



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO

DIVISIÓN ACADÉMICA DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA



**EFFECTO ANTIMICROBIANO DE NANOMATERIALES DE Cu-ZnO OBTENIDOS POR
SÍNTESIS ASISTIDA POR EXTRACTO DE LIRIO ACUÁTICO**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA

PRESENTA:

ING. MIRIAN HERNÁNDEZ GUTIÉRREZ

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

DRA. MAYRA ANGÉLICA ÁLVAREZ LEMUS

EN CODIRECCIÓN:

DR. ROSENDO LÓPEZ GONZÁLEZ

CUNDUACÁN, TABASCO, MARZO DE 2026



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO

DIVISIÓN ACADÉMICA DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA



**EFFECTO ANTIMICROBIANO DE NANOMATERIALES DE Cu-ZnO OBTENIDOS POR
SÍNTESIS ASISTIDA POR EXTRACTO DE LIRIO ACUÁTICO**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA**

PRESENTA:

ING. MIRIAN HERNÁNDEZ GUTIÉRREZ

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

DRA. MAYRA ANGÉLICA ÁLVAREZ LEMUS

EN CODIRECCIÓN:

DR. ROSENDO LÓPEZ GONZÁLEZ



DIRECCIÓN

CUNDUACÁN, TABASCO, MARZO DE 2026

Declaración de Autoría y Originalidad

En la Ciudad de Cunduacán, el día 11 del mes de marzo del año 2026, la que suscribe Ing. Mirian Hernández Gutiérrez alumna del Programa de la Maestría en Ciencias en Ingeniería, con número de matrícula 232D19003, adscrito a la División Académica de Ingeniería y Arquitectura, de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, como autora de la Tesis presentada para la obtención del grado de Maestra en Ciencias en Ingeniería y titulada "Efecto antimicrobiano de nanomateriales de Cu-ZnO obtenidos por síntesis asistida por extracto de lirio acuático" dirigida por la Dra. Mayra Angélica Álvarez Lemus.

DECLARO QUE:

La Tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la LEY FEDERAL DEL DERECHO DE AUTOR (Decreto por el que se reforman y adicionan diversas disposiciones de la Ley Federal del Derecho de Autor del 01 de Julio de 2020 regularizando y aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad o contenido de la Tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

Cunduacán, Tabasco a 11 de marzo 2026.

Nombre y Firma



Ing. Mirian Hernández Gutiérrez



JEFATURA DE POSGRADO

Cunduacán, Tabasco a 11 de marzo de 2026.

MEM/AP-DAIA/13/2026

PARA **DRA. DORA MARÍA FRÍAS MÁRQUEZ**
DIRECTORA DE LA DAIA
DE: COMISIÓN SINODAL
ASUNTO: APROBACIÓN DE IMPRESIÓN DE TESIS DE MAESTRÍA

Una vez hecha la revisión detallada del Trabajo de Tesis denominado:

“Efecto antimicrobiano de nanomateriales de Cu-ZnO obtenidos por síntesis asistida por extracto de lirio acuático”

Desarrollado por la Ing.: **MIRIAN HERNÁNDEZ GUTIÉRREZ**, de la **Maestría en Ciencias en Ingeniería**, le comunicamos que aceptamos la impresión del trabajo, ya que el mismo ha cumplido con los requisitos necesarios.

COMITÉ SINODAL

DR. JUAN BARAJAS FERNÁNDEZ
PRESIDENTE

DRA. DORA MARÍA FRÍAS MARQUEZ
SECRETARIO

DRA. MAYRA ANGÉLICA ÁLVAREZ LEMUS
VOCAL 1

DRA. SUSANA DEL CARMEN DE LA ROSA
GARCÍA
VOCAL 2

DR. SERGIO ALBERTO GÓMEZ CORNELIO
VOCAL 3



UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



División
Académica
de Ingeniería
y Arquitectura



2026
año de
Margarita
Maza

DIRECCIÓN

OFICIO: DAIA/DIR/270/2026
FECHA: 13 de marzo de 2026
ASUNTO: Autorización de
impresión definitiva

ING. MIRIAN HERNÁNDEZ GUTIÉRREZ
PASANTE DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA
PRESENTE

En virtud de haber elaborado su trabajo de TESIS denominado:

"Efecto antimicrobiano de nanomateriales de Cu-ZnO obtenidos por síntesis asistida por extracto de lirio acuático"

Para obtener el grado de **Maestría en Ciencias en Ingeniería** y en el cual ha tenido como Director de Tesis a la Dra. Mayra Angélica Álvarez Lemus y su Co-director el Dr. Rosendo López González.

Tengo a bien autorizarle la **IMPRESIÓN DEFINITIVA** de dicho trabajo, continuando con los trámites correspondientes para su examen de obtención de grado.

Sin otro particular, le envío un afectuoso saludo.

