

Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Facultad de Ciencias



POSGRADO EN CIENCIAS APLICADAS
Nanociencia, Nanotecnología y Energías
Alternas

Validación de la capacidad bactericida
de aditivos basados en nanopartículas
de cobre y plata para pinturas
antivegetativas

Tesis para obtener el grado de:
MAESTRA EN CIENCIAS APLICADAS

Presenta:
I.N.E.R. Alejandra Durán Almendárez

Director de tesis: Dr. Facundo Ruiz

San Luis Potosí, S.L.P., febrero 2019



Título:

VALIDACIÓN DE LA CAPACIDAD BACTERICIDA DE ADITIVOS BASADO EN
NANOPARTÍCULAS DE COBRE Y PLATA PARA PINTURAS ANTIVEGETATIVAS

Nombre de la estudiante:

ALEJANDRA DURÁN ALMENDÁREZ

Comité que acepta la tesis:

DR. FACUNDO RUIZ
Director de tesis

DRA. NEREYDA NIÑO MARTÍNEZ
Sinodal

DRA. IDANIA DE ALBA MONTERO
Sinodal

CREDITOS INSTITUCIONALES

El presente trabajo de tesis registrado ante CONACyT con número de registro de CVU: 778609 y número de beca: 441467, el cual, se llevó a cabo en los laboratorios de Caracterización de materiales, Microbiología y Síntesis química de la Facultad de Ciencias, en la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, bajo la dirección del Dr. Facundo Ruiz.

CONTENIDO



1 INTRODUCCION 1

- 1.1 Justificación..... 3
- 1.2 Hipótesis..... 4
- 1.3 Objetivos 4
 - 1.3.1 Objetivo general 4
 - 1.3.2 Objetivos específicos..... 4



2 MARCO TEORICO 5

- 2.1 Nanotecnología y nanomateriales..... 5
- 2.2 Nanopartículas metálicas 6
- 2.3 Métodos de síntesis..... 7
 - 2.3.1 Síntesis electroquímica 9
 - 2.3.2 Nanopartículas de Cobre..... 11
 - 2.3.3 Nanopartículas de Plata12
- 2.4 Nanopartículas antimicrobianas14
- 2.5 Invasión en estructuras marinas.....15
 - 2.5.1 Bacterias marinas16
 - 2.5.2 Formación de la biopelícula.....17
- 2.6 Pinturas antivegetativas18



3 METODOLOGIA EXPERIMENTAL 21

- 3.1 Síntesis de nanopartículas de cobre.....21
- 3.2 Síntesis de nanopartículas de plata22
- 3.3 Preparación de pinturas23
- 3.4 Evaluación antimicrobiana23

3.4.1	Método de microdilución en placa	24
3.4.2	JIS Z 2801	25
3.5	Equipos empleados para la caracterización de las nanopartículas	27
3.5.1	Espectroscopía ultravioleta-visible	27
3.5.2	Microscopio Electrónico de Transmisión ...	28
3.5.3	Dispersión Dinámica de Luz.....	29
3.5.4	Difracción de Rayos X.....	30



4 RESULTADOS Y DISCUSION 32

4.1	Nanopartículas de cobre y plata	32
4.2	Caracterización	33
4.2.1	Espectroscopía UV-Visible	33
4.2.2	Microscopio Electrónico de Transmisión ...	35
4.2.3	Dispersión Dinámica de Luz y Potencial Z	37
4.2.4	Difracción de Rayos X.....	38
4.3	Ensayos antimicrobianos.....	40
4.3.1	Método de microdilución en placa	40
4.3.2	Prueba superficial	42



5 CONCLUSIONES 45



6 REFERENCIAS 47

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Rutas para la obtención de nanopartículas.....	8
Figura 2. Proceso general de la síntesis electroquímica.....	10
Figura 3. Etapas del mecanismo de formación de la biopelícula.....	17
Figura 4. Reactor empleado para la síntesis de nanopartículas de cobre.....	22
Figura 5. Solución inicial de la síntesis de nanopartículas de plata.....	22
Figura 6. Esquema de placa de 96 pozos utilizada para la prueba de microdilución.....	25
Figura 7. Representación esquemática JIS Z 2801.....	26
Figura 8. Espectrómetro UV-Vis USB4000 Ocean Optics Inc.....	27
Figura 9. Microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1230.....	28
Figura 10. Esquemización del radio hidrodinámico medido por el DLS.....	29
Figura 11. Equipo de Dispersión Dinámica de Luz ZETASIZER Nano-ZS90.....	30
Figura 12. Difractómetro de Rayos X Empyrean Alpha 1.....	31
Figura 13. Polvo de nanopartículas de cobre.....	32
Figura 14. Solución final de las nanopartículas de plata.....	33
Figura 15. Espectro UV-Visible de las nanopartículas de cobre.....	34
Figura 16. Espectro de absorción UV-Vis de las nanopartículas de plata.....	34
Figura 17. Morfología, tamaño y distribución de nanopartículas de cobre a través del microscopio electrónico de transmisión.....	35
Figura 18. Imágenes TEM e histograma de distribución de tamaño de las nanopartículas de plata.....	36
Figura 19. Grafica del tamaño de partícula en función del número de nanopartículas de cobre.....	37
Figura 20. Distribución de tamaño de AgNPs obtenidas mediante DLS.....	38
Figura 21. Patrón de difracción de rayos X de las nanopartículas de cobre.....	39
Figura 22. Concentración mínima inhibitoria y bactericida de las CuNPs.....	40
Figura 23. CMI y CMB de las nanopartículas plata contra <i>B. subtilis</i>	41

Figura 24. CMI y CMB de CuNPs contra <i>N. occulata</i>	41
Figura 25. Concentración mínima inhibitoria y bactericida de AgNPs usando el alga.....	42
Tabla 1. Literatura sobre la síntesis por métodos electroquímicos de nanopartículas de cobre.	11
Tabla 2. Estudios sobre la síntesis de nanopartículas de plata por métodos electroquímicos.	13
Tabla 3. Composición de la pintura Comex Vinimex.	23
Tabla 4. Valores obtenidos en el DLS de las NPs de cobre y plata.....	37
Tabla 5. Resultados del refinamiento de Rietveld de las CuNPs.	39
Tabla 6. CMI y CMB de las nanopartículas sintetizadas contra microorganismos marinos.....	40
Tabla 7. Valores de la actividad antimicrobiana de pinturas adicionadas con nanopartículas de cobre y plata, evaluadas contra <i>E. coli</i>	43

ABREVIATURAS

AgNPs	Nanopartículas de plata
ATCC	American Típe Culture Collection
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
CMB	Concentración Mínima Bactericida
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CuNPs	Nanopartículas de cobre
DLS	Dispersión Dinámica de Luz
DRX	Difracción de Rayos X
OMI	Organización Marítima Internacional
NPs	Nanopartículas
TBT	Tributil de estaño
TEM	Microscopio Electrónico de Transmisión
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UV-Vis	Ultravioleta-Visible

1

INTRODUCCION



La biopelícula se puede definir como “El fenómeno indeseable de adherencia y acumulación de depósitos bióticos, sobre una superficie artificial sumergida o que se encuentre en contacto con el agua del mar. Esta acumulación o incrustación consiste en una película orgánica formada por microorganismos adheridos en una matriz polimérica creada por ellos mismos, donde pueden llegar y quedar atrapadas partículas inorgánicas (sales y/o productos de corrosión). Esta biopelícula compuesta por microorganismos (micropelícula), puede dar lugar a la acumulación de macroorganismos (macropelícula)” (Eguía López, 2000).

Uno de los métodos probablemente más efectivo para evitar las biopelículas es el uso de pinturas antivegetativas. Se aplican sobre espacios que se encuentran en el océano, liberando especies biocidas que deben degradarse en poco tiempo para que no se produzca una acumulación en el medio ambiente (Kaiser et al., 2013).

Un barco sin aplicación de estas pinturas, puede llegar a acumular en la zona sumergida más de 100 kg de biopelícula por m², lo que implica un aumento notable del consumo de combustible, pérdida de maniobra y degradación del casco (Vasco & Valencia, 2008).

Las pinturas antivegetativas también se utilizan en diversas infraestructuras marinas (por ejemplo: instalaciones de extracción de hidrocarburos, centrales eléctricas, instalaciones de acuicultura) así como en instrumentación oceanográfica (Vasco & Valencia, 2008).

Históricamente, se han empleado como aditivos en pinturas, compuestos de metales pesados tales como el arsénico, cobre, plomo, mercurio y derivados orgánicos como el tributil de estaño (TBT) (Almeida, et al., 2007). La OMI (Organización Marítima Internacional) en 2003 prohibió el TBT debido a los daños letales tanto en microorganismos, como a animales invertebrados y vertebrados (Austen & McEvoy, 1997).

Con las recientes restricciones sobre el uso de revestimientos tóxicos en muchos países, se han estado buscando alternativas y reemplazos que puedan proveer un mayor rendimiento antivegetativo a largo plazo y asimismo que sean respetuosos con el medio ambiente.

Aunque es posible neutralizar, hasta cierto punto, la acumulación de organismos marinos, sus componentes biocidas convencionales son de eficacia sencilla y pueden ocasionar daños al entorno marino, además, los microorganismos pueden desarrollar resistencia a esas sustancias. Debido a ello, la industria de la pintura está considerando emplear otras estrategias, sustituyendo los biocidas por nanomateriales para evitar la incrustación biológica, tienen la intención de utilizar nanopartículas adicionadas en pinturas, por ejemplo, el dióxido de sílice como endurecedor (Saber et al., 2012), como absorbente de luz UV utilizar dióxido de titanio (Fujishima et al., 2000; Salthammer & Fuhrmann, 2007) u óxido de zinc (Gladis et al., 2010) o como agentes antimicrobianos utilizando nanometales (Cioffi et al., 2005; Cooney, 1995). Debido al tamaño de las nanopartículas las hace capaces de permanecer más tiempo en las formulaciones de revestimiento marino, liberando iones lentamente para proporcionar un rendimiento antivegetativo a largo plazo (Gladis et al., 2010).

El surgimiento de la nanociencia y la nanotecnología en la última década ha mostrado interés para explorar el efecto microbicida de las nanopartículas metálicas sobre una amplia variedad de microorganismos, tales como virus, bacterias y hongos. Dicho efecto, se ha atribuido a su diámetro pequeño y a su alta relación área/volumen, lo que les permite tener mayor contacto e interactuar estrechamente con las membranas microbianas y así poder internarse con facilidad en los microorganismos (Hajipour et al., 2012). Entre las nanopartículas más importantes que han demostrado tener propiedades antimicrobianas son las de plata (Cioffi et al., 2005), óxido de zinc (Gladis et al., 2010), cobre (Cooney, 1995) y óxidos de hierro (Seil & Webster, 2012). Las primeras tres presentan ésta propiedad en su forma macroscópica, mientras que los óxidos de hierro únicamente resultan ser microbicidas en forma nanoestructurada (Seil & Webster, 2012).

La gran capacidad de las nanopartículas de cobre y plata de inhibir el crecimiento de microorganismos y causar su muerte, hace que estos materiales sean considerados como prometedores agente bactericidas para ser empleados en recubrimientos superficiales.

En este trabajo, se prepararon nanopartículas basado en el método electroquímica para la obtención de las muestras de cobre y plata. Se adicionaron en una pintura, para posteriormente realizarse un análisis de la capacidad bactericida bajo la norma JIS Z 2801, así como, el método de microdilución en placa con base en los estándares *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI).

La caracterización de las partículas sintetizadas, se llevó a cabo mediante las siguientes técnicas: Espectroscopía UV-Vis, para determinar el plasmón característico que puede absorber o transmitir el material. Microscopía Electrónica de Transmisión, para observar la morfología y distribución de tamaño de las muestras y Dispersión Dinámica de Luz utilizada para determinar el tamaño promedio de las nanopartículas en suspensión.

1.1 JUSTIFICACION

El uso desmedido de compuestos biocidas como cobre, estaño, oxido de mercurio y óxido de zinc en pinturas antivegetativas aplicadas en superficies artificiales sumergidas en el mar, tiene como consecuencia el deterioro del medio ambiente que lo rodea.

En el presente trabajo se pretende explorar la capacidad biocida de aditivos para pinturas a base de nanopartículas de cobre y plata, contra cepas bacterianas de origen marino del genero *Bacillus* y el alga *N. occulata*, con el propósito de disminuir los efectos colaterales, derivados del uso de este tipo de aditivos.

1.2 HIPOTESIS

Es posible producir un aditivo para pinturas antivegetativas utilizando compuestos nanoestructurados de cobre y plata, empleando menor cantidad de dichos metales.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antibacterial de una pintura adicionada con nanopartículas de cobre y plata contra cepas del género *Bacillus*.

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Sintetizar partículas nanométricas de cobre y plata reproducibles, usando el método electroquímico.

Caracterizar las partículas obtenidas a través del Microscopio Electrónico de Trasmisión (TEM), Difracción de Rayos X (DRX), Espectroscopía Ultravioleta-Visible y Dispersión Dinámica de Luz (DLS).

Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) de las nanopartículas contra tres cepas de origen marino *Bacillus altitudinis*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus subtilis* y del alga *Nannochloropsis oculata*.

Evaluar la actividad antimicrobiana, mediante la norma JIS Z 2801, de una pintura adicionada con nanopartículas de cobre y plata.

2

MARCO TEORICO



En este segmento se abordarán los conceptos básicos de la nanotecnología, así como las propiedades y los diferentes tipos de síntesis para la obtención de las nanopartículas metálicas. Se revisará el estado del arte del método electroquímico y se compararan diferentes condiciones de reacción y resultados obtenidos por otros autores. También se estudiará la problemática de la contaminación en superficies que se encuentran en contacto con agua de mar, los mecanismos de formación de las biopelículas, los microorganismos más comunes en ambientes marinos y la posible solución con la aplicación de pinturas antiincrustantes. La revisión bibliográfica del uso de nanopartículas antimicrobianas adicionadas en pinturas es corta, permitiéndonos el desarrollo de una tecnología con amplio potencial.

2.1 NANOTECNOLOGIA Y NANOMATERIALES

La nanociencia estudia los fenómenos y la manipulación de materiales a escala nanométrica. A su vez, la nanotecnología abarca la producción y aplicación de materiales a escalas que van desde los átomos o moléculas individuales hasta materiales con dimensiones de 100 nm (nanómetros) en sistemas biológicos, físicos y químicos (Royal Society). Además de la integración de estructuras nanométricas obtenidas en sistemas de mayor dimensión, teniendo como objetivo el desarrollo e innovación nuevos dispositivos de impacto en diferentes áreas.

