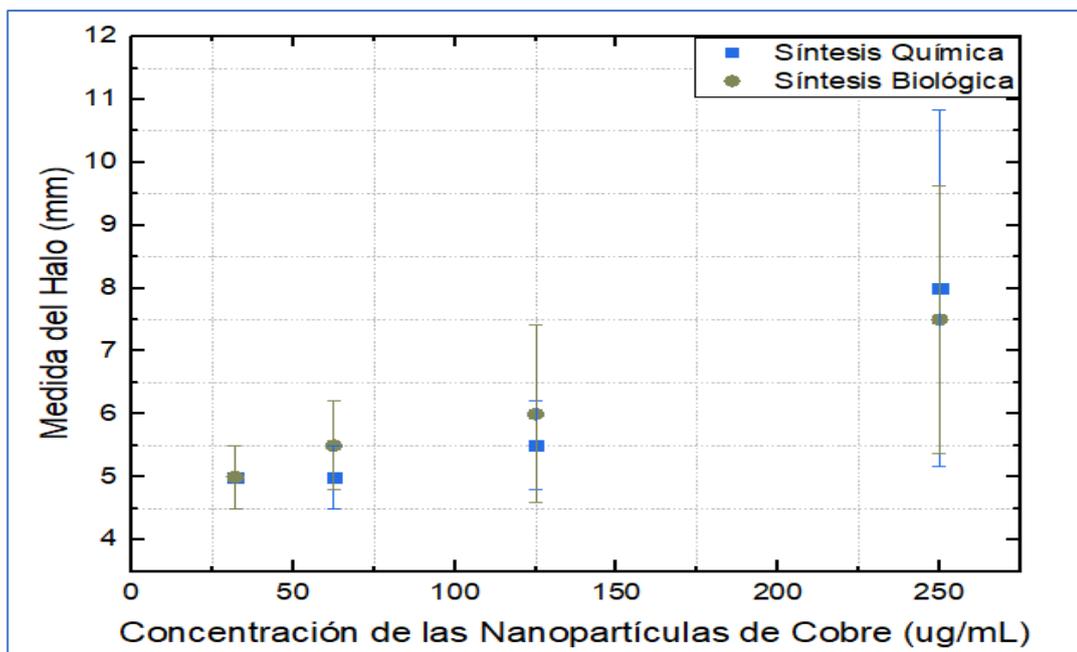


Figura 66-3: Influencia de la concentración en la actividad inhibitoria en (Gram-) a 24 h.
Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

Tabla 35-3: Test de ANOVA para la bacteria Gram Negativa con CuNP's a las 48 horas

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Valor de P
Factor A	3	9,34375	3,11458	--	--
Factor B	1	0,03125	0,03125	--	--
Interacción	3	0,34375	0,11458	--	--
Modelo	7	9,71875	1,38839	--	--
Error	0	0	--	--	--
Total	7	9,71875	--	--	--

Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

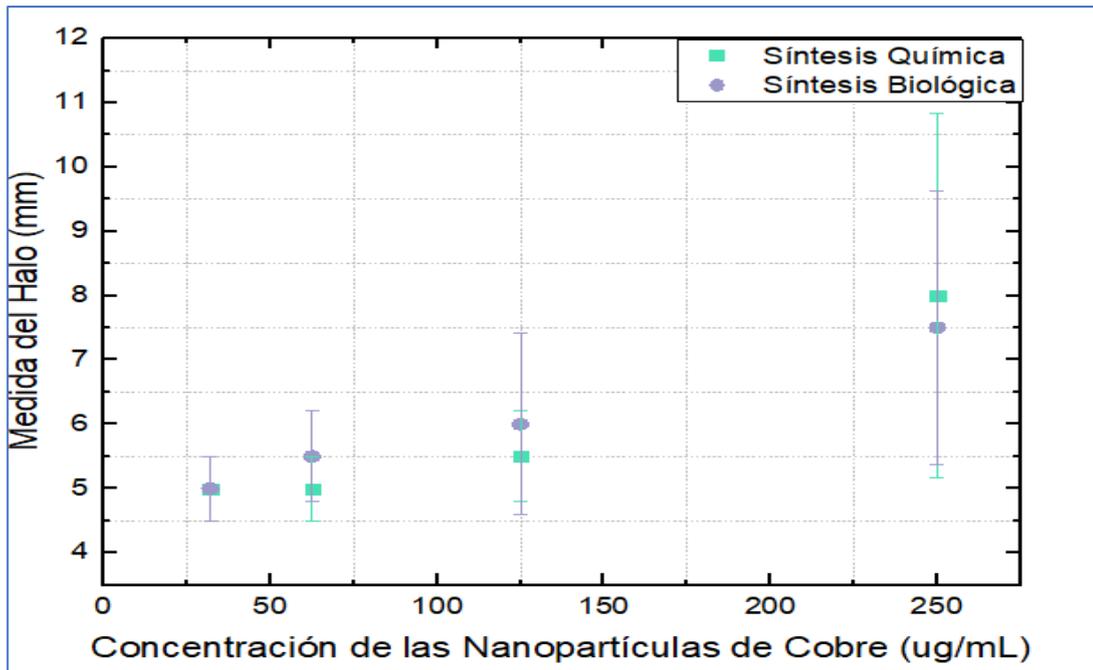


Figura 67-3: Influencia de la concentración en la actividad inhibitoria en (Gram-) a 48 h.
 Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

Tabla 36-3: Test de ANOVA para la bacteria Gram Negativa con CuNP's, conteo de UFC

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Valor de P
Factor A	3	2,77388E23	9,24627E22	--	--
Factor B	1	9,68E20	9,68E20	--	--
Interacción	3	4,17892E23	1,39297E23	--	--
Modelo	7	6,96248E23	9,9464E22	--	--
Error	0	0	--	--	--
Total	7	6,96248E23	--	--	--

Realizado por: Barba. M & Pachacama. J, 2021.