ATENTAMENTE

DRA. DORA MARÍA FRÍAS MÁRQUEZ
DIRECTORA

c.c.p. Archivo
DRA'DMFM / MCA'RACT



DIRECCIÓN

Carta de Cesión de Derechos

Cunduacán, Tabasco a 11 de marzo de 2026.

Por medio de la presente manifiesto haber colaborado como autora en la producción, creación y realización de la obra denominada "Efecto antimicrobiano de nanomateriales de Cu-ZnO obtenidos por síntesis asistida por extracto de lirio acuático".

Con fundamento en el artículo 83 de la Ley Federal del Derecho de Autor y toda vez que, la creación y realización de la obra antes mencionada se realizó bajo la comisión de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco; entendemos y aceptamos el alcance del artículo en mención, de que tenemos el derecho al reconocimiento de autores de la obra, y la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco mantendrá en un 100% la titularidad de los derechos patrimoniales por un periodo de 20 años sobre la obra en la que colaboramos, por lo anterior, cedemos el derecho patrimonial exclusivo en favor de la Universidad.

COLABORADORES



Mirian Hernández Gutiérrez
Egresada



Dra. Mayra Angélica Álvarez Lemus
Directora



Dr. Rosendo López González
Codirector

TESTIGOS



Dr. Sergio Alberto Gómez Cornelio



Dra. Susana del Carmen de la Rosa García

Dedicatoria

A Dios, por el don de la vida, por cada bendición y oportunidad recibida a lo largo de mi vida. Sin Él no sería posible nada. Por guiarme y fortalecerme, sobre todo en los momentos difíciles. Por encontrar el sentido de la vida en su inmenso amor. A Él, mi eterno agradecimiento.

A mis padres, Antonio Hernández Gómez y Elisa Gutiérrez Álvarez, por estar siempre presentes. Son mi motor, mi apoyo y mi mayor tesoro. Me siento afortunada de tenerlos como padres. Gracias por escucharme siempre, por aconsejarme e impulsarme a no desistir. Gracias por acompañarme en esta segunda travesía. No existen palabras suficientes para expresar mi gratitud hacia ustedes.

A mi hermano Ing. Antonio Hernández Gutiérrez, por estar siempre pendiente de mí, por tus palabras y apoyo incondicional.

A mi familia materna, por su cariño, paciencia y por inspirarme constantemente a ser una mejor persona.

A mis amigos y compañeros de esta etapa: Martín, Víctor y Osiris, quienes hicieron este camino más ameno. Gracias por las charlas, los ánimos y el apoyo constante. Los conocí en distintos momentos de mi vida, y agradezco que permanezcan en ella, tanto en los días luminosos como en los difíciles. Y a mi amiga no humana, Nube/Guachi, por su compañía silenciosa y constante.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), por la beca de maestría otorgada.

A mi alma máter, la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, en particular a la División Académica de Ingeniería y Arquitectura, por la formación académica brindada.

A mi directora de tesis, la Dra. Mayra Angélica Álvarez Lemus, por guiarme y apoyarme en el desarrollo de este proyecto. Agradezco profundamente sus enseñanzas, consejos y la confianza depositada en mí a lo largo de estos años. Gracias por impulsarme a ser mejor persona. Le tengo un profundo respeto y es una gran inspiración para mí.

A mi codirector de tesis, el Dr. Rosendo López Gonzáles, por su apoyo y orientación durante el desarrollo de este trabajo.

A los integrantes del comité revisor, por sus comentarios y observaciones, los cuales contribuyeron a mejorar este proyecto de investigación.

Al Dr. Sergio Alberto Gómez Cornelio y a la Dra. Susana del Carmen de la Rosa García, por su apoyo en la realización de los ensayos de la actividad antimicrobiana, así como por su disposición y orientación.

Al equipo de trabajo del Laboratorio de nanotecnología para aplicaciones en biomedicina y medio ambiente (Nanoujat)-DAIA, del Laboratorio de Microbiología Aplicada (LABMIA)-DACBiol, de la Universidad Politécnica del Centro y del Laboratorio Nacional de Nano y Biomateriales (LANNBIO), por las facilidades brindadas para la realización del presente trabajo.

Índice de Contenido

Índice de tablas.....	IV
Índice de figuras	IV
Resumen.....	1
Palabras claves.....	1
Abstract	2
Keywords.....	2
Capítulo 1. Generalidades.....	3
1.1. Introducción	3
1.2. Justificación	4
1.3. Pregunta de investigación.....	4
1.4. Hipótesis.....	5
1.5. Objetivo general.....	5
1.6. Objetivos específicos	5
Capítulo 2. Marco Teórico	6
2.1. Nanomateriales de Cu-ZnO	6
2.1.1. ZnO	6
2.1.2. Cu	6
2.1.3. Cu-ZnO.....	7
2.1.4. Métodos de síntesis.....	8
2.2. Síntesis biológica asistida por extractos.....	9
2.2.1. Uso de extractos de plantas.....	9
2.2.2. Empleo del lirio acuático en la síntesis de nanopartículas.....	10
2.3. Efectividad antimicrobiana de nanomateriales	12
2.3.1. Mecanismos de acción	12
2.3.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana.....	13