El término nanomateriales abarca todos aquellos materiales desarrollados (ya sean cerámicos, metales, semiconductores, polímeros, o bien, una combinación de estos), con al menos una dimensión en la escala nanométrica (Shahcheraghi et al., 2018).

Se pueden clasificar en cuatro tipos de acuerdo al número de dimensiones que se encuentren entre 1 y 100 nm (Gutiérrez, 2005; López et al., 2013):

- a) Cero dimensional (0D): son aquellos nanomateriales donde las tres dimensiones son menores a 100 nm, a estos corresponden las nanopartículas.
- b) Unidimensional (1D): teniendo una longitud variable, conservan dos dimensiones en el rango nanométrico, como es el caso de los nanotubos, nanoalambres, nanofibras, entre otros.
- c) Bidimensional (2D): los nanorecubrimientos, películas delgadas y multicapa, son los tipos de materiales que mantienen solo una dimensión a escala de nanómetros, con áreas de tamaño definido, pero manteniendo su espesor <100 nm.
- d) Tridimensional (3D): son sólidos tridimensionales que están formados por unidades nanométricas y no poseen ninguna dimensión menor a cien nanómetros, lo son como los policristales, nanobobinas, etcétera.

Las diferentes propiedades que adquieren los materiales a escala nanométrica, que difieren de los sistemas macroscópicos, tales como fuerza, conductividad, color y toxicidad, permiten aplicaciones tecnológicas en prácticamente todas las áreas de la ciencia y la tecnología. Actualmente, se comercializan productos con nanoestructuras que incrementan su funcionamiento, como sensores, dispositivos opto-electrónicos, celdas solares, agentes antimicrobianos, vías de transporte, liberación de fármacos y nutrientes, entre muchos otros (Gutiérrez, 2005).

2.2 NANOPARTICULAS METALICAS

Las nanopartículas (NPs) específicamente, han existido en el planeta por siglos, en algunas civilizaciones antiguas ya se utilizaban aprovechando sus propiedades ópticas y medicinales (Gutiérrez, 2005).

Las nanopartículas metálicas en particular, poseen propiedades interesantes con aplicaciones en diversas áreas. Respecto a sus primeros usos, un caso de gran interés es el

vaso de Lycurgus, creado por los romanos en el siglo IV DC, que quizá por accidente contenía nanopartículas. Su color es verde si la luz con la que se observa es reflejada, pero si la luz es transmitida a través de él, es de color rojo. Un análisis de este vaso muestra que está compuesto de una matriz de vidrio que contiene una pequeña cantidad de nanopartículas de oro y plata, ellas son las responsables del fenómeno óptico (Gutiérrez, 2005; Liz-Marzán, 2004).

Aun cuando se tenían antecedentes de la utilización de nanopartículas metálicas, no fue hasta 1857 que Faraday realizó el primer estudio de síntesis y propiedades de coloides de oro (Gutiérrez, 2005; Turkevich & Cooper, 1951). Desde esa época hasta la fecha, grandes avances se han logrado en el conocimiento de las nanopartículas metálicas. Diversos métodos de síntesis químicos y físicos se han desarrollado con la finalidad de poder diseñar sus dimensiones, forma, composición y modificadores de superficie, para lograr controlar las propiedades y características y sea posible aplicarlas en diversas tecnologías, en campos como la medicina, química, física, biología, energías renovables, electrónica, óptica, entre muchos otros (Gutiérrez, 2005; Liz-Marzán, 2004).

2.3 METODOS DE SINTESIS

En las últimas décadas se han desarrollado un gran número de métodos para la preparación de nanopartículas. Generalmente, existen dos rutas para su obtención (López et al., 2013) que se esquematizan en la Figura 1:

1. El método top-down que consiste en la reducción de partículas macroscópicas a tamaño nanométrico, en este método es muy difícil obtener diámetros de partículas homogéneas y menores a diez nanómetros. Aquí, se emplean materiales macroscópicos sofisticados y técnicas costosas. Estos incluyen fotolitografía, litografía con haz de electrones, epitaxia de haz molecular, entre otros (Walt, 2002).
2. Por otra parte, el método bottom-up en donde nanoestructuras se obtienen a partir de átomos como bloques de construcción. Existen procedimientos donde es

posible generar partículas uniformes, frecuentemente de distintos tamaños, formas y estructuras. Son procedimientos menos costosos y presentan la capacidad de alcanzar una escala industrial.

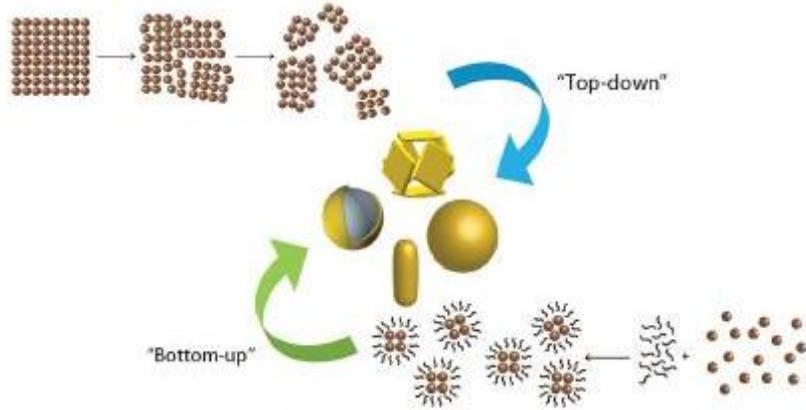


Figura 1. Rutas para la obtención de nanopartículas (Geonmonond et al., 2018).

Existen básicamente tres extensas áreas de métodos para la obtención de materiales nanoestructurados: métodos físicos, métodos químicos y métodos biológicos (López et al., 2013).

- Los métodos físicos se caracterizan por ser procesos en los que no hay transformaciones químicas, normalmente se comienza con el material del cual se quieren obtener NPs. Entre los métodos físicos se encuentran los de ablación laser, termólisis, irradiación con microondas, deposición de vapor y la molienda (Reetz & Helbig, 1994).
- Los métodos químicos conllevan reacciones químicas, generalmente de reducción de iones metálicos para la formación de nanopartículas metálicas o de polimerización de óxidos metálicos. Son probablemente los métodos de síntesis más utilizados debido a su potencial para ser escalados. La reducción química permite controlar adecuadamente el tamaño, distribución y forma. Otros métodos químicos son la reducción radiolítica, fotólisis, descomposición sonoquímica y electroquímica (Keki et al., 2000).

- Los métodos biológicos han surgido como una nueva opción, debido principalmente a la creciente necesidad por utilizar métodos de síntesis más amigables con el medio ambiente. Son aquellos que emplean microorganismos (bacterias, levaduras y hongos) o extractos de plantas para lograr la reducción de varios tipos de iones metálicos (Vigneshwaran et al., 2007).

2.3.1 SÍNTESIS ELECTROQUÍMICA

La síntesis electroquímica consiste en utilizar como fuente de los átomos metálicos un ánodo de sacrificio. Este ánodo es oxidado en presencia de un electrolito y un estabilizante. Los cationes metálicos se dirigen hacia el cátodo donde son reducidos produciendo los átomos que formarán las nanopartículas (Roucoux et al., 2002).

Los primeros en describir una técnica electroquímica para la síntesis de nanopartículas fueron Reetz & Helbig en 1994, en la cual, la lámina de metal fue disuelta anódicamente y el compuesto metálico cerovalente se formó para reducirse al cátodo, dando lugar a partículas metálicas de paladio estabilizadas por sales de tetra-alquil amonio.

El proceso general de la síntesis electroquímica se puede dividir en seis etapas elementales mostrados en la Figura 2 (Tan et al., 2004).

1. Disolución oxidativa del ánodo de sacrificio, el cual se usa como fuente metálica.
2. Migración de los iones metálicos hacia el cátodo.
3. La reducción de iones a un estado de valencia cero en el cátodo.
4. Formación de partículas por nucleación y crecimiento.
5. Limitación del crecimiento por agentes estabilizantes.
6. Precipitación de las partículas.

Ventajas del método electroquímico:

- No existe contaminación con subproductos como en la reducción química.
- Es fácil aislar las partículas ya que precipitan fuera del disolvente cuando se forman.

- La modificación de las variables experimentales como el potencial eléctrico y la densidad de corriente es sencillo, con la posibilidad de controlar eficientemente fenómenos de nucleación, crecimiento y velocidad de reacción (Roucoux et al., 2002).
- Se pueden obtener partículas con una alta pureza.
- Posibilidad de controlar el tamaño de nanopartículas.
- Además, no es necesario el uso de equipos costosos, cámaras de vacío, ni preparación sofisticada (Khaydarov et al., 2009).

La clave del éxito de los métodos electroquímicos es la elección correcta de los agentes químicos y las condiciones del proceso (Khaydarov et al., 2009).

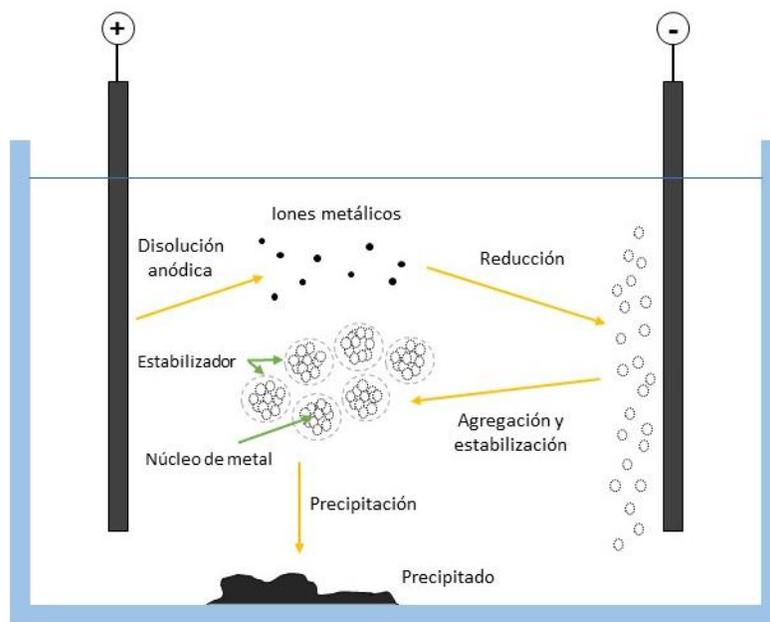


Figura 2. Proceso general de la síntesis electroquímica (Reetz & Helbig, 1994).

2.3.2 NANOPARTÍCULAS DE COBRE

Debido a un alto valor comercial de los metales como oro y plata, se ha centrado considerablemente el interés en las nanopartículas de cobre (CuNPs), además de que es uno de los materiales más utilizados en el mundo. Al igual que las nanopartículas de plata, tiene aplicaciones potenciales y una gran importancia en múltiples campos (Cheng et al., 2006).

Estudios previos sobre la síntesis de nanopartículas de cobre u óxido de cobre, por métodos electroquímicos se comparan en la Tabla 1.

Tabla 1. Literatura sobre la síntesis por métodos electroquímicos de nanopartículas de cobre.

Electrodo	Electrólito	Parámetros	Tamaño (nm)	Autores Tipo de material
Ánodo: Cobre Cátodo: Grafito	CuSO ₄	3 V TR: 20 min	20	Hashemipour et al., 2011
Cobre	CuSO ₄	4V TR: 30 min	45	Raja et al., 2008
Cobre	CuSO ₄	15 V	24	Theivasanthi & Alagar, 2011
Ánodo: Cobre Cátodo: Platino	NaCl	5 V 45 min Asistida con ultrasonido	24	Shahcheraghi et al., 2018 CuO
Cobre	NaCl NaOH K ₂ Cr ₂ O ₇	70 °C 1 hora DC: 500 a 1100 A/m ²	35	Yang et al., 2006 CuO
Ánodo: Cobre Cátodo: Acero inoxidable	NaNO ₃	Horas Densidad de corriente constante	20-50	G. Q. Yuan et al., 2007 CuO

DC: Densidad de corriente; TR: tiempo de reacción; CC: corriente constante.

Se han publicado trabajos sobre la síntesis de varios tipos de nanoestructuras de Cu mediante el proceso electroquímico; sin embargo, la mayor parte se ha realizado utilizando electrodos de cobre y de electrolito sulfato de cobre, como en los proyectos de Hashemipour, Raja y Theivasanthi, que, usando distintos parámetros, obtuvieron partículas menores a 45 nm. Para Shahcheraghi y colaboradores, una síntesis asistida con ultrasonido (28 kHz y 160 W), les proporcionó algunas ventajas como: una alta pureza del material evita la aglomeración y como consecuencia, control de tamaño y forma de las NPs de óxido de cobre (Hashemipour et al., 2011; Raja et al., 2008; Shahcheraghi et al., 2018; Theivasanthi & Alagar, 2011).

Uno de los mayores problemas con las CuNPs es que tienden a oxidarse. Cuando las partículas se encuentran expuestas al medio ambiente, la formación de una capa de óxido superficial es inevitable, esto es porque las fases de óxido son termodinámicamente más estables (Jeong et al., 2008). La búsqueda de procedimientos que puedan generar partículas de este material y no se oxiden, es continua.

2.3.3 NANOPARTÍCULAS DE PLATA

Las nanopartículas de plata (AgNPs), han sido ampliamente usadas en las últimas décadas gracias a sus aplicaciones en áreas como catálisis, medicina, biotecnología y bioingeniería, electrónica, óptica, entre muchas otras. Teniendo en cuenta el uso potencial de estos materiales, una variable importante que debe considerarse a la hora de sintetizar, es el impacto ambiental que puedan tener. Entre los métodos considerados amigables al medio que se usan para obtener AgNPs se pueden destacar: la ablación láser, la descomposición térmica, los métodos biológicos y la síntesis electroquímica (Umer et al., 2012).

Autores han llevado a cabo métodos electroquímicos con diferentes electrodos, electrolitos y variables de síntesis, que se pueden observar en la Tabla 2, donde obtienen múltiples tamaños de nanopartículas de plata.

Tabla 2. Estudios sobre la síntesis de nanopartículas de plata por métodos electroquímicos.