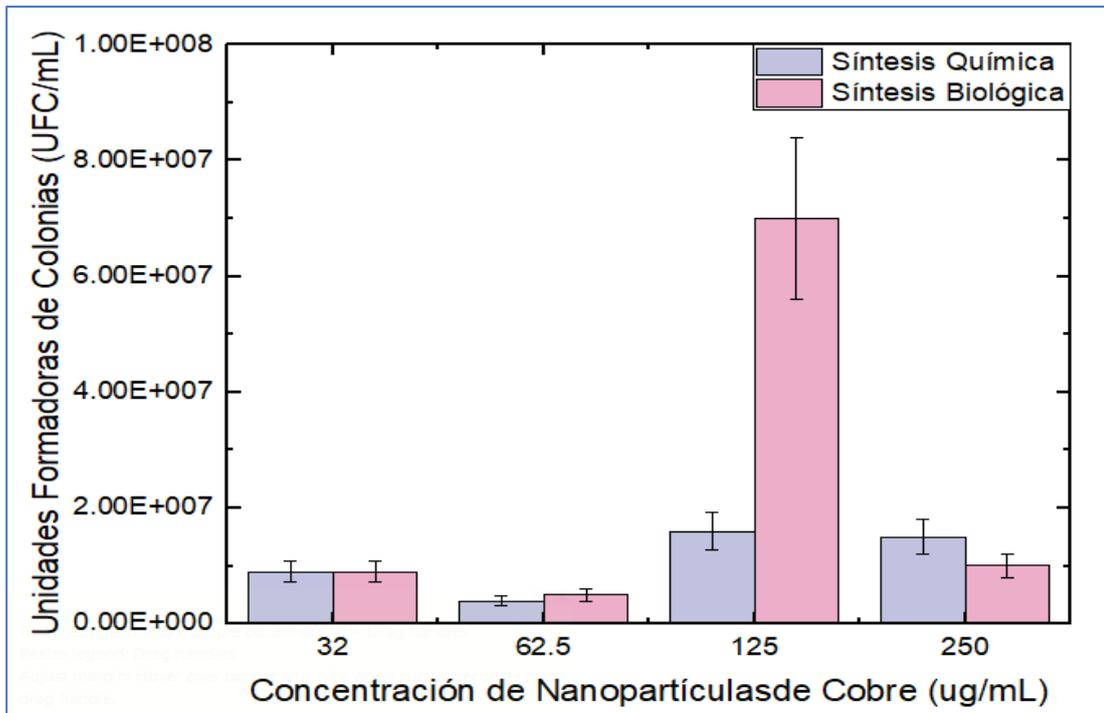


Figura 68-3: Influencia de la concentración de CuNP's en el conteo de colonias.
 Realizado por: Barba, M & Pachacama, J, 2021.

CONCLUSIONES

Mediante el método de Hummers modificado se logró obtener Óxido de Grafeno a partir de grafito natural, alcanzando una buena calidad del nanomaterial con una concentración de 580ppm, dentro de los diferentes procesos de caracterización obtenemos que por espectroscopía UV-Vis se obtiene un pico máximo en los 232[nm] y un hombro en los 301[nm], por espectroscopía FT-IR se obtiene señales que pertenecen a los grupos carbonilo, hidroxilo, epoxi, por medio de Microscopía de Barrido Electrónica SEM se observó al Óxido de Grafeno constituido por láminas, y por Microscopía de Fuerza Atómica AFM se observa que las láminas tienen un espesor de 1.6[nm].

Se obtuvo nanopartículas de plata y cobre por el método top-down, reduciendo el tamaño de las nanopartículas hasta escala nanométrica. Para la síntesis de nanopartículas de plata se utilizó nitrato de plata como material en bruto, como agente reductor al citrato de sodio, obteniendo un tamaño de partícula de 37[nm] con una absorbancia en el Ultravioleta de 445[nm], y para las nanopartículas de cobre se empleó como agente reductor al ácido ascórbico, y como material a granel al sulfato de cobre pentahidratado logrando un tamaño de 70[nm] con una absorbancia en el Ultravioleta en 515[nm]. Cuyas absorbancias en el Ultravioleta coinciden con las reportadas en literatura.

La síntesis biológica también denominada síntesis verde es un método relativamente nuevo en la síntesis de nanopartículas cuyo fin ha sido fomentar una química amigable, para la síntesis de nanopartículas de plata se utilizó extracto de las semillas de *Caléndula Officinalis* como agente reductor, presentando una absorbancia en el Ultravioleta de 437[nm] y un tamaño de partículas de 60[nm], mientras que para las nanopartículas de cobre se utilizó el extracto de *Citrus limon* como agente reductor dando una absorbancia de 400[nm] y un tamaño de partícula de 60[nm], en esta síntesis se obtienen nanopartículas cuyas absorbancias en el Ultravioleta están dentro del límite de las reportadas por literatura.

El Óxido de Grafeno funcionalizado con nanopartículas de cobre fue caracterizado por varias técnicas espectroscópicas una de ellas fue la Espectroscopía Ultravioleta Visible UV-Vis en la que se logró observar tres señales 2 pertenecientes al Óxido de Grafeno y una señal a los 200[nm] que corresponde a la formación de nanopartículas de óxido de cobre y cobre metálico. En la Espectroscopía de Transformada de Fourier FT-IR se reconoció los grupos característicos del Óxido de Grafeno carbonilos, epoxi, hidroxilos y tres torsiones adicionales de enlaces C-C y C-O que aparecieron en la síntesis de nanopartículas de cobre. La Espectroscopía Raman muestra que las señales D y G son muy parecidas a las señales del Óxido Grafeno con variación de intensidad. Finalmente, con la Espectroscopía de Rayos X por Dispersión de Energía EDS se

registró la composición química del nanohíbrido obteniendo cobre metálico, carbono, oxígeno y óxido de cobre. Todos estos resultados son coherentes con la literatura.