2.4.	Antecedentes	14
Capítulo 3.	Metodología	17
3.1.	Reactivos	17
3.2.	Obtención del extracto acuoso de lirio acuático.	17
3.3.	Caracterización del extracto de lirio acuático	18
3.3.1.	Determinación de polifenoles y flavonoides	18
3.3.2.	Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR).....	19
3.3.3.	Análisis termogravimétrico (TGA)	19
3.4.	Síntesis ZnO	20
3.5.	Síntesis nanomateriales Cu-ZnO	20
3.6.	Actividad antimicrobiana (MIC y MBC).....	22
3.7.	Técnicas de caracterización.....	24
3.7.1.	Análisis termogravimétrico (TGA)	24
3.7.2.	Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR).....	24
3.7.3.	Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS).....	24
3.7.4.	Difracción de Rayos X (DRX).....	25
3.7.5.	Dispersión de luz dinámica y electroforética (DLS y ELS).....	25
3.7.6.	Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	26
Capítulo 4.	Resultados y Discusión.....	27
4.1.	Caracterización del extracto de lirio acuático	27
4.1.1.	Determinación de polifenoles y flavonoides	27
4.1.2.	Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR).....	27
4.1.3.	Análisis termogravimétrico (TGA)	30
4.2.	Actividad antimicrobiana (MIC y MBC).....	32
4.3.	Técnicas de caracterización.....	43
4.3.1.	Análisis termogravimétrico (TGA)	43
4.3.2.	Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR).....	48

4.3.3. Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS).....	53
4.3.4. Difracción de Rayos X (DRX).....	61
4.3.5. Dispersión de luz dinámica y electroforética (DLS y ELS).....	65
4.3.6. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)	72
Capítulo 5. Conclusiones Y Perspectivas	79
5.1. Conclusiones	79
5.2. Perspectivas	81
Capítulo 6. Referencias.....	83
Capítulo 7. Anexos.....	96
Anexo 1: Curva de calibración del ácido gálico	96
Anexo 2: Curva de calibración de la quercetina	96
Anexo 3: MIC, MBC y modo de acción de ZnO y Cu-ZnO frente a <i>S. aureus</i>	97
Anexo 4: MIC, MBC y modo de acción de ZnO y Cu-ZnO frente a <i>E. coli</i>	97
Anexo 5: Espectro FTIR de los precursores de zinc y cobre	98
Anexo 6: Alojamiento de la Tesis en el Repositorio Institucional.....	99

Índice de tablas

Tabla 1. Lista de nanomateriales Cu-ZnO.....	21
Tabla 2. Relación entre componentes del espectro C 1s de ZnO y Cu-ZnO	59
Tabla 3. Porcentajes atómicos de las muestras de ZnO y Cu-ZnO	60
Tabla 4. Parámetros cristalinos de los nanomateriales ZnO y Cu-ZnO	63
Tabla 5. Tamaño hidrodinámico, índice de polidispersidad y potencial zeta de ZnO y Cu-ZnO	68
Tabla 6. Parámetros descriptivos del tamaño de partículas de los nanomateriales ZnO y Cu-ZnO	76

Índice de figuras

Figura 1. Aplicaciones de las nanopartículas de A) ZnO y B) Cu	7
Figura 2. Rutas de la síntesis de nanopartículas	9
Figura 3. Representación esquemática de la síntesis asistida por extracto de plantas ..	10
Figura 4. Composición fitoquímica del lirio acuático	11
Figura 5. Descripción esquemática de los mecanismos antibacterianos.....	12
Figura 6. Representación del efecto antibacteriano de las nanopartículas, provocados a través del estrés oxidativo	13
Figura 7. Procedimiento de obtención del extracto acuoso de lirio acuático	18
Figura 8. Procedimiento de la síntesis de nanomateriales Cu-ZnO	21
Figura 9. Esquema de la determinación de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y Bactericida (MBC)	23
Figura 10. Espectros FTIR del extracto de lirio liofilizado sin tratamiento térmico y sometido a tratamientos térmicos a 160, 250 y 500 °C.....	28
Figura 11. Curvas termogravimétricas (TGA) y su derivada (DTG) del extracto de lirio liofilizado	30
Figura 12. Ensayo de microdilución de los nanomateriales Cu-ZnO y ZnO contra <i>S. aureus</i>	33
Figura 13. Determinación de la MBC de los nanomateriales Cu-ZnO y ZnO contra la <i>S. aureus</i>	34
Figura 14. Valores de MIC y MBC de los nanomateriales Cu-ZnO y ZnO frente a <i>S. aureus</i>	35