Electrodo	Electrólito	Parámetros	Tamaño (nm)	Autores
Ánodo: Plata Cátodo: Platino	C ₁₆ H ₃₆ BrN disuelto en C ₂ H ₃ N	25 °C Atmosfera inerte DC: -1.35 a -6.9 mA cm ⁻²	6-1.7	Rodriguez- Sanchez et al., 2000
Ánodo: lámina de plata Cátodo: alambre de plata	NaNO ₃	50 °C DC: 0.5 mA cm ⁻² TR: 40 minutos	20	Starowicz et al., 2006
Plata	-	20 V TR: 50 a 70 minutos PCC	7.3	Khaydarov et al., 2009
Plata	Polímero biocompatible Pluronic F68	60 °C 20 V TR: 50 minutos	50/16	Blandón et al., 2015
Grafito	AgNO ₃	12 V	24	Theivasanthi & Alagar, 2012
Platino	KNO ₃ AgNO ₃ PVP	22 °C 5 minutos 1 mA cm ⁻²	16	Yin et al., 2003

DC: Densidad de corriente; TR: tiempo de reacción; PCC: la polaridad de la corriente continua entre los electrodos se modificó periódicamente.

Rodriguez y colaboradores disolvieron anódicamente iones de plata en acetonitrilo que contienen sales de tetrabutilamonio, donde variaron la densidad de corriente, la cual juega un papel muy importante, en el tamaño y la eficiencia del proceso, generando pequeñas NPs. Para Blandón y su equipo, aplicando una diferencia de potencial alterna de 20 V entre dos alambres de plata, sin usar estabilizante, sintetizaron nanopartículas menores a 50 nm y con índices de polidispersión aceptables, en cambio con la ayuda un surfactante lograron tener diámetros menores, una mejor estabilidad y polidispersión. En el proyecto de

Theivasanthi y Alagar llevaron a cabo la síntesis de una manera distinta a las anteriores, partiendo de AgNO_3 como precursor de metal, barras de grafito fueron usadas como ánodo y cátodo, obteniendo AgNPs aproximadamente de 24 nm. Yuan y colaboradores demostraron que con la adición de un tensoactivo dodecil sulfato de sodio, pueden lograr eficientemente el control de la síntesis (Blandón et al., 2015; Rodríguez-Sánchez et al., 2000; Theivasanthi & Alagar, 2012; G. Yuan et al., 2011).

2.4 NANOPARTICULAS ANTIMICROBIANAS

Una variedad de nanoestructuras han sido investigadas debido a la propiedad antimicrobiana que poseen, son usadas en el área de medicina, por ejemplo, como sistemas de administración de fármacos (Cover et al., 2012), implantes, catéteres y equipos quirúrgicos (Pallavicini et al., 2011). En aplicaciones cotidianas caben destacar las desarrolladas en consumibles diarios como detergentes, purificadores de agua o pinturas (Kaiser et al., 2013). También se han incorporado nanopartículas en lavadoras y refrigeradores o en fibras textiles para manufactura de prendas de vestir (Moritz & Geszke-Moritz, 2013). La amplia aplicación de las NPs se debe a la excelente actividad antibacteriana en varias bacterias Gram positivas y negativas (W. R. Li et al., 2011).

El mecanismo de acción se ha estudiado recientemente, aunque sigue sin conocerse completamente. Autores proponen que las nanopartículas pueden penetrar en el interior de la célula a través de los transportadores de metales dañando compuestos que poseen grupos funcionales basados en azufre o fósforo, como por ejemplo el ADN. Además, se ha observado mediante el Microscopio Electrónico de Barrido y Transmisión, que las partículas en escala de 1-10 nm aparecen unidas a la membrana celular provocando modificaciones en la permeabilidad y en la respiración de la bacteria (Morones et al., 2005).

Propiedades antibacteriales del cobre y plata son conocidas desde la antigüedad, la plata se utilizaba en vasijas para almacenar agua o vino, ya que se consideraba que preservaba sus condiciones o también en polvo para su aplicación en la curación de heridas y el

tratamiento de úlceras. Posteriormente se han empleado sales y compuestos de plata en diferentes campos biomédicos, especialmente en el tratamiento de quemaduras (Klasen, 2000).

El cobre fue usado por civilizaciones como los griegos, aztecas y romanos, como tratamiento de malestares como dolor de cabeza, quemaduras, infecciones de oído y para higiene en general (Dollwet & Sorenson, 2001). El uso del cobre como agente antibacterial continuo hasta la aparición de los antibióticos disponibles comercialmente en 1932 (Grass et al., 2011).

Cuando estos metales son preparados en partículas muy pequeñas, se espera que muestren una mejor característica antibacterial, debido a que su área superficial es mayor (Morones et al., 2005; Pal et al., 2015). Las nanopartículas de plata exponen una gama muy amplia de actividad antimicrobiana, en bacterias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Streptococcus mutans*, además, actúan como antivirales y antifúngicos (W.-R. Li et al., 2011). Las partículas de cobre a escala nanométrica, tienen efecto inhibitorio frente a hongos, algas, virus y bacterias, Gram positivas y Gram negativas.

Bajo condiciones específicas, las AgNPs y CuNPs puede eliminar microorganismos o evitar su crecimiento adicional. Su eficacia y tasa de inactivación microbiana dependen de la temperatura, humedad, concentración y dispersión del material, así como del tipo de microorganismo con el cual está en contacto.

2.5 INVASION EN ESTRUCTURAS MARINAS

Cuando se coloca un objeto en el agua de mar, no pasa demasiado tiempo para que sea contaminado con organismos vegetales y animales convirtiéndose en un problema significativamente importante. La adhesión microbiana es el primer paso en el establecimiento de comunidades microbianas en superficies, comúnmente denominadas biopelículas. Dichas biopelículas pueden potencialmente causar un daño mayor provocando la formación de bioincrustaciones más complejas.

Los barcos, plataformas, muelles y entre muchas más estructuras, están siendo continuamente atacadas por la adhesión y la acumulación de organismos marinos (Chambers et al., 2006). Es bien sabido el daño causado por la bioincrustación, por ejemplo, en los cascos de los barcos, generan una alta resistencia a la fricción, causada por la rugosidad formada, teniendo como consecuencia el aumento de peso y por consiguiente la disminución de la velocidad potencial y pérdida de la maniobrabilidad. Para compensar esto, se necesita mayor consumo de combustible, provocando el aumento de emisiones de compuestos nocivos. También el deterioro del recubrimiento favoreciendo la corrosión, además conlleva, a la introducción de especies en ambientes donde no habitan de forma natural (Yebra et al., 2004).

Existen diferentes tratamientos que previenen el crecimiento orgánico e inorgánico en sustratos que se encuentran en constante contacto con líquidos, que se puede lograr con la liberación controlada de moléculas tóxicas. Lo se busca es que el biocida utilizado logre ser de amplio espectro, que tenga un rendimiento antivegetativo aceptable y además de que no sea nocivo para el medio ambiente.

2.5.1 BACTERIAS MARINAS

El género *Bacillus* son microorganismos de gran tamaño, 4-10 μm , que se presentan en forma de bastón y son Gram positivas que al usar el método diferencial de tinción de Gram suelen matizar de azul oscuro o violeta, esta coloración está dada debido a la estructura de la pared celular (Bartram et al., 2003).

Se reconocen hasta la fecha más de 350 especies, de los cuales la mayoría habitan en ambientes terrestres, aunque también se pueden encontrar en agua de mar y ríos. Varias especies de *Bacillus* habitan en ambientes costeros y marinos, donde forman miembros importantes de las comunidades bacterianas marinas. Estas bacterias son resistentes a condiciones ambientales como la baja disponibilidad de nutrientes, la irradiación y a los desinfectantes químicos (Nicholson et al., 2000).

Según Liu y colaboradores, encontraron que las bacterias *B. pumilus*, *B. altitudinis* y *B. safensis* son de las especies predominantes en diversos entornos marinos de una amplia gama costera, también han podido aislar otros microorganismos en el Golfo de México, que frecuentemente son *B. subtilis*, *B. licheniformis* y *B. cereus* (Siefert et al., 2000).

2.5.2 MECANISMO DE FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA

Las biopelículas son comunidades estructuradas de microorganismos inmobilizados, adheridos a una superficie inerte o viva, encapsulados en una matriz polimérica orgánica de origen bacteriano (Rinaudi & González, 2009).

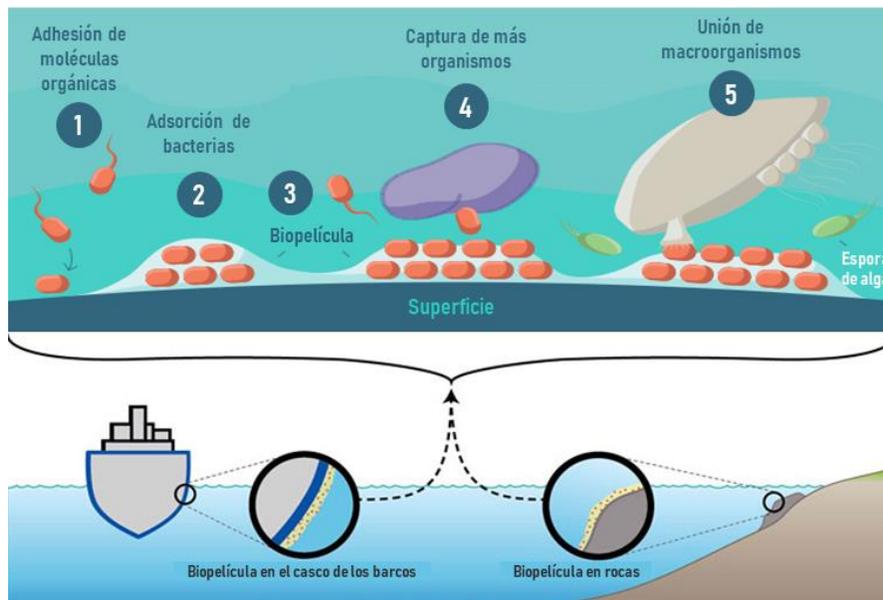


Figura 3. Etapas del mecanismo de formación de la biopelícula (adaptada de Cook, 2012).

La formación de una biopelícula, en superficies que se encuentran en contacto con solución salina, se desarrolla en cinco etapas (Figura 3): en la primera, que sucede en los primeros minutos de inmersión, moléculas orgánicas de proteínas, polisacáridos, glicoproteínas, entre otras, se adhieren físicamente a la superficie, acondicionándola para la segunda etapa, que corresponde aproximadamente a las primeras 24 horas de inmersión, donde las bacterias y las algas unicelulares se adsorben. Posteriormente en una tercera etapa, la

existencia de la película microbiana que se ha formado proporciona suficiente alimento para permitir la fijación de esporas de microalgas que constituirán una biopelícula que, a su vez, permitirá en la cuarta etapa, la captura incrementada de partículas y organismos, desarrollando una comunidad más compleja con la presencia de especies multicelulares, microalgas y detritos, en 2 o 3 semanas de inmersión. La última etapa es la unión de invertebrados marinos más grandes, como percebes, mejillones y macroalgas (Almeida et al., 2007).

2.6 PINTURAS ANTIVEGETATIVAS

Esta incrustación marina que recubre las estructuras subacuáticas, afecta no sólo a las estructuras fijas, como los malecones y pilotes, sino también barcos y embarcaciones de todo tipo (Johnson & Gonzalez, 2004). Existen diferentes tipos de métodos para prevenir el crecimiento de la biopelícula, pero la mayoría de los sistemas antiincrustantes toman forma de revestimientos protectores. La principal estrategia es usar pinturas que están diseñadas para lixiviar biocidas (Yebra et al., 2004).

Desde los 1800s se empezaron a desarrollar una variedad de pinturas antivegetativa y entre los compuestos más populares estuvo el óxido de mercurio, arsénico y óxido de cobre. En 1841, Mallet patentó una pintura antivegetativa en la que se aplicaban capas ligeramente solubles de materiales venenosos sobre una capa de barniz. La fabricación de la primera pintura para embarcaciones comenzó alrededor de 1908. Desde ese año hasta 1926 se usaron varias versiones basadas en óxido de mercurio y zinc suspendidas en goma de laca, alcohol de grano y aceite de alquitrán de pino, con una vida útil de aproximadamente nueve meses. Cerca del año de 1926, el uso de óxido de cobre como biocida mejoró la efectividad, extendiéndose a un periodo de 18 meses para volver a pintar, según datos del *Woods Hole Oceanographic Institution*. A principios de la década de 1960, surgieron compuestos orgánicos de estaño mejorando el rendimiento de las pinturas y pareció resolver definitivamente el problema de las incrustaciones (Dafforn et al., 2011). Sin

embargo, debido a los efectos ambientales adversos, los compuestos TBT se restringieron para su uso en embarcaciones (Austen & McEvoy, 1997).

El mercado de pintura antivegetativa se encontraba dominado por pinturas a base de cobre y zinc. Los compuestos de cobre inorgánicos y orgánicos se han utilizado durante mucho tiempo como agentes biocidas (Omae, 2003).

En los últimos años una gran variedad de enfoques se han comprometido a sustituir las sustancias tóxicas que contienen las pinturas antivegetativas y una de las alternativas se centra en la reducción del contenido de cobre mediante la incorporación de aditivos que deben mantener un buen rendimiento antiincrustante, bajo costo y baja toxicidad para el medio ambiente.

De acuerdo con el estudio de Adeleye y colaboradores, analizaron como afectan ciertos factores, la liberación de diferentes tamaños de compuestos de cobre de una pintura antivegetativa comercial, que conforme con el fabricante, el contenido de Cu_2O en ella es de 47.57% como principal ingrediente biocida. En el trabajo de Lagerström y colaboradores, cinco pinturas para embarcaciones pequeñas con concentraciones de Cu_2O que variaron desde 7.5% hasta 34.6%, fueron evaluadas frente diferente salinidad para ver si afectaba la liberación de este metal (Adeleye et al., 2016; Lagerström et al., 2018).

El uso de cobre en pinturas antivegetativas o antibacteriales, es muy variado y se ha encontrado hasta un 70% de peso de Cu en ellas (Brooks & Waldock, 2009). Para el caso de plata son pocos los estudios reportados como el de Bellotti y su equipo, donde realizaron una pintura con aditivos de nanopartículas de plata y cobre, agregando concentraciones de 0.64, 1.9, y 5.8 mg/100g de pintura. Posteriormente fueron evaluados contra dos tipos de hongos siendo las AgNPs la más efectiva. Dominguez-Wong y colaboradores usaron 15% v/v de nanopartículas de Ag/TiO_2 en una pintura vinílica-acrítica, a la cual analizaron cuantitativamente y cualitativamente la eficacia y actividad antibacterial (Bellotti et al., 2015; Dominguez-Wong et al., 2014).