Las nanopartículas de plata fueron funcionalizadas con Óxido de Grafeno y caracterizadas por Espectroscopía UV-Vis obteniendo un espectro con tres picos, dos de ellos conformaron el espectro característico del óxido de grafeno y el otro pico característico de la plata metálica, en la técnica Espectroscópica Transformada de Fourier se observan los grupos del óxido de grafeno y también señales de los iones de plata, mediante la Espectroscopía Raman las señales D y G son similares en número de onda e intensidad al óxido de grafeno, con la Espectroscopía de Rayos X por emisión de Energía EDS comprobamos la funcionalización ya que en el análisis de composición química mostró plata metálica, carbono y oxígeno.

Las láminas de Óxido de Grafeno funcionalizadas con nanopartículas de plata fueron observadas a escala nanométrica mediante Microscopía de Barrido Electrónico SEM y Microscopía de Fuerza Atómica AFM revelando la incrustación de las nanopartículas sobre el nanomaterial.

La Microscopía de Barrido Electrónico SEM y Microscopía de Fuerza Atómica AFM determinaron la presencia de nanopartículas de cobre sobre las láminas de Óxido de Grafeno, determinando la funcionalización del nanohíbrido.

Para el estudio de la actividad antimicrobiana del Óxido de Grafeno funcionalizado con nanopartículas de plata en cepas bacterianas realizamos las técnicas de concentración inhibitoria mínima y concentración mínima bactericida; las cuales arrojaron resultados favorables en Gram Positivo y Gram Negativo. Además, se comprobó que el nanohíbrido GO + AgNPs B a concentraciones bajas (32,62.5 y 125) ug/mL inhiben a las bacterias provocando que estas sean sensibles al nanohíbrido, la concentración mínima bactericida en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* fue la de 62.5 ug/mL perteneciente al nanohíbrido GO +AgNP's B con un porcentaje de muerte bacteriana del 0.025% y 0.0116% respectivamente, estos valores están dentro de la norma de la concentración mínima bactericida ya que los nanohíbridos permiten sobrevivir menos del 0.1% de la cepa original.

La evaluación antimicrobiana del Óxido de Grafeno con nanopartículas de cobre en cepas Gram Positivas y Gram Negativas fue realizada mediante las técnicas de concentración inhibitoria mínima y concentración mínima bactericida en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, para la técnica CMI el nanohíbrido que presentó inhibición en ambas bacterias fue el de GO + CuNP's Q a una concentración de 250ug/mL permitiendo al nanohíbrido ser una posible alternativa de inhibición. La técnica CMB fue favorable en las dos cepas bacterianas, el mejor nanohíbrido fue el GO +CuNP's Q con un porcentaje del 0.0231%, y 0.0583%. en *S. aureus* y *E. coli* haciéndolas menos resistentes e induciendo el 99.9% de muerte bacteriana in vitro.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda continuar con el estudio de actividad antimicrobiana en diferentes cepas Gram Positivo y Gram Negativo con el fin de observar la influencia de los nanohíbridos y encontrar una alternativa ante la resistencia bacteriana.
- La dispersión de las nanopartículas metálicas es muy importante para tener un buen análisis de microscopía se recomienda utilizar un medio de dispersión adecuado que no modifique las características morfológicas de las nanopartículas.

BIBLIOGRAFÍA

BAGHIZADEH, A. ET AL. (2015) ‘Green synthesis of silver nanoparticles using seed extract of *Calendula officinalis* in liquid phase’, *Journal of Molecular Liquids*. Elsevier B.V., 207, pp. 159–163. doi: 10.1016/j.molliq.2015.03.029.

BOUCHAREB, S. ET AL. (2020) ‘Non-covalent functionalization of graphene oxide using self-assembly of silver-triphenylphosphine for bactericidal formulations’, *Materials Chemistry and Physics*. Elsevier B.V., 243(December 2019), p. 122598. doi: 10.1016/j.matchemphys.2019.122598.