Figura 15. Ensayo de microdilución de los nanomateriales Cu-ZnO y ZnO contra <i>E. coli</i>	36
Figura 16. Determinación de la MBC de los nanomateriales Cu-ZnO y ZnO contra <i>E. coli</i>	37
Figura 17. Valores de MIC y MBC de los nanomateriales Cu-ZnO y ZnO frente a <i>E. coli</i>	38
Figura 18. Curva termogravimétrica del ZnO sintetizado empleando acetato de zinc	44
Figura 19. Curvas termogravimétricas de las muestras de ZnO y Cu-ZnO	46
Figura 20. Porcentajes de pérdida de masa de los nanomateriales de ZnO y Cu-ZnO ..	48
Figura 21. Espectros FTIR de ZnO a 70 y 500 °C	49
Figura 22. Espectros FTIR de los nanomateriales de ZnO y Cu-ZnO	50
Figura 23. Magnificación de los espectros FTIR de ZnO y Cu-ZnO	52
Figura 24. Espectros XPS de barrido amplio de ZnO y Cu-ZnO	53
Figura 25. Espectros locales de alta resolución del orbital 2p del zinc de las muestras de ZnO y Cu-ZnO	54
Figura 26. Espectros locales de alta resolución del orbital 2p del cobre de las muestras de ZnO y Cu-ZnO	55
Figura 27. Espectros locales de alta resolución del orbital 1s del oxígeno de las muestras de ZnO y Cu-ZnO	56
Figura 28. Espectros locales de alta resolución del orbital 1s del carbono de las muestras de ZnO y Cu-ZnO	57
Figura 29. Porcentajes atómicos del cobre en Cu-ZnO determinados por XPS	61
Figura 30. Patrones de difracción de rayos X de ZnO y Cu-ZnO	62
Figura 31. Distribución del tamaño hidrodinámico de los nanomateriales de ZnO y Cu-ZnO	66
Figura 32. Valores de tamaño hidrodinámico de las muestras de ZnO y Cu-ZnO	67
Figura 33. Valores de potencial zeta de los nanomateriales de ZnO y Cu-ZnO	69
Figura 34. Micrografías TEM de ZnO y Cu-ZnO. Barra de escala: 500 nm	73
Figura 35. Histograma de la distribución de los tamaños de partícula de ZnO y Cu-ZnO	76
Figura 36. Micrografías TEM de ZnO y Cu-ZnO. Barra de escala: 200 nm	78

Resumen

Con el objetivo de incrementar la actividad antimicrobiana de nanopartículas de ZnO, se sintetizaron y caracterizaron nanopartículas de ZnO modificadas con 0.5, 1 y 3 %m de cobre mediante síntesis bioasistida con extracto acuoso de *Eichhornia crassipes*. Adicionalmente, se evaluó el efecto del precursor de la sal de cobre comparando acetato, sulfato y nitrato de cobre.

Para determinar el efecto del cobre y del extracto en las propiedades del ZnO, los nanomateriales se caracterizaron, mediante las espectroscopías infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y fotoelectrónica de electrones (XPS), análisis termogravimétrico (TGA), difracción de rayos-X (DRX) y dispersión de luz dinámica (DLS) y electroforética (ELS) así como también se determinó su actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Los nanomateriales de Cu-ZnO mostraron menores concentraciones mínimas inhibitorias que las nanopartículas de ZnO, siendo *S. aureus* más susceptible que *E. coli*, con valores de concentración mínima inhibitoria entre 1.25 y 2.5 mg/mL, con efecto bactericida, para los materiales Cu-ZnO-A-3, Cu-ZnO-S-1 y Cu-ZnO-N-0.5.

El extracto de lirio acuático se caracterizó, identificándose polifenoles y flavonoides, los cuales tras ser calcinados a 500°C son parcialmente degradados mostrando bandas en el espectro infrarrojo alrededor de 1457 y 1416 cm^{-1} asociadas principalmente a C-O-H, C-H y R-CH=CH₂. Estos resultados confirman las observaciones hechas por FTIR y XPS de los materiales Cu-ZnO, ya que se detectaron rastros de especies carbonáceas en los nanomateriales calcinados, lo cual permite asumir una funcionalización *in situ* durante la síntesis. La presencia de cobre con estado de oxidación +2 se confirmó para todos los materiales obteniéndose porcentajes atómicos en superficie de entre 0.47 y 2.03%. El análisis por DRX reveló la fase wurtzita hexagonal del ZnO, mientras que la dispersión de luz evidenció la carga superficial negativa de los nanomateriales variando entre -19.2 y -9.7 mV. Las partículas con mayor bioactividad, Cu-ZnO-A-3, Cu-ZnO-S-1 y Cu-ZnO-N-0.5, exhibieron morfologías predominantemente triangulares con tamaños promedio de 143.95, 153.86 y 152.41 nm, respectivamente.

En conjunto, la incorporación de Cu²⁺ en el ZnO, y los fitocompuestos del extracto de lirio, favorecieron el incremento de la actividad antimicrobiana del ZnO, especialmente frente a *S. aureus*.