Según en el estudio de Mueller y Nowack, la industria de la pintura y el revestimiento utiliza el 35% de la producción de nanoplatina y el 25% de la producción de dióxido de titanio en

Europa, convirtiendo a este sector en el primer usuario de plata nanométrica y en el segundo de nanopartículas de dióxido de titanio (Mueller & Nowack, 2008).

En el presente trabajo, las nanopartículas de cobre y plata se sintetizaron por el método electroquímico y sin emplear variables complicadas. Posteriormente se adicionaron en una pintura, para así, realizar una evaluación de la capacidad bactericida de la superficie, bajo la norma JIS Z 2801 y además se llevó a cabo el método de microdilución en placa con base en los estándares CLSI, para determinar la concentración mínima inhibitoria y bactericida, contra cepas que habitan comúnmente en ambientes costeros: *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. altitudinis* y también el alga *N. occulata*.

3

METODOLOGIA EXPERIMENTAL



En este capítulo se hace una breve descripción de los procesos empleados para generar nanopartículas de cobre y plata, mediante la reacción oxidación-reducción de estos metales con la ayuda de electricidad. Se detallarán las pruebas antimicrobianas aplicadas a los nanomateriales sintetizados, así como las especificaciones de la pintura elegida y los equipos de caracterización utilizados.

3.1 SINTESIS DE NANOPARTICULAS DE COBRE

Se realizó una síntesis de nanopartículas de cobre a través el método electrolítico, en donde fue utilizada una celda electrolítica, mostrada en la Figura 4, que consiste en un recipiente de vidrio y dos electrodos, de los cuales, para el ánodo se ocupó una placa de Cu y como cátodo una barra de grafito, se adiciono ácido sulfúrico para la solución electrolítica. Se mantuvo un potencial eléctrico de 30 voltios durante tres minutos. Posteriormente, se le incorporo borohidruro de sodio que actuó como agente reductor y se mantuvo bajo agitación constante hasta que se formaron aglomerados de las nanopartículas de cobre. La superficie de los electrodos fue limpiada con ácido nítrico.

Las CuNPs obtenidas fueron filtradas, en seguida fueron lavadas con acetona y se dejaron secar a temperatura ambiente. Agua destilada y etanol fueron utilizados para dispersarlas en futuras evaluaciones y caracterizaciones.

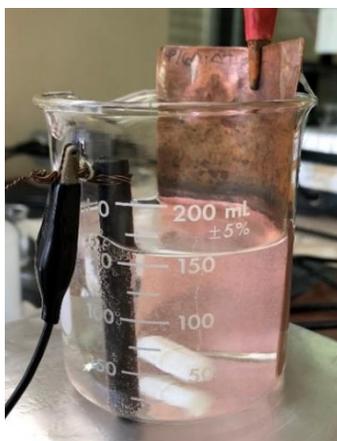


Figura 4. Reactor empleado para la síntesis de NPs de cobre.

3.2 SINTESIS DE NANOPARTICULAS DE PLATA

Para producir nanopartículas de plata se realizó la misma ruta electroquímica. Se utilizó una moneda y una barra de grafito como electrodos, se agregó ácido nítrico e hidróxido de sodio a agua desionizada. La reacción se mantuvo bajo los mismos parámetros que las CuNPs, después de terminado el tiempo de reacción, se adicionó ácido gálico, previamente sonificado, para llevar a cabo la reducción.

Las AgNPs se almacenaron para posteriormente ser utilizadas en las pruebas antimicrobianas y para la caracterización.



Figura 5. Solución inicial de la síntesis de nanopartículas de plata.

3.3 PREPARACION DE PINTURAS

En este trabajo se eligió la pintura vinil-acrílica para interiores y exteriores de la marca Comex® Vinimex. Esta pintura se puede encontrar comercialmente en cualquier tienda Comex o por la página de internet. En la Tabla 3 se mencionan los ingredientes que estructuran la pintura elegida.

Tabla 3. Composición de la pintura Comex Vinimex.

Nombre del ingrediente	%
Dióxido de titanio	$\geq 10 - \leq 20$
Ftalato de dibutilo	≤ 1.0
Sílice cristalina	< 1.0

La pintura fue preparada adicionando 15% v/v de nanopartículas de plata y de cobre, como es indicado por el fabricante. Piezas de vidrio de 5 cm por lado fueron pintadas con tres capas dejándose secar entre cada una de ellas, por lo menos 60 minutos. Los vidrios pintados fueron utilizados para la prueba cuantitativa.

3.4 EVALUACION ANTIMICROBIANA

La actividad antibacteriana exige una normalización o cuantificación, que se consigue mediante los métodos utilizados in vitro para comprobar la susceptibilidad del microorganismo en relación con el antibiótico (antimicrobiano), en este caso, las nanopartículas (Paredes & Roca, 2004). Es por eso que se eligió realizar el ensayo de microdilución en placa que nos proporcionara la concentración mínima necesaria de nanopartículas para detener el crecimiento de las bacterias de prueba y para poder evaluarlas superficialmente, se realizó una pintura adicionada con los nanomateriales obtenidos, siendo puesta a prueba mediante un método estándar japonés.

3.4.1 MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN PLACA

El método de microdilución en placa, siguiendo las directrices del centro de referencia CLSI (Clinical Laboratory Institute Standards), que determina la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), definida como la concentración más baja de un antimicrobiano, que inhibe el crecimiento de un microorganismo después de su incubación. Mientras que la Concentración Mínima Bactericida (CMB), es la mínima cantidad de antibiótico capaz de destruir el 99.9% de una muestra inoculada en condiciones estandarizadas.

La actividad antimicrobiana de las nanopartículas de Cu y Ag fueron evaluadas utilizando placas de 96 pozos por ser un método cuantitativo y estandarizado, donde las pruebas se realizaron contra bacterias marinas *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus altitudinis*. Los nanomateriales compuestos en forma de dispersión se diluyeron 2-128 veces con 100µL de caldo Mueller-Hinton inoculado con las bacterias ensayadas a una concentración de 1×10^5 UFC/mL (Unidades Formadoras de Colonias por mililitro), Figura 6. La CMI se leyó después de 24 horas de incubación a 37 ± 2 °C, para observar el punto de corte donde las NPs detuvieron el crecimiento de la cepa bacteriana. Posteriormente se tomó muestra del pozo de inhibición de la bacteria, uno antes y dos después para ser sembrados en placas con agar Mueller-Hinton, esto para conocer la CMB, donde a continuación se dejaron en la incubadora bajo las mismas condiciones que las CMI. Se analizaron para poder determinar en qué dilución son más efectivas las nanopartículas de plata y cobre.

Utilizando el mismo procedimiento se realizó la prueba con una especie de microalga común, *Nannochloropsis oculata* obtenida del laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas de la UASLP. La *N. oculata*, es un microorganismo eucariota fotosintético que crece rápidamente debido a su estructura simple (Y. Li et al., 2008). Ya que su tamaño es muy pequeño, el cual oscila entre 2 y 4 µm, se considera que forman parte del fitoplancton (Guillard & Ryther, 1962). La metodología de éste ensayo está basada de acuerdo al OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS. Antes de comenzar la prueba, se preparó el stock de *N. oculata* en medio basal de Bold, hasta desarrollar la fase logarítmica tardía bajo luz blanca fluorescente ($80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a 24 °C

en un agitador rotatorio a 100 rpm. La concentración de algas inicial del experimento fue de 3×10^6 células/mL.

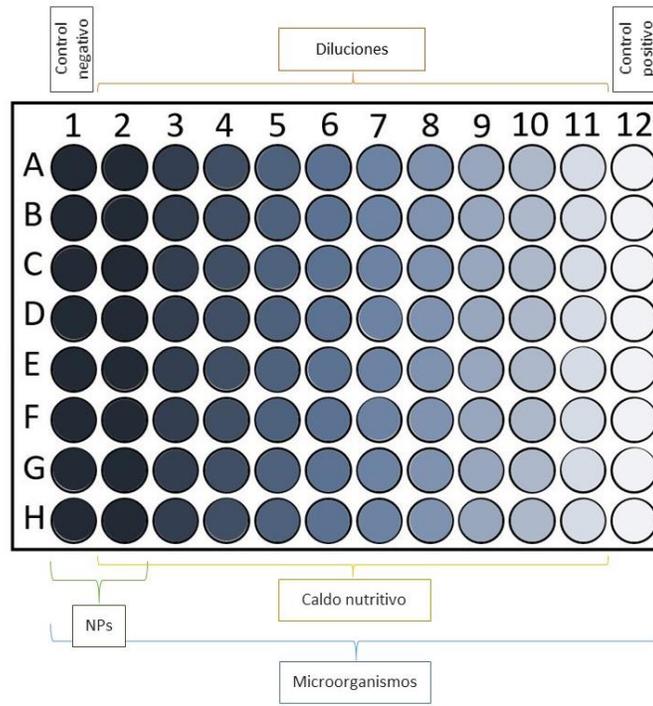


Figura 6. Esquema de una placa de 96 pozos utilizada para la prueba de microdilución.

3.4.2 JIS Z 2801

Para determinar la capacidad de las pinturas con aditivos de nanopartículas que realizamos con anterioridad, se realizó la prueba basada en la norma JIS Z 2801. El microorganismo utilizado para esta prueba fue *Escherichia coli* ATCC 8739, cuya concentración por cada muestra inoculada fue de 1.5×10^7 UFC/mL.

Se les depositó inóculo a los vidrios con la pintura, de los cuales la mitad se cubrieron con films estériles y se incubaron en una caja de Petri con una cama de humedad durante 24 horas a 37 ± 2 °C. Las otras muestras se colocaron en bolsas individuales que contenían buffer de fosfatos y se masajearon. Después se tomó 1 mL y se colocó en un tubo con solución fisiológica. A partir de este tubo se hicieron diluciones que fueron colocadas en

caja de Petri con agar Mueller-Hinton a 45 °C. Nuevamente se dejaron en incubación usando las mismas condiciones de tiempo y temperatura. Se realizó el conteo de los microorganismos sobrevivientes a tiempo 0 y 24. Todo el procedimiento se esquematiza en la Figura 7. Usando una fórmula proporcionada en el estándar, que determina la diferencia entre los dos conteos que proporciona una medición de la acción antimicrobiana del material de prueba.

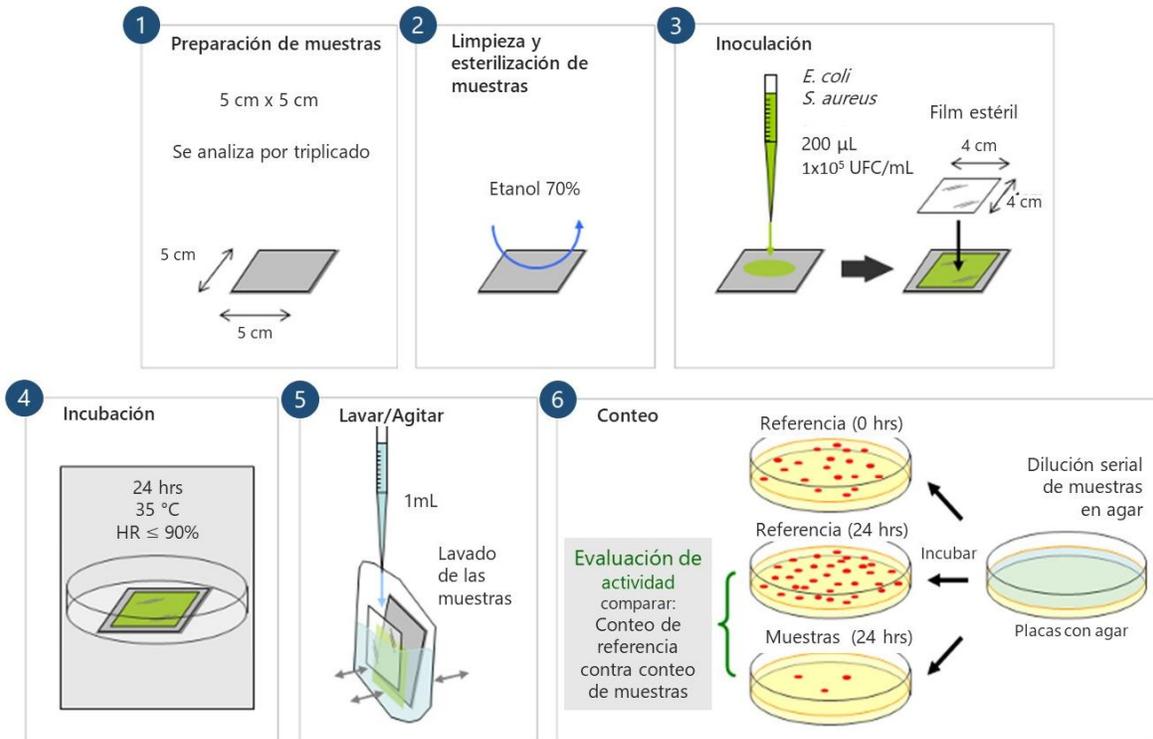


Figura 7. Representación esquemática JIS Z 2801.

3.5 EQUIPOS EMPLEADOS PARA LA CARACTERIZACION DE LAS NANOPARTICULAS

3.5.1 ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA-VISIBLE

La espectroscopía UV-Vis es una práctica analítica basada en la medición de la absorción de radiación electromagnética por parte de las moléculas que componen una sustancia, dentro de las regiones ultravioleta y visible, es decir, en un intervalo de longitud de onda entre 200 y 800 nm aproximadamente. La radiación absorbida brinda información de los estados energéticos, atómicos o moleculares, de la muestra de estudio que pueden ser cuantificadas. La longitud de onda absorbida y la cantidad de ésta, dependen tanto de la estructura de la molécula como del medio en el que se encuentra (Perkampus, 1992).

Las muestras sintetizadas se estudiaron a partir de un espectrofotómetro USB4000 Ocean Optics Inc (Figura 8), que tiene un rango de longitud de onda de 200 a 850 nm. Para preparar la muestra fueron diluidas de 2 a 3 gotas en agua desionizada y se utilizó una celda de cuarzo para contenerlas.



Figura 8. Espectrómetro UV-Vis USB4000 Ocean Optics Inc.