CHEN, J. ET AL. (2013) ‘An improved Hummers method for eco-friendly synthesis of graphene oxide’, *Carbon*. Elsevier Ltd, 64(1), pp. 225–229. doi: 10.1016/j.carbon.2013.07.055.

COBOS, M. ET AL. (2020) ‘Graphene oxide–silver nanoparticle nanohybrids: Synthesis, characterization, and antimicrobial properties’, *Nanomaterials*, 10(2), pp. 1–22. doi: 10.3390/nano10020376.

COR, T. ET AL. (2003) ‘Resistencia bacteriana’, *Rev Cubana Med Milit*, 32(1), pp. 44–48.

DAVIES, J. & DAVIES, D. (2010) ‘Origins and Evolution of Antibiotic Resistance’, 74(3), pp. 417–433. doi: 10.1128/MMBR.00016-10.

DIMIEV, A. M. ET AL. (2014) ‘Terms of Use Mechanism of Graphene Oxide’, (3), pp. 3060–3068. doi: 10.1021/nn500606a.

DREYER, D. R., TODD, A. D. & BIELAWSKI, C. W. (2014) ‘Harnessing the chemistry of graphene oxide’, *Chemical Society Reviews*, 43(15), pp. 5288–5301. doi: 10.1039/c4cs00060a.

DURÁN, N. ET AL. (2007) ‘Antibacterial Effect of Silver Nanoparticles Produced by Fungal Process on Textile Fabrics and Their Effluent Treatment’, 3(2). doi: 10.1166/jbn.2007.022.

EL-KEMARY, M. ET AL. (2016) ‘*Calendula officinalis*-mediated biosynthesis of silver nanoparticles and their electrochemical and optical characterization’, *International Journal of Electrochemical Science*, 11(12), pp. 10795–10805. doi: 10.20964/2016.12.88.

GALDIERO, S. ET AL. (2011) ‘Silver nanoparticles as potential antiviral agents’, *Molecules*, 16(10), pp. 8894–8918. doi: 10.3390/molecules16108894.

GOEL, A. et al. (2018) ‘SC’, *Carbohydrate Polymers*. Elsevier Ltd. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.11.033.

GOVINDAPPA, M. et al. (2018) ‘Characterization, antibacterial, antioxidant, antidiabetic, anti-inflammatory and antityrosinase activity of green synthesized silver nanoparticles using *Calophyllum tomentosum* leaves extract’, *Results in Physics*, 9, pp. 400–408. doi: 10.1016/j.rinp.2018.02.049.

GUAJARDO, J. (2013) ‘Síntesis de nanopartículas de cobre mediante novedosa ruta química’, *Centro de investigación de materiales avanzados*, p. 136.

HEGAZY, M. A. & BORHAM, E. (2018) ‘Preparation and characterization of silver nanoparticles homogenous thin films’, *NRIAG Journal of Astronomy and Geophysics*. Elsevier B.V., 7(1), pp. 27–30. doi: 10.1016/j.nrjag.2018.04.002.

HORNA QUINTANA, G. et al. (2012) ‘Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas.’, *Revista Medica Herediana*, 16(1), p. 39. doi: 10.20453/rmh.v16i1.862.

IDDEX (2018) ‘Guía microbiológica para interpretar la concentración mínima inhibitoria (CMI)’, (Cmi), p. 3. Recuperado de: <https://www.idexx.es/files/mic-guía-microbiológica-es.pdf>.

INSHT (2015) ‘Seguridad y salud en el trabajo con nanomateriales’, *Blamey y otros*, 2(2), pp. 36–59. Recuperado de: <http://publicacionesoficiales.boe.eshttp://www.insht.es/catalogopublicaciones/>.

IRAVANI, S. (2011) ‘Green synthesis of metal nanoparticles using plants’, *Green Chemistry*, 13(10), pp. 2638–2650. doi: 10.1039/c1gc15386b.