Palabras claves

Cu-ZnO, *Eichhornia crassipes*, actividad antimicrobiana

Abstract

To enhance the antimicrobial activity of ZnO nanoparticles, ZnO nanoparticles modified with 0.5, 1 and 3 wt% copper were synthesized and characterized through a bio-assisted synthesis using an aqueous extract of *Eichhornia crassipes*. Additionally, the effect of the copper salt precursor was evaluated by comparing copper acetate, sulfate, and nitrate.

To determine the influence of copper and the plant extract on the properties of ZnO, the nanomaterials were characterized by Fourier-transform infrared (FTIR) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), thermogravimetric analysis (TGA), X-ray diffraction (XRD), and dynamic (DLS) and electrophoretic (ELS) light scattering. Their antimicrobial activity was also evaluated against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The Cu-ZnO nanomaterials exhibited lower minimum inhibitory concentrations (MIC) than pure ZnO nanoparticles, with *S. aureus* being more susceptible than *E. coli*, achieving MIC values between 1.25 and 2.5 mg/mL and a bactericidal effect for Cu-ZnO-A-3, Cu-ZnO-S-1 and Cu-ZnO-N-0.5.

The water hyacinth extract was characterized, identifying polyphenols and flavonoids that were partially degraded after calcination at 500 °C, showing infrared bands at approximately 1457 and 1416 cm⁻¹ associated mainly with C-O-H, C-H and R-CH=CH₂ groups. These results support the FTIR and XPS observations of Cu-ZnO materials, in which traces of carbonaceous species were detected after calcination, suggesting in situ functionalization during synthesis. The presence of Cu²⁺ was confirmed in all samples, with surface atomic percentages ranging from 0.47 to 2.03 %. XRD analysis revealed the hexagonal wurtzite phase of ZnO, while light scattering measurements evidenced negative surface charges between -19.2 and -9.7 mV. The most bioactive particles, Cu-ZnO-A-3, Cu-ZnO-S-1, and Cu-ZnO-N-0.5, exhibited predominantly triangular morphologies with average sizes of 143.95, 153.86 and 152.41 nm, respectively.

Overall, the incorporation of Cu²⁺ into ZnO and the phytochemicals from the plant extract enhanced the antimicrobial activity of ZnO, particularly against *S. aureus*.

Keywords

Cu-ZnO, *Eichhornia crassipes*, antimicrobial activity

Capítulo 1. Generalidades

1.1. Introducción

El tratamiento de aguas es un tema de amplio interés debido a la necesidad el acceso a vital líquido. La contaminación del agua por microorganismos representa un riesgo sanitario importante, ya que facilita la propagación de enfermedades infecciosas. Entre los principales agentes biológicos presentes en el agua se encuentran bacterias (como *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*), además de cianobacterias, virus, hongos, entre otros (Ojha, 2020). En México el 55.4% del agua superficial presenta contaminación microbiana (Comisión Nacional del Agua (CONAGUA) & Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), 2018). Ante este panorama, los métodos convencionales de tratamiento de aguas, como los procesos físicos o químicos, han resultado insuficientes debido a su limitada eficiencia en la remoción de contaminantes refractarios y microorganismos patógenos, lo que ha impulsado la búsqueda de alternativas más efectivas. De este modo, la nanotecnología ha emergido como una alternativa, debido a que las nanopartículas presentan propiedades antimicrobianas que, dependiendo de su composición, tamaño y concentración, pueden mostrar baja toxicidad para las células humanas en rangos controlados, y que además, los microorganismos no generan resistencia contra estas nanopartículas, a diferencia de los antibióticos (Baruah et al., 2019; Ojha, 2020).

La aplicación de las nanopartículas de metal y óxido de metal en el tratamiento de aguas es prometedora, debido a que el control microbiano de estos nanomateriales es incluso mejor que algunos antibióticos (Baruah et al., 2019); tal es el caso del Cu y del ZnO. Además, se ha registrado que la combinación de dos nanomateriales de esta naturaleza tiene como resultado la modificación y mejora de sus propiedades. Con respecto a las nanopartículas de ZnO (NP de ZnO) se ha reportado que presenta una mayor eficiencia en la actividad antimicrobiana cuando se le adiciona otra nanopartícula de tipo metálico (Al-Rajhi et al., 2022) como el Cu.

Sin embargo, aunque se ha reportado la obtención de los nanomateriales de Cu-ZnO mediante la adición de un extracto vegetal (Al-Rajhi et al., 2022; Karthik et al., 2022) aún no se ha determinado el efecto de los constituyentes fitoquímicos en la formación de las nanopartículas y en sus propiedades finales y cómo es que estos extractos potencializan su capacidad antibacteriana. El extracto de lirio acuático (*Eichhornia crassipes*), se ha empleado para la síntesis de diferentes nanopartículas debido a que su composición fitoquímica contribuye a la obtención de estas y que se ha reportado que dicho extracto posee también propiedades antimicrobianas hacia ciertas cepas, aún se requiere explorar diversas combinaciones de

nanopartículas y el efecto de los extractos de plantas como las hojas de lirio acuático, ya que aún no se han desarrollado nanomateriales bactericidas de amplio espectro.