3.5.2 MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN

El microscopio electrónico de transmisión (TEM por sus siglas en inglés "Transmission electron microscopy") utiliza un haz de electrones de alta energía para visualizar una muestra muy delgada, que es generado por un filamento de Tungsteno. Estos electrones son acelerados con ayuda de un potencial eléctrico, focalizados mediante lentes electromagnéticas en condiciones de alto vacío. Las interacciones entre los electrones y los átomos se pueden usar para observar características morfológicas, cristalográficas, de tamaño y defectos, además, de composición química con la ayuda de la espectroscopía de dispersión de energía de rayos-X (Williams & Carter, 2009).

La microscopia electrónica de transmisión puede estudiar todo tipo de materiales, desde metales y cerámicas hasta biomateriales blandos, siempre y cuando se encuentren con las dimensiones inferiores a los 100 nm. Dado que el microscopio funciona bajo alto vacío, las muestras deben estar secas y deben soportar la exposición al haz de electrones, por lo tanto, la preparación de estas es un aspecto importante en el análisis (Williams & Carter, 2009).



Figura 9. Microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1230.

Con esta técnica de caracterización se utilizó el equipo JEOL modelo JEM-1230 con un voltaje de 100 kV, Figura 9. Las muestras para las mediciones TEM se suspendieron en etanol y se dispersaron por ultrasonidos. Las gotas de las suspensiones se colocaron en una rejilla de cobre recubierta con carbono.

3.5.3 DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ

La dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés “Dynamic Light Scattering”) es una técnica óptica no invasiva para medir la distribución estimada de nanopartículas en suspensiones. Se incide una luz láser con cierta energía, alcanzando numerosas partículas coloidales, dispersándola en diferentes intensidades. Si las partículas son pequeñas se moverán rápidamente, también se acelera la variación de la intensidad de dispersión. Por el contrario, las partículas más grandes se dispersarán lento llevando variaciones más tardas (Cuadros-Moreno et al., 2014).

Para llevarse a cabo la medición se requieren un mayor número de partículas (varios ordenes de magnitud) en comparación con el TEM que involucra una muestra estadísticamente pequeña, donde los valores obtenidos por lo general serán superiores a los proporcionados por la microscopía, esto debido a que cuando un medio líquido mueve una partícula dispersa, la mayoría de las veces se adhiere una capa eléctrica dipolar a su superficie, por lo tanto influye en el movimiento de esta, ocasionando la medición del radio hidrodinámico (Figura 10).

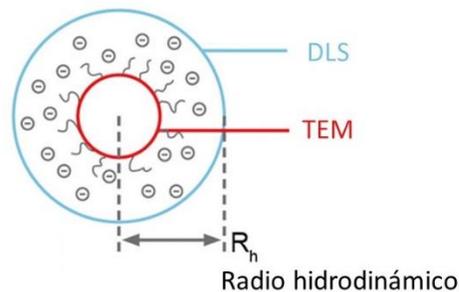


Figura 10. Esquematación del radio hidrodinámico medido por el DLS.

Las mediciones de distribución de tamaño y potencial Z de las nanopartículas de cobre y plata, se realizaron por triplicado con el equipo ZETASIZER Nano-ZS90, Malvern Panalytical (Figura 11), equipado con un láser He-Ne de 4mW (633 nm), operado a un ángulo de 90° y una temperatura de 25 °C. Se diluyeron 100 microlitros de muestra en 1 mL de etanol.



Figura 11. Equipo de Dispersión Dinámica de Luz ZETASIZER Nano-ZS90.

3.5.4 DIFRACCIÓN DE RAYOS X

El fundamento de la técnica de difracción se basa en la interacción de la estructura cristalina, electrones que rodean los átomos, de un sólido con una fuente de rayos X. Algunos fotones del haz incidente son desviados elásticamente, es decir, sin perder energía, dispersándolos con la misma longitud de onda que la radiación incidida, originando el fenómeno de difracción. Esta interacción contiene información sobre la posición y tipo de átomos de la muestra (Martí et al., 2015).

La fase cristalina de algún material siempre produce un patrón de difracción característico, es por eso que esta técnica es usada como un método no destructivo de identificación cualitativa de la composición mineralógica de una muestra cristalina. Además, se puede determinar tamaños de cristales, el coeficiente de dilatación térmica, así como calcular la simetría del cristal, las distancias interplanares y los parámetros de red (Azaroff, 1968).

El polvo obtenido de las nanopartículas de cobre fue caracterizado con el equipo de difracción de rayos X, empleado fue el Empyrean Alpha 1 de Malvern Panalytical, mostrado en la Figura 12, con una fuente de radiación Cu-K α ($\lambda = 0.154\ 056\ \text{nm}$).

Se utilizó el programa MAUD para la identificación de las fases, refinando el difractograma obtenido a través del método de Rietveld. De la base de datos del *Institute of Experimental Mineralogy Russian Academy of Sciences*, se asignaron parámetros de red, sistema cristalino, grupo espacial y posiciones atómicas de las fases existentes.



Figura 12. Difractómetro de rayos X Empyrean Alpha 1.

4

RESULTADOS Y DISCUSION



Este capítulo se encuentra dividido por dos secciones. En la primera se muestran las características físicas y los resultados de los análisis de las nanopartículas de cobre y plata, donde fueron utilizados los equipos de Espectroscopía UV-Visible, Dispersión Dinámica de Luz, Difracción de Rayos X y el Microscopio Electrónico de Transmisión, que nos ayudaron a determinar si se logró la obtención de las nanopartículas deseadas, así como también visualizar su morfología, tamaño y distribución.

La segunda parte consta de los resultados generados por las pruebas antimicrobianas, las cuales fueron: microdilución en placa de 96 pozos y JIS Z 2801.

4.1 NANOPARTICULAS DE COBRE Y PLATA

Al finalizarse el proceso de electrolización, se formaron suspensiones en la solución y observaron depósitos de nanopartículas de cobre en la superficie de la placa del metal, se retiraron con la ayuda de una pizeta y posteriormente se filtraron. Su apariencia, después de secarse, fue de un polvo fino de color negro, Figura 13.



Figura 13. Polvo de nanopartículas de cobre.

Para la síntesis de las nanopartículas de plata se pudo observar que rápidamente tomó un color amarillo y pasados algunos minutos en agitación, comenzó a oscurecerse hasta llegar al tono mostrado en la Figura 14.

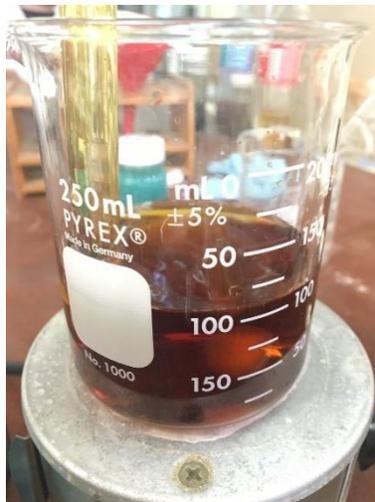


Figura 14. Solución final de las nanopartículas de plata.

Las dos síntesis se llevaron a cabo de una manera sencilla, es decir, los parámetros que se emplearon comparándolas con las de otros autores mencionados en la tabla 1 y 2, fueron fáciles de aplicar y además, la formación de las nanopartículas se realizó con una mayor rapidez.

4.2 CARACTERIZACIÓN

4.2.1 ESPECTROSCOPÍA UV-VISIBLE

Los espectros de absorción UV-Vis obtenidos se presentan en las siguientes figuras. En donde se puede observar el plasmón superficial en 543 nm, que de acuerdo a la literatura se ha reportado que las bandas de absorción para las CuNPs se encuentran en el rango de 500-600 nm (Dang et al., 2011), confirmándonos así la presencia de nanopartículas de cobre (Figura 15).

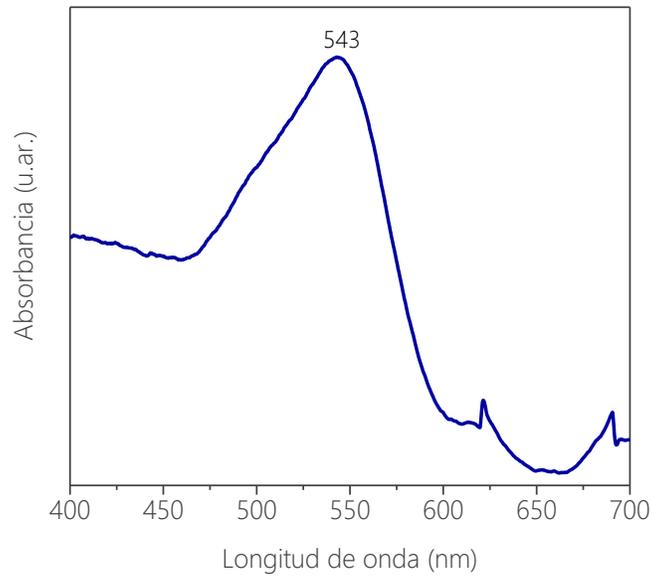


Figura 15. Espectro UV-Visible de las nanopartículas de cobre.

Para las nanopartículas de plata, en la Figura 16, muestran una banda de absorción óptica en 415 nanómetros, que es característica para nanopartículas esféricas (Grass et al., 2011). Además, el ancho de la curva podría indicar una distribución uniforme de tamaño. La morfología y el diámetro de partícula homogénea fueron corroboradas por medio de TEM.

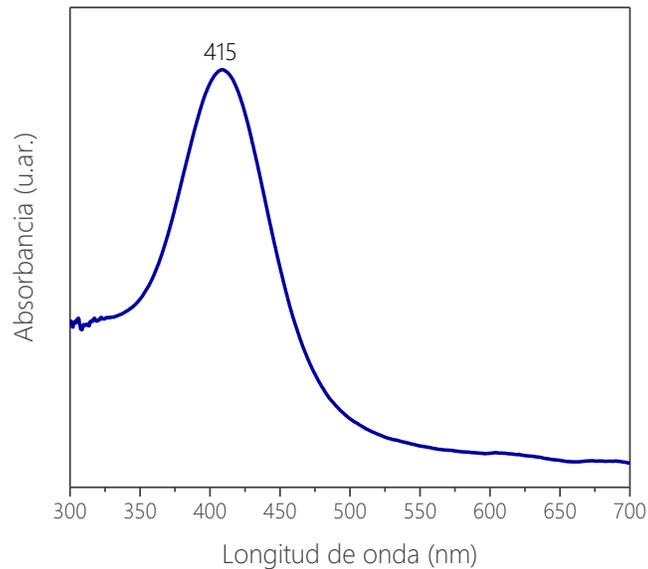


Figura 16. Espectro de absorción UV-Vis de las nanopartículas de plata.

4.2.2 MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN

El tamaño y la morfología de las nanopartículas se examinaron mediante microscopía electrónica de transmisión. Mostrando para la muestra de cobre la formación de aglomerados de partículas pequeñas con superficies esféricas, que varían desde los 5 a los 20 nanómetros de longitud. A diferencia de las partículas de mayor tamaño, rondando entre los 50 y 65 nm, exponiendo morfologías multifacéticas. El histograma de distribución se muestra en la Figura 17, dando un promedio de diámetro de 22.75 ± 17.71 nm.

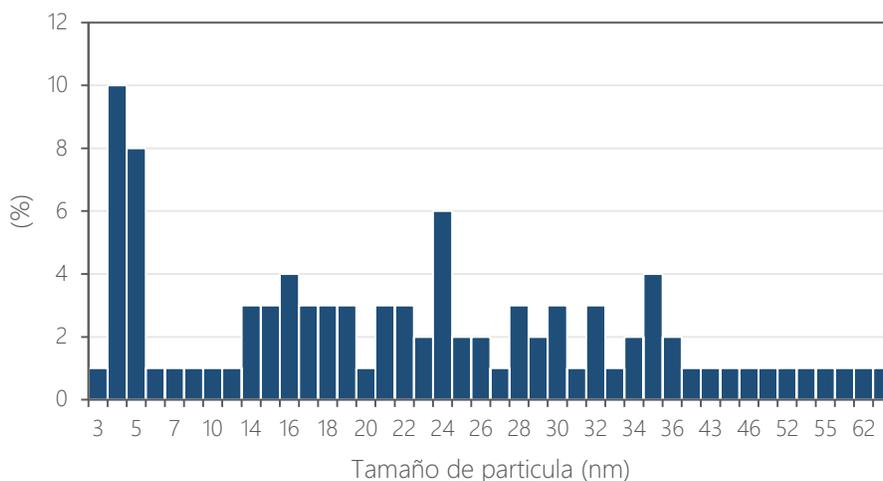
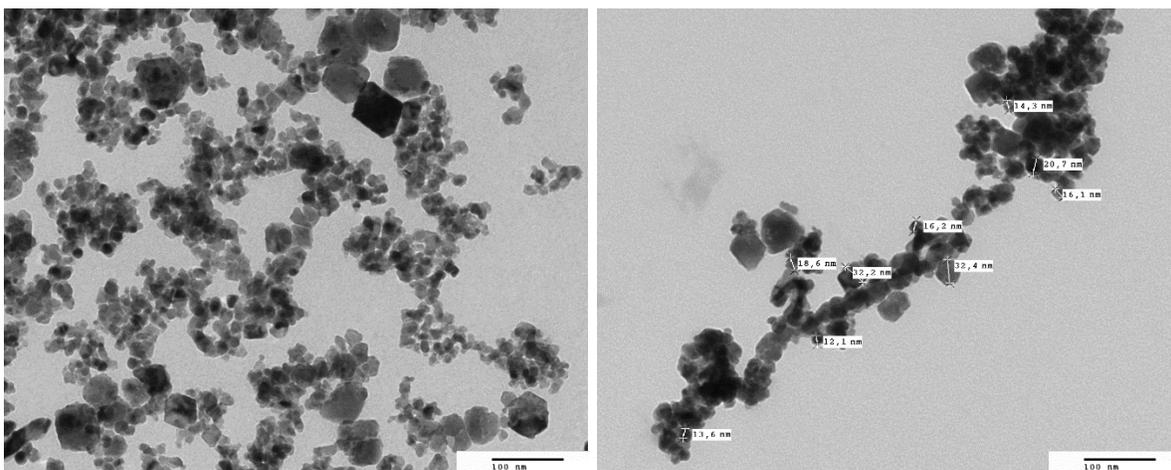


Figura 17. Morfología, tamaño y distribución de nanopartículas de cobre a través del microscopio electrónico de transmisión.

En las imágenes TEM de las nanopartículas de plata de la Figura 18, se observaron partículas bien dispersas que tienen estructuras semiesféricas. A través del histograma, se obtuvo el tamaño de partícula con un intervalo entre 8 y 26 nm, resultando un diámetro medio de 12.7 nanómetros y una desviación estándar de 4.58, Figura 18.