ISSAABADI, Z., NASROLLAHZADEH, M. & SAJADI, S. M. (2017) ‘Green synthesis of the copper nanoparticles supported on bentonite and investigation of its catalytic activity’,

Journal of Cleaner Production. Elsevier Ltd, 142, pp. 3584–3591. doi: 10.1016/j.jclepro.2016.10.109.

JAHAN, M., LIU, Z. & LOH, K. P. (2013) ‘A graphene oxide and copper-centered metal organic framework composite as a tri-functional catalyst for HER, OER, and ORR’, *Advanced Functional Materials*, 23(43), pp. 5363–5372. doi: 10.1002/adfm.201300510.

KATSUMITI, A. et al. (2015) ‘Mechanisms of toxicity of Ag nanoparticles in comparison to bulk and ionic Ag on mussel hemocytes and gill cells’, *PLoS ONE*, 10(6), pp. 1–30. doi: 10.1371/journal.pone.0129039.

KHAN, A. et al. (2016) ‘A chemical reduction approach to the synthesis of copper nanoparticles’, *International Nano Letters*. Springer Berlin Heidelberg, 6(1), pp. 21–26. doi: 10.1007/s40089-015-0163-6.

KHANNA, P. K. et al. (2007) ‘Synthesis and characterization of copper nanoparticles ☆’, 61, pp. 4711–4714. doi: 10.1016/j.matlet.2007.03.014.

LEE, H. J. et al. (2011) ‘Biological synthesis of copper nanoparticles using plant extract’, *Technical Proceedings of the 2011 NSTI Nanotechnology Conference and Expo, NSTI-Nanotech 2011*, 1, pp. 371–374.

LEE, S. et al. (2011) ‘Biototoxicity of nanoparticles: Effect of natural organic matter’, *Journal of Nanoparticle Research*, 13(7), pp. 3051–3061. doi: 10.1007/s11051-010-0204-z.

LI, J. et al. (2014) ‘Antibacterial activity of large-area monolayer graphene film manipulated by charge transfer’, *Scientific Reports*, 4. doi: 10.1038/srep04359.

LIU, S. et al. (2011) ‘Antibacterial activity of graphite, graphite oxide, graphene oxide, and reduced graphene oxide: Membrane and oxidative stress’, *ACS Nano*, 5(9), pp. 6971–6980. doi: 10.1021/nn202451x.

LÓPEZ TÉLLEZ, G. et al. (2013) *Nanoestructuras metálicas*.

MARCANO, D. C. et al. (2010) ‘Improved Synthesis of Graphene Oxide’, *ACS Nano*, 4(8), pp. 4806–4814. doi: //doi.org/10.1021/nn1006368.

MARTÍNEZ OROZCO, R. D. (2015) ‘Funcionalización de óxido de grafeno con nanopartículas de paladio y su aplicación en la detección de hidrógeno’, *Nstituto Potosino De Investigación Científica Y Tecnológica, a.C. Posgrado*, p. 80.

MÁSTER, T. D. E. F. I. N. D. E. (2017) ‘Módulo De Química Inorgánica E Ingeniería Química Nanopartículas De Plata : Preparación , Caracterización Y Propiedades Con’, *UNED Facultad de Ciencias*, p. 8. Available at: http://e-spacio.uned.es/fez/eserv/bibliuned:master-Ciencias-CyTQ-Msanchez/Sanchez_Moreno_Minerva_TFM.pdf.

MENAZEA, A. A., ABDELBADIE, S. A. & AHMED, M. K. (2020) ‘Manipulation of AgNPs coated on selenium/carbonated hydroxyapatite/ ε-polycaprolactone nano-fibrous via pulsed laser deposition for wound healing applications’, *APPLIED SURFACE SCIENCE*. Elsevier B.V., p. 145299. doi: 10.1016/j.apsusc.2020.145299.

MENAZEA, A. A. & AHMED, M. K. (2020) ‘Nano-Structures & Nano-Objects Silver and copper oxide nanoparticles-decorated graphene oxide via pulsed laser ablation technique : Preparation , characterization , and photoactivated antibacterial activity’, *Nano-Structures & Nano-Objects*. Elsevier B.V., 22, p. 100464. doi: 10.1016/j.nanoso.2020.100464.