1.2. Justificación

En la actualidad, se han desarrollado procedimientos para la obtención de nanomateriales de Cu y ZnO mediante síntesis biológica. En el caso del Cu, trabajos previos han demostrado que exhibe una notable actividad antimicrobiana frente a diferentes cepas (Chakraborty et al., 2022), lo cual ha derivado en su aplicación en medicamentos antibacterianos y purificadores de agua comerciales (Baruah et al., 2019). Sin embargo, no se ha reportado el posible efecto del tipo de precursor sobre las propiedades físicas, químicas y antimicrobianas del material Cu, lo cual podría proporcionar información importante para el desarrollo de nanomateriales más efectivos. Así mismo, el uso del extracto de lirio acuático como agente de reacción en la síntesis de Cu ha sido escasamente reportado, limitándose principalmente a aplicaciones en la degradación de contaminantes (Velázquez-Hernández et al., 2019). Considerando lo anterior, la evaluación de la actividad antimicrobiana asociada a este extracto ha sido poco reportada.

De igual manera, se ha encontrado que las NP de ZnO obtenidas por síntesis biológica presentan una actividad antimicrobiana eficaz contra una variedad significativa de patógenos, en comparación con las NP de ZnO obtenidas por síntesis química (Raha & Ahmaruzzaman, 2022). De forma conjunta, el nanomaterial Cu-ZnO ha sido empleado como fotocatalizador en la remoción de orgánicos presentes en aguas residuales (Karthik et al., 2022; Khalid et al., 2022; Lemecho et al., 2022) y, en menor medida, en la inactivación de microorganismos, contra los cuales han demostrado una alta actividad antibacteriana (Al-Rajhi et al., 2022). Por lo tanto, aunque la actividad antimicrobiana del Cu y del ZnO, por separado, está ampliamente reportada, se requiere profundizar en el estudio de dicha propiedad del nanomaterial Cu-ZnO empleando cepas que estén relacionadas con las aguas residuales. Además, se requiere llevar un análisis más exhaustivo acerca del extracto de lirio acuático, para relacionar la participación de sus componentes fitoquímicos tanto en la formación de las nanopartículas como en sus propiedades, lo cual permitirá orientar el diseño de materiales más eficientes y de amplio espectro, con potencial aplicación en el tratamiento de aguas residuales.

1.3. Pregunta de investigación

¿Cómo afecta la incorporación de Cu^{2+} en las propiedades electrocinéticas, morfológicas, estructurales y antimicrobianas de los nanomateriales Cu-ZnO obtenidas por síntesis asistida con extracto de lirio acuático?

1.4.Hipótesis

La incorporación de Cu^{2+} en NP de ZnO sintetizadas en presencia de extracto de lirio acuático incrementa la actividad antimicrobiana en comparación con NP de ZnO no modificadas.

1.5.Objetivo general

Analizar del efecto en las propiedades electrocinéticas, morfológicas y estructurales de nanomateriales de Cu-ZnO del extracto de lirio acuático como medio de reacción para su aplicación como agente antimicrobiano.

1.6.Objetivos específicos

- Determinar el efecto del precursor en la obtención y propiedades de los nanomateriales de ZnO y Cu-ZnO, a partir del método asistido con extracto de lirio acuático, para establecer los parámetros idóneos de síntesis, tal como la concentración y precursor del Cu^{2+} .
- Evaluar el efecto en la actividad microbiológica de los parámetros de síntesis de nanomateriales Cu-ZnO a partir de extracto de lirio acuático para su empleo como agente antimicrobiano.
- Determinar el efecto de la incorporación de Cu^{2+} en nanomateriales de Cu-ZnO obtenidos a partir del extracto de lirio acuático en las propiedades electrocinéticas, morfológicas y estructurales para su aplicación como agentes antimicrobianos.