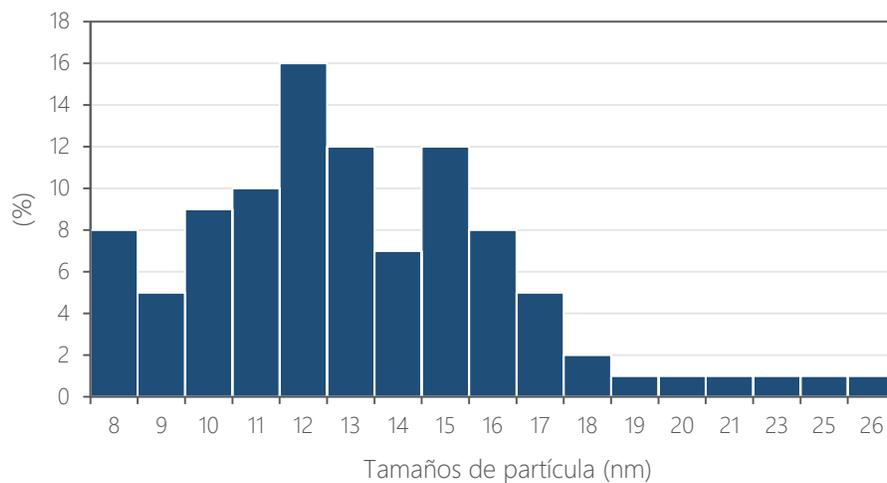
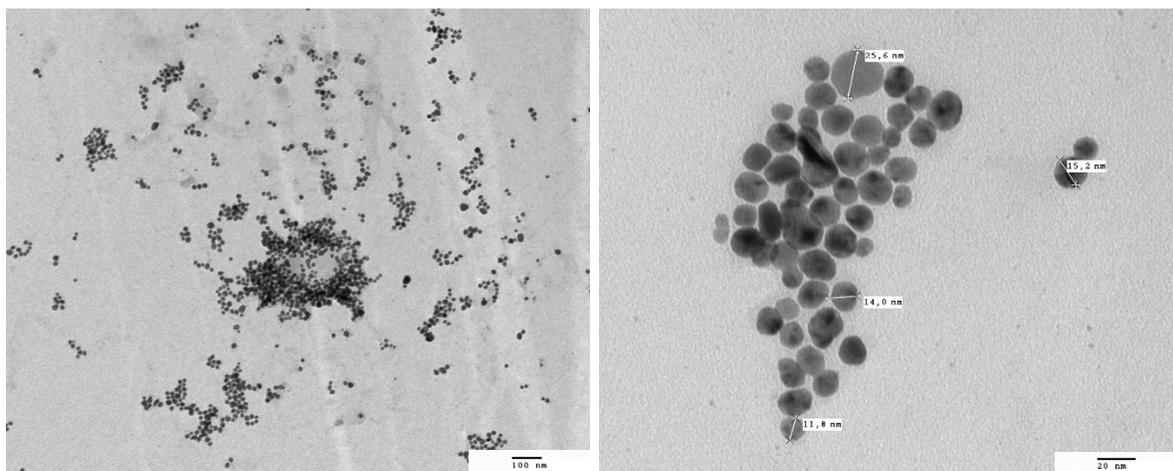


Figura 18. Imágenes TEM e histograma de distribución de tamaño de nanopartículas de plata.

4.2.3 DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ Y POTENCIAL Z

Utilizando DLS se obtuvo el tamaño promedio, la carga superficial y el índice de polidispersión de las partículas sintetizadas de cobre y plata. La siguiente tabla, resume los resultados generados.

Tabla 4. Valores obtenidos en el DLS de las nanopartículas de cobre y plata.

Muestra	Diámetro (nm)	PdI	Potencial Z (mV)
Cobre	155.5	0.450	-19.8 ± 12.4
Plata	7.078	0.109	-32.7 ± 11.5

El análisis de las nanopartículas de cobre, proporcionó un diámetro hidrodinámico medio de 155.5 nm, Figura 19, que se atribuye a las aglomeraciones observadas en las imágenes del TEM, y un índice de polidispersión (PdI) de 0.450. El PdI es una medida de los rangos de tamaño presentes en la solución, la escala varía de 0 a 1, valores cercanos a 0 indican que la muestra es monodispersa y valores cercanos a la unidad indican que la muestra presenta gran variedad de tamaños, polidispersa. Se encontró también, el potencial Z en -19.8 ± 12.4 mV, demostrando la baja estabilidad ocasionando la agregación.

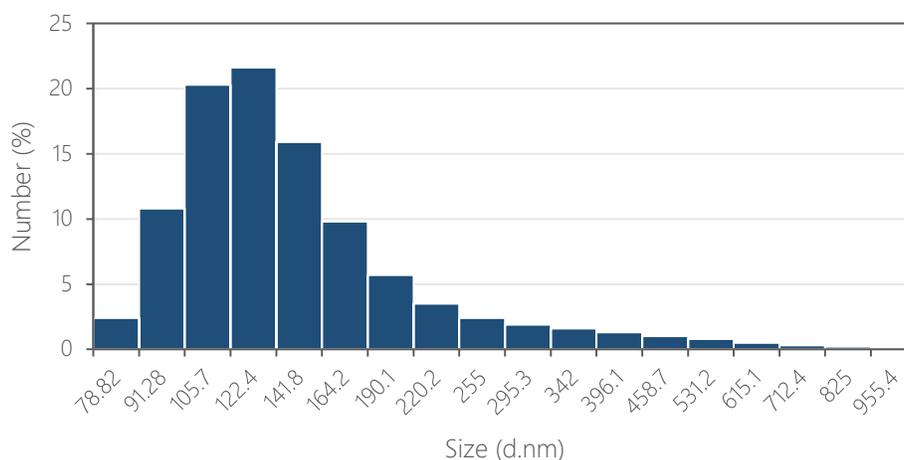


Figura 19. Gráfica del tamaño de partícula en función del número de partículas de cobre.

En las nanopartículas de plata se obtuvo una distribución de tamaño, Figura 20, con un diámetro promedio de 7 nanómetros, un Pdl en 0.109, el cual, determina la monodispersión de la muestra. El valor de potencial Z de las partículas fue de -32.7 ± 11.5 mV y señala que la carga superficial de las nanopartículas es lo suficientemente alta como para asegurar la estabilidad electrostática de su suspensión, lo que evita la agregación y contribuye a la estabilización a largo plazo.

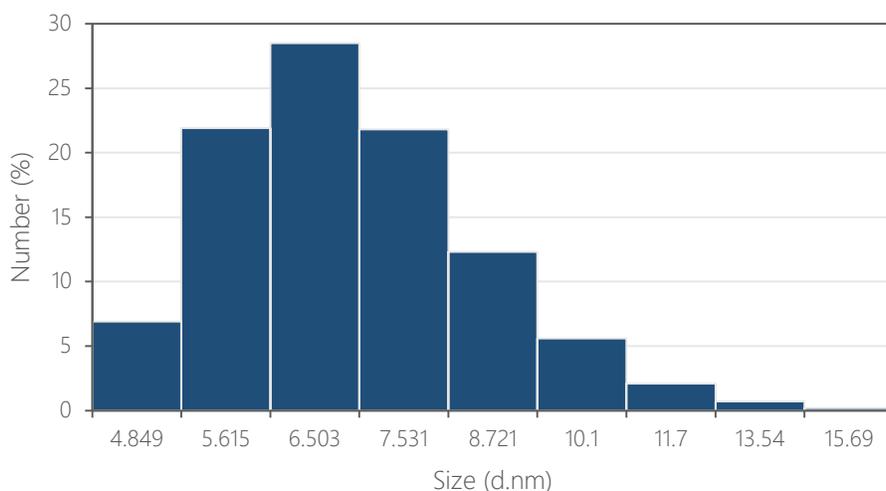


Figura 20. Distribución de tamaño de las nanopartículas de plata obtenidas mediante DLS.

4.2.4 DIFRACCIÓN DE RAYOS X

Para conocer la composición química de las nanopartículas de cobre sintetizadas se utilizó el equipo de difracción de rayos X. El patrón obtenido se muestra en la Figura 21, en la que los picos de difracción a 29.7° , 36.5° , 42.5° , 52.1° , 61.5° , 65.6° , 73.7° y 77.7° se pueden indexar a la superficie cúbica de la estructura de Cu_2O (JCPDS nº 78-2076), que corresponden a las facetas de cristal (110), (111), (200), (211), (220), (221), (311) y (222). Los valores para 2θ a 43.3° y 50.4° son relacionados con los planos (111) y (202), se pueden indexar a la estructura cúbica de Cu (JCPDS no. 85-1326). Se encontró también óxido de cobre (II) posicionados en 32.8° y 54.95° para los índices (110) y (202).

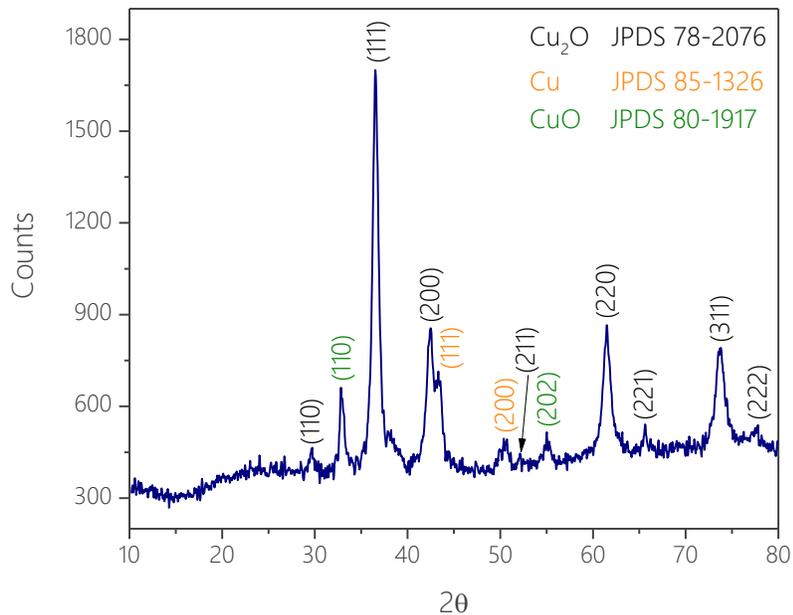


Figura 21. Patrón de difracción de rayos X de las nanopartículas de cobre.

En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos del refinamiento Rietveld del difractograma de las nanopartículas de cobre. Se pudieron identificar las fases de óxido de cobre (I) con un 72.61% en volumen, un 14.65% para óxido de cobre (II) y cobre en un 12.74%.

Tabla 5. Resultados del refinamiento de Rietveld de las nanopartículas de cobre.

	% en volumen	Parámetros de red (Å)	Tamaño de cristalito (nm)	Porcentaje de error (%)
Óxido de cobre (I) (Cu ₂ O)	72.61	4.27	76.27	4.91
Óxido de cobre (II) (CuO)	14.65	a = 4.7 b = 3.36 c = 5.49 β = 96.85	99.97	4.91
Cobre (Cu)	12.74	3.62	99.58	4.91

4.3 ENSAYOS ANTIMICROBIANOS

4.3.1 MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN PLACA

La actividad antimicrobiana de las nanopartículas de cobre y plata pudo ser cuantificada y determinada utilizando la prueba de microdilución en placa, realizándose contra distintos microorganismos marinos, los datos derivados de este ensayo se recopilan en la Tabla 6.

Tabla 6. CMI y CMB de las nanopartículas sintetizadas contra microorganismos marinos.

Muestra	Cu electrolítico		Ag electrolítica	
Concentración inicial	[2.5×10^3 ppm]		[137.31 ppm]	
	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>B. altitudinis</i>	1.25×10^3		4.29	
<i>B. subtilis</i>	1.25×10^3		4.29	
<i>B. pumilus</i>	1.25×10^3		4.29	
<i>N. occulata</i>	1.56×10^2		68.65	

La concentración inicial en las nanopartículas de cobre fue de 2.5×10^3 y 137.31 ppm para las de plata. La concentración mínima inhibitoria, en la muestra de cobre fue de 1.25×10^3 ppm para las tres diferentes bacterias utilizadas y se obtuvo el mismo resultado para la concentración mínima bactericida, indicando que es necesaria una concentración cercana a la inicial para detener el crecimiento y la eliminación de microorganismos, Figura 22.

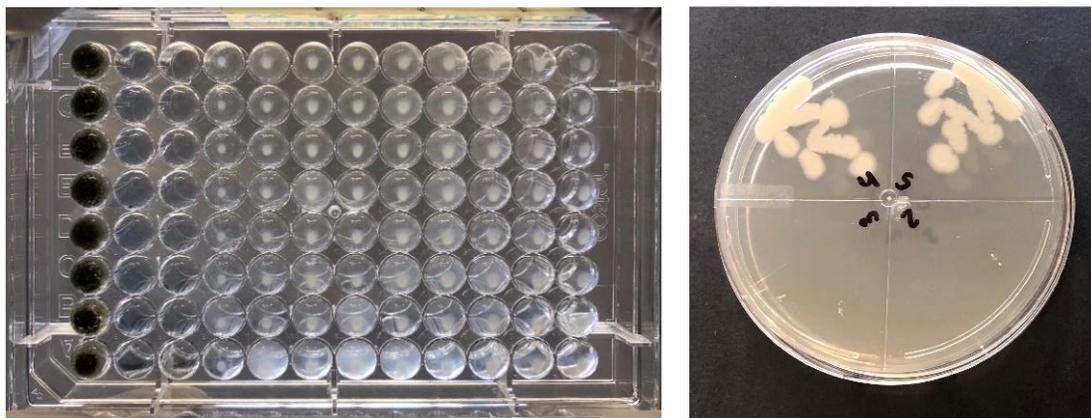


Figura 22. Concentración mínima inhibitoria y bactericida de las nanopartículas de cobre.

En el caso de la plata, presenta una mayor efectividad como agente bacteriostático y bactericida, ya que la CMI y la CMB necesaria es de 4.29 ppm que es una cantidad 5 veces menor que la inicial, Figura 23.