ML, M., ERRECALDE, J. & MESTORINO, N. (2011) ‘Resistencia bacteriana a los antimicrobianos ocasionada por bombas de eflujo . Impacto en la multirresistencia Bacterial antibiotic resistance by efflux pumps . Multidrug resistance impact’, 31(2), pp. 40–53.

MOHANPURIA, P., RANA, N. K. & YADAV, S. K. (2008) ‘Biosynthesis of nanoparticles: Technological concepts and future applications’, *Journal of Nanoparticle Research*, 10(3), pp. 507–517. doi: 10.1007/s11051-007-9275-x.

MOKKAPATI, V. R. S. S. et al. (2018) ‘Bacterial response to graphene oxide and reduced graphene oxide integrated in agar plates’, *Royal Society Open Science*, 5(11), p. 3. doi: 10.1098/rsos.181083.

MONGE, M. (Real S. E. de Q. (2009) ‘Anales de química.’, *Real Sociedad Española de Química*, ISSN 1575-3417, N^o. 1, 2009, págs. 33-41, (1), pp. 33–41.

MORONES, J. R. et al. (2005) ‘The bactericidal effect of silver nanoparticles’,

Nanotechnology, 16(10), pp. 2346–2353. doi: 10.1088/0957-4484/16/10/059.

OKONKO, I. O. et al. (2009) ‘Antibiotics Sensitivity and Resistance Patterns of Uropathogens to Nitrofurantoin and Nalidixic Acid in Pregnant Women with Urinary Tract Infections in Ibadan , Nigeria Department of Veterinary Microbiology and Parasitology , Faculty of Veterinary Medicin’, 4(2), pp. 105–109.

PALZA, H., DELGADO, K. & PINOCHET, I. (2015) ‘Improving the Metal Ion Release from Nanoparticles Embedded in a Polypropylene Matrix for Antimicrobial Applications’, 41232, pp. 1–8. doi: 10.1002/app.41232.

PANÁČEK, A. et al. (2018) ‘Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it’, *Nature Nanotechnology*. Springer US, 13(1), pp. 65–71. doi: 10.1038/s41565-017-0013-y.

PÉREZ, A. et al. (2017) *No 主観的健康感を中心とした在宅高齢者における健康関連指標に関する共分散構造分析Title*, *BMC Public Health*. Available at: <https://ejournal.poltektegal.ac.id/index.php/siklus/article/view/298%0Ahttp://repositorio.unan.edu.ni/2986/1/5624.pdf%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.jana.2015.10.005%0Ahttp://www.biomedcentral.com/1471-2458/12/58%0Ahttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&P>.

QUINTANA, G. et al. (2005) ‘Minimal Inhibitory Concentration and Minimal Bactericidal Concentration of ciprofloxacin in uropathogens isolated at Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas’, *Rev Med Hered*, 16(1), p. 39.

RAMADHANI KHIJA, LUDOVICK UTTOH, M. K. T. (2015) ‘Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata por espectroscopia de infrarrojos (FT-IR), UV-Vis, absorción atómica de llama (FAAS) y microscopía de barrido electrónico (SEM)’, *Ekp*, 13(3), pp. 1576–1580.

RENAU-PIQUERAS, J. & FAURA, M. (1965) ‘Principios básicos del Microscopio Electrónico de Barrido’, *Centro de investigación hospital ‘La Fé’*, pp. 73–92.

SAGA, T. & YAMAGUCHI, K. (2009) ‘History of Antimicrobial Agents and Resistant’, 137(3), pp. 103–108.

SAINI, A. et al. (2019) ‘Synthesis of Graphene Oxide using Modified Hummer ’ s Method and its Reduction using Hydrazine Hydrate’, *International Journal of Engineering Trends and*

Technology, 40(October 2016), pp. 67–71. doi: 10.14445/22315381/IJETT-V40P211.