Capítulo 2. Marco Teórico

2.1. Nanomateriales de Cu-ZnO

2.1.1. ZnO

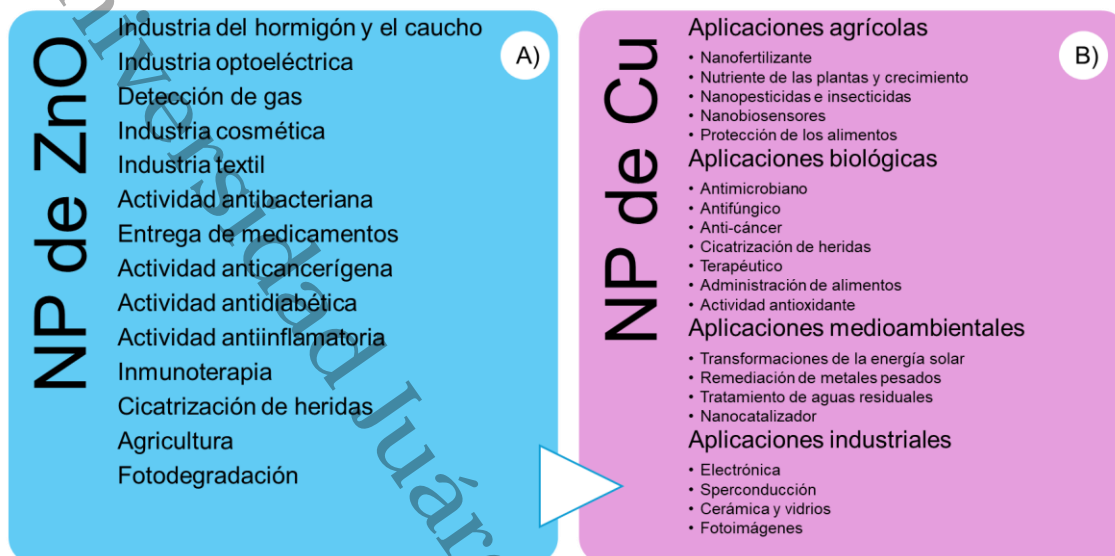
El óxido de zinc (ZnO) es un material con aplicaciones en diversas industrias, como en la industria textil, agricultura, cosmética, entre otras (Figura 1A) (Raha & Ahmaruzzaman, 2022). Este material es ampliamente utilizado debido a que presenta propiedades como alto potencial redox, no toxicidad y bajo costo (Raha & Ahmaruzzaman, 2022), las cuales son mejoradas cuando el ZnO es de tamaño nanométrico. En concreto, las nanopartículas de ZnO (NP de ZnO) poseen una banda prohibida amplia (3.37 eV), elevada energía de unión de excitones (60 MeV), alta conductividad electrónica no toxicidad y estabilidad química (Sánchez-López et al., 2020). Además, se ha documentado que las NP de ZnO exhiben una notable actividad antibacteriana contra bacterias tanto Gram positivas (*S. aureus*, *S. epidermis*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *E. faecium*, entre otras) como contra Gram negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella sp.*, entre otras) (Sánchez-López et al., 2020), sobre todo, las obtenidas mediante síntesis biológica (Raha & Ahmaruzzaman, 2022).

2.1.2. Cu

Las nanopartículas de óxido de cobre o cobre (NP de CuO o Cu) son usados en diversos ámbitos, como en fotocatalisis, nanofertilizantes, electrónica, tratamiento de aguas, etc (Figura 1B) (Bhavyasree & Xavier, 2022). Sumado a su bajo costo y elevado rendimiento, estas nanopartículas presentan propiedades como gran área superficial, biocompatibilidad y alta reactividad biológica y química (Chakraborty et al., 2022). Además, presenta una buena actividad antimicrobiana contra cepas Gram positivas y Gram negativas, como, por ejemplo: *P. aeruginosa*, *C. difficile*, *S. aureus* y *E. coli* (Chakraborty et al., 2022), aunque, en realidad, su capacidad de inhibir microorganismos no está totalmente definido (Sánchez-López et al., 2020). Para la obtención de las NP de Cu, se suelen emplean como precursores el CuSO_4 , $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ o $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (Sánchez-López et al., 2020). Diversos estudios han reportado que las NP de Cu son capaces de degradar varios colorantes, como el rojo Congo, la rodamina-B y el azul de metileno (Chakraborty et al., 2022).

Figura 1

Aplicaciones de las nanopartículas de A) ZnO y B) Cu



Nota. Adaptado de a) “ZnO nanostructured materials and their potential applications: progress, challenges and perspectives”, por S. Raha & M. Ahmaruzzaman, 2022, *Nanoscale Advances*, 4(8) y b) “Green synthesis of copper/copper oxide nanoparticles and their applications: a review.”, por N. Chakraborty, et al., 2022, *Green Chemistry Letters and Reviews*, 15(1).

2.1.3. Cu-ZnO

La modificación del ZnO con otro elemento es una opción prometedora, debido a que se presenta una configuración electrónica adecuada, además de que sus propiedades fisicoquímicas se verían potenciadas (Abebe et al., 2020). Dado que el ion de Cu^{2+} tiene un radio iónico semejante al Zn^{2+} , es viable la obtención de nanomateriales de Cu-ZnO (Abebe et al., 2024). De acuerdo con Khatir & Zak (2024), la adición de Cu al ZnO puede alterar las propiedades electrónicas y estructurales en comparación al ZnO sin modificar, además de proporcionar mayor estabilidad y área superficial. En cuanto a sus propiedades antimicrobianas, se ha reportado que tanto las nanopartículas de ZnO como el Cu son agentes antimicrobianos de amplio espectro, por lo que, en conjunto, el Cu-ZnO es un material apto para su aplicación contra cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas (Khatir & Zak, 2024).