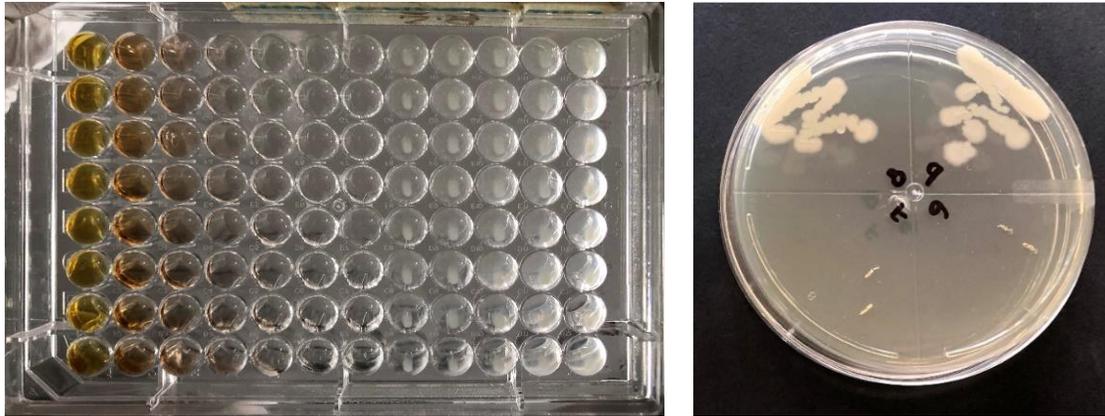


Figura 23. CMI y CMB de las nanopartículas plata contra *B. subtilis*.

La prueba se realizó además con el alga marina *N. occulata*, utilizando la misma metodología que con las bacterias. La concentración mínima inhibitoria y bactericida se mostró altamente efectiva con las nanopartículas de cobre, siendo necesario 1.56×10^2 ppm para evitar el desarrollo de la planta, Figura 24.

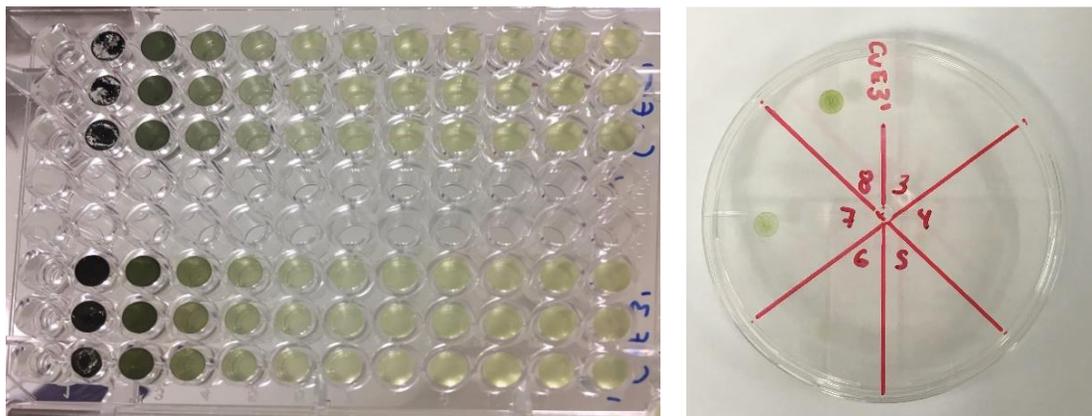


Figura 24. Concentración mínima inhibitoria y bactericida de CuNPs contra *N. occulata*.

Para las nanopartículas de plata, la CMI fue de 68.65 ppm, que quiere decir que a partir de la columna número cuatro comenzó el crecimiento del alga, esto se puede corroborar en la CMB en la Figura 25.

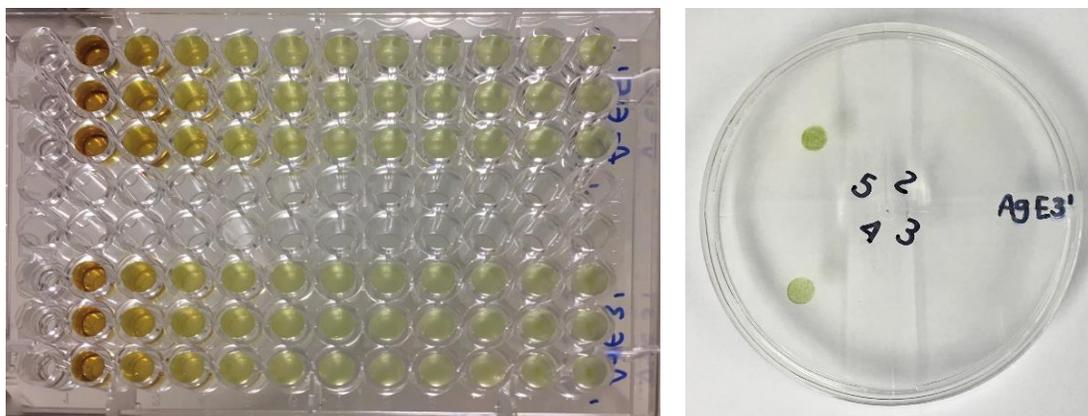


Figura 25. Concentración mínima inhibitoria y bactericida de AgNPs usando el alga.

4.3.2 PRUEBA SUPERFICIAL

La actividad antibacteriana de la pintura adicionada con nanopartículas de cobre y de plata, se determina comparando una superficie de control, en este caso se utilizó la pintura preparada con las indicaciones del fabricante, contra la superficie tratada.

De acuerdo con la norma, el valor de la actividad antibacteriana se mide en R y está definida por la ecuación 1. A partir del promedio de UFC en las muestras tratadas (pinturas con nanopartículas) y en las UFC del control (blanco positivo), se calculó este valor. La actividad antibacteriana de la muestra es positiva si R es igual o mayor que 2.0, es decir, la muestra disminuyó el número de bacterias activas más de dos factores de 10 en comparación con el control en 24 h.

$$R = \log\left(\frac{B}{A}\right) - \log\left(\frac{C}{A}\right) = \log\left(\frac{B}{C}\right) \quad [1]$$

Donde:

- A: es el valor promedio de UFC expuestas al control (blanco positivo) inmediatamente después de la inoculación.
- B: es el valor promedio de UFC expuestas al control después 24 h.
- C: es el valor promedio de UFC expuestas a la muestra tratada (pintura con nanopartículas) después 24 h.

Tabla 7. Valores de la actividad antimicrobiana de pinturas adicionadas con nanopartículas de cobre y plata, evaluadas contra *E. coli*.

			Tiempo 0		Tiempo 24		
			UFC/mL	Log10	UFC/mL	Log10	
Blanco negativo	Cobre	1	1.60E+05	5.23	1.00E+05	5.00	
	Cobre	2	1.50E+05	5.20	1.00E+05	5.00	
	Cobre	3	1.80E+05	5.23	1.00E+05	5.00	
	Promedio		1.63E+05	5.22	1.00E+05	5.00	
	Desv std			0.02		0.00	
	R				2.32		
	%Actividad				99.52%		
Pintura Vinimex (PV)	Blanco positivo	PV	1	1.70E+05	5.20	2.03E+07	7.31
		PV	2	1.60E+05	5.18	2.00E+07	7.30
		PV	3	1.70E+05	5.26	2.28E+07	7.36
		Promedio		1.70E+05	5.21	2.10E+07	7.32
		Desv std			0.04		0.03
	Con NPs	PV-Ag	1	1.40E+05	5.15	5.18E+06	6.71
		PV-Ag	2	1.60E+05	5.20	5.30E+06	6.72
		PV-Ag	3	1.50E+05	5.18	5.24E+06	6.72
		Promedio		1.50E+05	5.18	5.18E+06	6.72
		Desv std			0.03		
		R				0.60	
		%Actividad				75.10%	
		PV-Cu	1	1.60E+05	5.20	6.50E+05	5.81
		PV-Cu	2	1.70E+05	5.23	1.00E+05	5.00
		PV-Cu	3	1.50E+05	5.18	1.00E+05	5.00
		Promedio		1.60E+05	5.20	2.83E+05	5.27
		Desv std			0.03		0.47
R				1.87			
%Actividad				98.65%			

En la tabla 7, se recaban los datos derivados de la prueba JIS Z 2801, en donde se puede notar una disminución en el conteo promedio de células viables en las muestras tratadas, con respecto al blanco positivo. En el caso de las NPs de cobre, se logró un 98.65% de actividad y una R de 1.87, lo que podría indicar una alta efectividad como agente antimicrobiano, ya que se encuentra cercano al valor dictado por la norma y también a la R del blanco negativo que fue de 2.32. Para las pinturas con nanopartículas de plata, mostró una considerable actividad antibacterial, dando un porcentaje de 75.10 y el valor de R en 0.60. Estos datos coinciden con los obtenidos por Kawakami y colaboradores en 2008.

5

CONCLUSIONES



Nanopartículas de cobre y plata fueron sintetizadas mediante el método de reducción electroquímica siendo simple, rápida y sin requerimiento de equipos costosos.

La espectroscopía UV-Vis corroboró la obtención de nanopartículas de plata y cobre, debido a que los plasmones resultantes corresponden a lo reportado en la bibliografía para estos materiales.

De acuerdo a las imágenes obtenidas a través del TEM, se lograron observar tamaños menores a los 15 nm, morfologías semiesféricas y buena dispersión para la plata. Por otra parte, para el cobre, se encontraron diámetros promedio a los 25 nanómetros.

El tamaño promedio y el Pdl del DLS de cobre es consistente, comparado con el resultado obtenido mediante la microscopía debido a las aglomeraciones observadas y también, se corroboró la buena polidispersión de las nanopartículas de plata.

Respecto al patrón de difracción de rayos X de las CuNPs, se logró determinar los planos cristalográficos mediante los picos de difracción, el tipo de estructura, así como la proporción de las mismas, obteniendo en mayor proporción la fase de óxido de cobre (I) con un 72.61% en volumen.

Las nanopartículas de plata muestran mayor efectividad antibacteriana, a diferencia del cobre, para cepas del genero *Bacillus*. Todo lo contrario sucedió en la evaluación contra *N. occulata*, donde las CuNPs fueron mejor agente bacteriostático y bactericida que las AgNPs.

Para la actividad antibacterial en la superficie, la muestra de cobre es altamente eficaz con un 98.65%, es probable que actuó mejor en esta evaluación, comparándola con la prueba de microdilución en placa, debido a que al adicionar las nanopartículas a la pintura

quedaron mejor dispersas y esto deriva en una mejor área de contacto entre las partículas y la bacteria. La disminución en el porcentaje de inhibición para la muestra de plata puede deberse a una menor concentración en relación con la del cobre.

De acuerdo a la prueba de viabilidad del alga marina *N. occulata*, se podría concluir que las nanopartículas adicionadas en pinturas podrían permitir la adhesión de algunas bacterias, pero serán capaces de inhibir y destruir algas, que es uno de los principales microorganismos en iniciar la biopelícula.

6

REFERENCIAS



- Adeleye, A. S., Oranu, E. A., Tao, M., & Keller, A. A. (2016). Release and detection of nanosized copper from a commercial antifouling paint. *Water Research*, *102*, 374–382. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.06.056>
- Almeida, E., Diamantino, T. C., & de Sousa, O. (2007). Marine paints: The particular case of antifouling paints. *Progress in Organic Coatings*, *59*(1), 2–20. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2007.01.017>
- Austen, M. C., & McEvoy, A. J. (1997). Experimental effects of tributyltin (TBT) contaminated sediment on a range of meiobenthic communities. *Environmental Pollution*, *96*(3), 435–444. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(97\)00036-5](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(97)00036-5)
- Bartram, J., Cotruvo, J., Exner, M., Fricker, C., & Glasmacher, A. (2003). Heterotrophic plate counts and drinking water safety: The significance of HPCs for water quality and human health. *IWA Publishing*, 271. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Heterotrophic+Plate+Counts+and+Drinking-water+Safety#8%5Cnhttp://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Heterotrophic+plate+counts+and+drinking-water+safety#8>
- Bellotti, N., Romagnoli, R., Quintero, C., Domínguez-Wong, C., Ruiz, F., & Deyá, C. (2015). Nanoparticles as antifungal additives for indoor water borne paints. *Progress in Organic Coatings*, *86*(April), 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2015.03.006>
- Blandón, L., Vázquez, M. V., Boannini, E., & Ballarin, B. (2015). Síntesis electroquímica de nanopartículas de plata en presencia de un surfactante neutro. *Afinidad*, *71*, 48–52.
- Brooks, S., & Waldock, M. (2009). *The use of copper as a biocide in marine antifouling paints. Advances in Marine Antifouling Coatings and Technologies*. Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9781845696313.3.492>
- Chambers, L. D., Stokes, K. R., Walsh, F. C., & Wood, R. J. K. (2006). Modern approaches to

- marine antifouling coatings. *Surface and Coatings Technology*, 201(6), 3642–3652. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2006.08.129>
- Cheng, X., Zhang, X., Yin, H., Wang, A., & Xu, Y. (2006). Modifier effects on chemical reduction synthesis of nanostructured copper. *Applied Surface Science*, 253(5), 2727–2732. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2006.05.125>
- Cioffi, N., Torsi, L., Ditaranto, N., Tantillo, G., Ghibelli, L., Sabbatini, L., ... August, V. (2005). Copper Nanoparticle / Polymer Composites with Antifungal and Bacteriostatic Properties, (7), 5255–5262. <https://doi.org/10.1021/cm0505244>
- Cooney, T. E. (1995). Bactericidal activity of copper and noncopper paints. *Infection Control and Hospital Epidemiology: The Official Journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*, 16(8), 444–50. <https://doi.org/10.2307/30141081>
- Cover, N. F., Lai-yuen, S., & Parsons, A. K. (2012). Synergetic effects of doxycycline-loaded chitosan nanoparticles for improving drug delivery and efficacy. *International Journal of Nanomedicine*, 2411–2419.
- Cuadros-Moreno, Pimentel, R. C., & San Martín-Martínez, E. (2014). Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas. *Lat. Am. J. Phys. Educ.*, 8, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.estger.2014.09.005>
- Dafforn, K. A., Lewis, J. A., & Johnston, E. L. (2011). Antifouling strategies: History and regulation, ecological impacts and mitigation. *Marine Pollution Bulletin*, 62(3), 453–465. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.01.012>
- Dang, T. M. D., Le, T. T. T., Fribourg-Blanc, E., & Dang, M. C. (2011). The influence of solvents and surfactants on the preparation of copper nanoparticles by a chemical reduction method. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 2(2). <https://doi.org/10.1088/2043-6262/2/2/025004>
- Dominguez-Wong, C., Loredó-Becerra, G. M., Quintero-González, C. C., Noriega-Treviño, M. E., Compeán-Jasso, M. E., Niño-Martínez, N., ... Ruiz, F. (2014). Evaluation of the antibacterial activity of an indoor waterborne architectural coating containing Ag/TiO₂ under different relative humidity environments. *Materials Letters*, 134, 103–106. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2014.07.067>
- Eguía López, E. (2000). Patentes antiincrustantes de base vinilica y de clorocaucho aplicadas

sobre estructuras artificiales en la bahía de Santander. *Estudios e Investigaciones Marinas*, 1(1).