SANTANA CABELLO, R. & GAÑÁN ROJO, P. (2019) ‘Derecho y nanotecnología: definiendo lo invisible’, *Revista de la Facultad de Derecho y Ciencias Políticas*, 49(131), pp. 507–520. doi: 10.18566/rfdcp.v49n131.a11.

SENGUPTA, A., KUMAR, C. & EDITORS, S. (2015) *Engineering Materials Introduction to Nano*. Recuperado de: <http://www.springer.com/series/4288>.

SHENDE, S. et al. (2015) ‘Green synthesis of copper nanoparticles by Citrus medica Linn. (Idilimbu) juice and its antimicrobial activity’, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(6), pp. 865–873. doi: 10.1007/s11274-015-1840-3.

SHRESTHA, N. & BHATTARAI, A. (2016) ‘Determination of Ascorbic Acid in Different Citrus Fruits of Kathmandu Valley’, *Journal of Medical and Biological Science Research*, 2(1), pp. 9–14. Recuperado de: <http://pearlresearchjournals.org/journals/jmbsr/index.html>.

SIRELKHATIM, A. et al. (2015) ‘Review on zinc oxide nanoparticles: Antibacterial activity and toxicity mechanism’, *Nano-Micro Letters*. Springer Berlin Heidelberg, 7(3), pp. 219–242. doi: 10.1007/s40820-015-0040-x.

SOLACHE-CARRANCO, H. & JU, G. (2009) ‘Estudio de la cristalización de Cu₂O y su caracterización por difracción de rayos X, espectroscopia Raman y fotoluminiscencia’, 55(5), pp. 393–398.

SONDI, I. & SALOPEK-SONDI, B. (2004) ‘Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria’, *Journal of Colloid and Interface Science*, 275(1), pp. 177–182. doi: 10.1016/j.jcis.2004.02.012.

TAROCO, R., SEIJA, V. & VIGNOLI, R. (2008) ‘Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica’, *Temas de Bacterología y Virología Médica*, 36(Cim), pp. 663–671.

TENE, T. et al. (2020) ‘Toward large-scale production of oxidized graphene’, *Nanomaterials*, 10(2), pp. 1–11. doi: 10.3390/nano10020279.

WANG, X. et al. (2005) ‘Chitosan-metal complexes as antimicrobial agent: Synthesis,

characterization and Structure-activity study', *Polymer Bulletin*, 55(1–2), pp. 105–113. doi: 10.1007/s00289-005-0414-1.

WHITEHEAD, K. A. et al. (2017) 'Antimicrobial activity of graphene oxide-metal hybrids', *International Biodeterioration and Biodegradation*. Elsevier Ltd, 123, pp. 182–190. doi: 10.1016/j.ibiod.2017.06.020.

XIU, Z. M. et al. (2012) 'Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles', *Nano Letters*, 12(8), pp. 4271–4275. doi: 10.1021/nl301934w.

YELIL ARASI, A. et al. (2009) 'The structural properties of Poly(aniline)-Analysis via FTIR spectroscopy', *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 74(5), pp. 1229–1234. doi: 10.1016/j.saa.2009.09.042.



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

**DIRECCIÓN DE BIBLIOTECAS Y RECURSOS DEL APRENDIZAJE UNIDAD DE PROCESOS
TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y DOCUMENTAL**

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 28 / 09 / 2021

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: <i>Marcelo Santiago Barba Nicolalde Joseth Alejandra Pachacama Ruiz</i>
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: <i>Ciencias</i>
Carrera: <i>Física</i>
Título a optar: <i>Físico</i>
f. Analista de Biblioteca responsable: <i>Ing. Leonardo Medina Ñuste MSc.</i>

**LEONARDO FABIO
MEDINA NUSTE**

Firmado digitalmente por
LEONARDO FABIO MEDINA
NUSTE
Fecha: 2021.09.28 09:40:29
-05'00'



1837-DBRA-UTP-2021