Fujishima, A., Rao, T. N., & Tryk, D. A. (2000). Titanium dioxide photocatalysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 1(1), 1–21. [https://doi.org/10.1016/S1389-5567\(00\)00002-2](https://doi.org/10.1016/S1389-5567(00)00002-2)

Geonmonond, R. S., Da Silva, A. G. M., & Camargo, P. H. C. (2018). Controlled synthesis of noble metal nanomaterials: Motivation, principles, and opportunities in nanocatalysis. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 90(1), 719–744. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170561>

Gladis, F., Eggert, A., Karsten, U., & Schumann, R. (2010). Prevention of biofilm growth on man-made surfaces: Evaluation of antialgal activity of two biocides and photocatalytic nanoparticles. *Biofouling*, 26(1), 89–101. <https://doi.org/10.1080/08927010903278184>

Grass, G., Rensing, C., & Solioz, M. (2011). Metallic copper as an antimicrobial surface. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(5), 1541–1547. <https://doi.org/10.1128/AEM.02766-10>

Guillard, R. R. L., & Ryther, J. H. (1962). STUDIES OF MARINE PLANKTONIC DIATOMS Can . J . Microbiol . Downloaded from www.nrcresearchpress.com by WAGENINGEN UR on 01 / 26 / 15 For personal use only . Abstract Can . J . Microbiol . Downloaded from www.nrcresearchpress.com by WAGENINGEN UR on 01 / 2. *Canadian Journal of Microbiology*, 8(1140), 229–239. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2014.03.058>

Gutiérrez, C. E. W. (2005). Las NANOPARTÍCULAS: pequeñas estructuras con gran potencial ¿Por qué el interés en estos materiales? ¿Qué aplicaciones tienen? *Contacto Nuclear*, 24–29. Retrieved from <http://www.inin.gob.mx/publicaciones/documentospdf/39 NANOPARTICULAS.pdf>

Hajipour, M. J., Fromm, K. M., Akbar Ashkarran, A., Jimenez de Aberasturi, D., Larramendi, I. R. De, Rojo, T., ... Mahmoudi, M. (2012). Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in Biotechnology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.06.004>

Hashemipour, H., Zadeh, M. E., & Pourakbari, R. (2011). Investigation on synthesis and size control of copper nanoparticle via electrochemical and chemical reduction method. *International Journal of the Physical Sciences Vol.*, 6(18), 4331–4336.

<https://doi.org/10.5897/IJPS10.204>

- Jeong, S., Woo, K., Kim, D., Lim, S., Kim, J. S., Shin, H., ... Moon, J. (2008). Controlling the thickness of the surface oxide layer on Cu nanoparticles for the fabrication of conductive structures by ink-jet printing. *Advanced Functional Materials*, 18(5), 679–686. <https://doi.org/10.1002/adfm.200700902>
- Johnson, L. T., & Gonzalez, J. A. (2004). Staying afloat with nontoxic antifouling strategies for boats. California Sea Grant College Program Report No. T-054, 92123(November), 26.
- Kaiser, J. P., Zuin, S., & Wick, P. (2013). Is nanotechnology revolutionizing the paint and lacquer industry? A critical opinion. *Science of the Total Environment*, 442, 282–289. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.10.009>
- Kawakami, H., Yoshida, K., Nishida, Y., Kikuchi, Y., & Sato, Y. (2008). Antibacterial Properties of Metallic Elements for Alloying Evaluated with Application of JIS Z 2801:2000. *ISIJ International*, 48(9), 1299–1304. <https://doi.org/10.2355/isijinternational.48.1299>
- Keki, S., Torok, J., Deak, G., Daroczi, L., & Zsuga, M. (2000). Silver Nanoparticles by PAMAM-Assisted Photochemical Reduction of Ag⁺. *Journal of Colloid and Interface Science*, 553, 550–553. <https://doi.org/10.1006/jcis.2000.7011>
- Khaydarov, R. A., Khaydarov, R. R., Garupova, O., Estrin, Y., & Scheper, T. (2009). Electrochemical method for the synthesis of silver nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, (July). <https://doi.org/10.1007/s11051-008-9513-x>
- Klasen, H. J. (2000). A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. *Burns*, 26.
- Lagerström, M., Lindgren, J. F., Holmqvist, A., Dahlström, M., & Ytreberg, E. (2018). In situ release rates of Cu and Zn from commercial antifouling paints at different salinities. *Marine Pollution Bulletin*, 127(December 2017), 289–296. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.12.027>
- Li, W.-R., Xie, X.-B., Shi, Q.-S., Duan, S.-S., Ouyang, Y.-S., & Chen, Y.-B. (2011). Antibacterial effect of silver nanoparticles on Staphylococcus aureus. *BioMetals*, 24(1), 135–141. <https://doi.org/10.1007/s10534-010-9381-6>
- Li, Y., Horsman, M., Wu, N., Q. Lan, C., & Dubois-Calero, N. (2008). Biofuels from

- Microalgae. *Biotechnology Progress*, 24(4), 815–820.
<https://doi.org/10.1021/bp.070371k>
- Liu, Y., Lai, Q., Dong, C., Sun, F., Wang, L., Li, G., & Shao, Z. (2013). Phylogenetic diversity of the *Bacillus pumilus* group and the marine ecotype revealed by multilocus sequence analysis. *PLoS ONE*, 8(11), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080097>
- Liz-Marzán, L. M. (2004). Nanometals: Formation and color. *Materials Today*, 7(2), 26–31. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(04\)00080-X](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(04)00080-X)
- López, G., Morales, R., Olea, O., Sánchez, V., Trujillo, J., Varela, V., & Vilchis-Nestor, A. R. (2013). *Nanoestructuras metálicas*.
- Martí, R., Barrachina, E., Fraga, D., Calvet, I., & Stoyanova, T. (2015). *Síntesis y depósito de capasfotoabsorbentes tipo cigs para dispositivos fotovoltaicos*.
- Moritz, M., & Geszke-Moritz, M. (2013). The newest achievements in synthesis, immobilization and practical applications of antibacterial nanoparticles. *Chemical Engineering Journal*, 228, 596–613. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.05.046>
- Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramírez, J. T., & Yacaman, M. J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16(10), 2346–2353. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/059>
- Mueller, N. C., & Nowack, B. (2008). Exposure modelling of engineered nanoparticles in the environment. *Environmental Science & Technology*, 42(12), 44447–53. <https://doi.org/10.1021/es7029637>
- Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J., & Setlow, P. (2000). Resistance of *Bacillus* Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3), 548–572. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.3.548-572.2000>
- Omae, I. (2003). General aspects of tin-free antifouling paints. *Chemical Reviews*, 103(9), 3431–3448. <https://doi.org/10.1021/cr030669z>
- Pal, S., Tak, Y. K., & Song, J. M. (2015). Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 290(42), 1712–1720. <https://doi.org/10.1128/AEM.02218-06>

- Pallavicini, P., Dacarro, G., Cucca, L., Denat, F., Grisoli, P., Patrini, M., & Taglietti, A. (2011). A monolayer of a Cu²⁺-tetraazamacrocyclic complex on glass as the adhesive layer for silver nanoparticles grafting, in the preparation of surface-active antibacterial materials. *New Journal of Chemistry*, 1198–1201. <https://doi.org/10.1039/c0nj00829j>
- Paredes, F., & Roca, J. J. (2004). Acción de los antibióticos. *Ámbito Farmacéutico Farmacología*, 23(3), 116–124. Retrieved from [pps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet?_f=10&pident_articulo=13059414&pident_usuario=0&pcontactid=&pident_revista=4&ty=144&accion=L&origen=zonadelectura&web=www.elsevier.es&lan=es&fichero=4v23n03a13059414pdf001.pdf](https://www.elsevier.es/watermark/ctl_servlet?_f=10&pident_articulo=13059414&pident_usuario=0&pcontactid=&pident_revista=4&ty=144&accion=L&origen=zonadelectura&web=www.elsevier.es&lan=es&fichero=4v23n03a13059414pdf001.pdf)
- Perkampus, H.-H. (1992). UV-VIS Spectroscopy and Its Applications. In *UV-VIS Spectroscopy and Its Applications* (pp. 1–2). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-77477-5_1
- Raja, M., Shuba, J., Ali, F. B., & Ryu, S. H. (2008). Synthesis of copper nanoparticles by electroreduction process. *Materials and Manufacturing Processes*, 23(8), 782–785. <https://doi.org/10.1080/10426910802382080>
- Reetz, M. T., & Helbig, W. (1994). Size-Selective Synthesis of Nanostructured Transition Metal Clusters. *Journal of the American Chemical Society*, 116(16), 7401–7402. <https://doi.org/10.1021/ja00095a051>
- Rinaudi, L. V., & González, J. E. (2009). The low-molecular-weight fraction of exopolysaccharide II from *Sinorhizobium meliloti* is a crucial determinant of biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 191(23), 7216–7224. <https://doi.org/10.1128/JB.01063-09>
- Rodríguez-Sánchez, L., Blanco, M. C., & López-Quintela. (2000). Electrochemical Synthesis of Silver Nanoparticles. *American Chemical Society*, 9683–9688.
- Roucoux, A., Schulz, J., & Patin, H. (2002). Reduced Transition Metal Colloids: A Novel Family of Reusable Catalysts?, (33). <https://doi.org/10.1021/cr010350j>
- Saber, A. T., Koponen, I. K., Jensen, K. A., Jacobsen, N. R., Mikkelsen, L., Moller, P., ... Wallin, H. (2012). Inflammatory and genotoxic effects of sanding dust generated from nanoparticle-containing paints and lacquers. *Nanotoxicology*, 6(7), 776–788. <https://doi.org/10.3109/17435390.2011.620745>

- Salthammer, T., & Fuhrmann, F. (2007). Photocatalytic surface reactions on indoor wall paint. *Environmental Science and Technology*, 41(18), 6573–6578. <https://doi.org/10.1021/es070057m>
- Seil, J. T., & Webster, T. J. (2012). Antimicrobial applications of nanotechnology: Methods and literature. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 2767–2781. <https://doi.org/10.2147/IJN.S24805>
- Shahcheraghi, S. H., Schaffie, M., & Ranjbar, M. (2018). Development of an electrochemical process for production of nano-copper oxides: Agglomeration kinetics modeling. *Ultrasonics Sonochemistry*, 44(January), 162–170. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.02.024>
- Siefert, J. L., Larios-Sanz, M., Nakamura, L. K., Slepecky, R. A., Paul, J. H., Moore, E. R. B., ... Jurtshuk, P. (2000). Phylogeny of marine Bacillus isolates from the Gulf of Mexico. *Current Microbiology*, 41(2), 84–88. <https://doi.org/10.1007/s002840010098>
- Starowicz, M., Stypuła, B., & Banaś, J. (2006). Electrochemical synthesis of silver nanoparticles. *Electrochemistry Communications*, 8(2), 227–230. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2005.11.018>
- Tan, Y., Li, Y., & Zhu, D. (2004). Noble Metal Nanoparticles Encyclopedia. In *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology* (Vol. 8, pp. 9–40).
- Theivasanthi, T., & Alagar, M. (2011). Nano sized copper particles by electrolytic synthesis and characterizations. *International Journal of the Physical Sciences*, 6(15), 3662–3671. <https://doi.org/10.5897/IJPS10.116>
- Theivasanthi, T., & Alagar, M. (2012). Electrolytic Synthesis and Characterization of Silver Nanopowder. *Nano Biomedicine and Engineering*, 4(2). <https://doi.org/10.5101/nbe.v4i2.p58-65>
- Turkevich, John; Cooper, P. H. J. (1951). A study of the nucleation and growth process in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*, 55(c), 55–75. <https://doi.org/10.1039/df9511100055>
- UMER, A., NAVEED, S., RAMZAN, N., & RAFIQUE, M. S. (2012). SELECTION OF A SUITABLE METHOD FOR THE SYNTHESIS OF COPPER NANOPARTICLES. *Nano*, 07(05), 1230005. <https://doi.org/10.1142/S1793292012300058>

- Vasco, G., & Valencia, D. V. (2008). Estudio De La Contaminación Por Tbt (Tributilo De Estaño).
- Vigneshwaran, N., Ashtaputre, N. M., Varadarajan, P. V, Nachane, R. P., Paralikar, K. M., & Balasubramanya, R. H. (2007). Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus flavus*. *Materials Letters*, *61*, 1413–1418. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2006.07.042>
- Walt, D. R. (2002). Top-to-bottom functional design. *Nature Materials*, *1*, 17–18. <https://doi.org/10.1038/nmat714>
- Williams, D. B., & Carter, C. B. (2009). *Transmission Electron Microscopy. Handbook of Surface and Interface Analysis*. Springer US. <https://doi.org/doi:10.1201/9781420007800-c6>
- Yang, H., Ouyang, J., Tang, A., Xiao, Y., Li, X., Dong, X., & Yu, Y. (2006). Electrochemical synthesis and photocatalytic property of cuprous oxide nanoparticles. *Materials Research Bulletin*, *41*(7), 1310–1318. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2006.01.004>
- Yebra, D. M., Kiil, S., & Dam-Johansen, K. (2004). Antifouling technology - Past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Progress in Organic Coatings*, *50*(2), 75–104. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2003.06.001>
- Yin, B., Ma, H., Wang, S., & Chen, S. (2003). Electrochemical Synthesis of Silver Nanoparticles under Protection of Poly(*N*-vinylpyrrolidone). *The Journal of Physical Chemistry B*, *107*(34), 8898–8904. <https://doi.org/10.1021/jp0349031>
- Yuan, G., Chang, X., & Zhu, G. (2011). Electrosynthesis and catalytic properties of silver nano/microparticles with different morphologies. *Particuology*, *9*(6), 644–649. <https://doi.org/10.1016/j.partic.2011.03.011>
- Yuan, G. Q., Jiang, H. F., Lin, C., & Liao, S. J. (2007). Shape- and size-controlled electrochemical synthesis of cupric oxide nanocrystals. *Journal of Crystal Growth*, *303*(2), 400–406. <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgr.2006.12.047>