Se ha reportado diversas morfologías del Cu-ZnO, entre ellas: esferas, cilindros, varillas, nanocables, en forma de flor, etc.; estas formas dependen en gran medida en el método de obtención de estos nanomateriales (Abebe et al., 2020; Karthik et al., 2022; Khalid et al., 2022; Khatir & Zak, 2024). Aunado a esto, Abebe et al. (2020) reporta que el tamaño de partícula, la

cristalinidad, la concentración de los precursores y el pH de la solución desempeña un papel importante en las propiedades de los nanomateriales Cu-ZnO. Finalmente, entre las aplicaciones de este nanomaterial, se ha empleado principalmente en la degradación fotocatalítica, para dispositivos de almacenamiento eléctrico, sensores de gas, generación de hidrógeno, administración de fármacos, así como agentes antimicrobianos (Khatir & Zak, 2024).

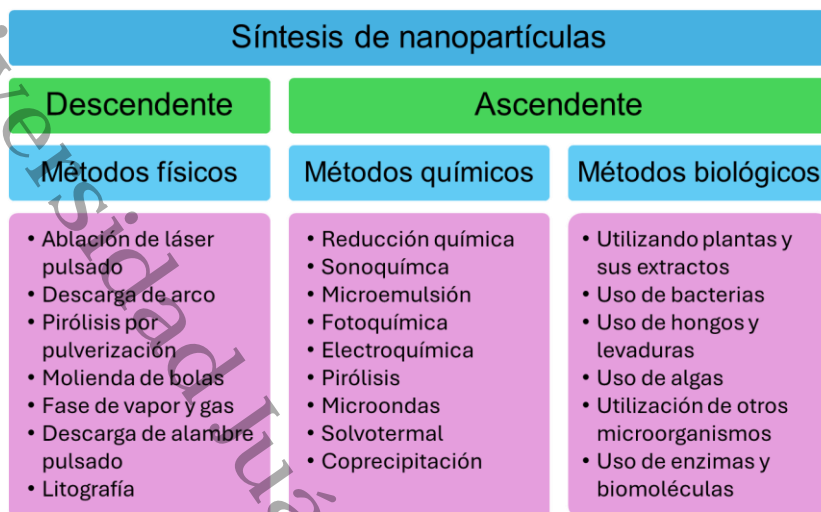
2.1.4. Métodos de síntesis

Las nanopartículas se pueden obtener a partir de diferentes tipos de síntesis, las cuales se clasifican en dos enfoques: a) Top-down approach (conocido como “descendente” o “de arriba hacia abajo”) y b) Bottom-up approach (“ascendente” o “de abajo hacia arriba”). A su vez, los métodos de síntesis se pueden clasificar en físicos, químicos y biológicos (Dikshit et al., 2021). De estos, los métodos físicos pertenecen al enfoque “descendente”, debido a que en este enfoque las nanopartículas se producen a través de la reducción de tamaño. Mientras que, los métodos químicos y biológicos son clasificados en el segundo enfoque (“ascendente”) (Sánchez-López et al., 2020).

En los métodos físicos, se encuentran la ablación láser, la litografía, la evaporación-condensación, entre otros, los cuales tienen la desventaja de tener una baja tasa de producción, además de implicar costos elevados (Dikshit et al., 2021). Por otro lado, los métodos químicos abarcan la reducción química, microemulsión y coprecipitación, entre otros; estos se caracterizan por emplear precursores químicos, agentes reductores, solventes orgánicos, así como condiciones de reacción relativamente “suaves”. Finalmente, los métodos biológicos se presentan como una alternativa segura y sostenible, ya que estos métodos implican el uso de recursos biológicos (como plantas, bacterias, algas, hongos, etc.), que, junto con las sales precursoras, permiten obtener nanopartículas de diversos tamaños y morfologías, de acuerdo con las condiciones de síntesis empleados (Bhavyasree & Xavier, 2022). En la Figura 2 se muestran los métodos de síntesis correspondientes a los métodos físicos, químicos y biológicos.

Figura 2

Rutas de la síntesis de nanopartículas



Nota. Adaptado de “Green synthesis of copper/copper oxide nanoparticles and their applications: a review.”, por N. Chakraborty, et al., 2022, *Green Chemistry Letters and Reviews*, 15(1).

2.2. Síntesis biológica asistida por extractos

2.2.1. Uso de extractos de plantas

En la síntesis biológica, el uso de plantas es una de las estrategias más empleadas, debido a que son de fácil acceso, rentables, fáciles de procesar y, sobre todo, son menos tóxicas a diferencia del empleo de microorganismos (Bhavyasree & Xavier, 2022). Se han documentado diversos estudios que utilizan diferentes partes de plantas, como hojas, raíces, semillas o frutos, en la producción de nanopartículas (Bandeira et al., 2020). Los extractos de estas diferentes partes de las plantas se pueden obtener por tres vías: por extracción en caliente, extracción en frío y utilizando un aparato Soxhlet (Dikshit et al., 2021), teniendo además la versatilidad de emplear una gran variedad de solventes, lo que permite extraer también diferentes fitocompuestos.

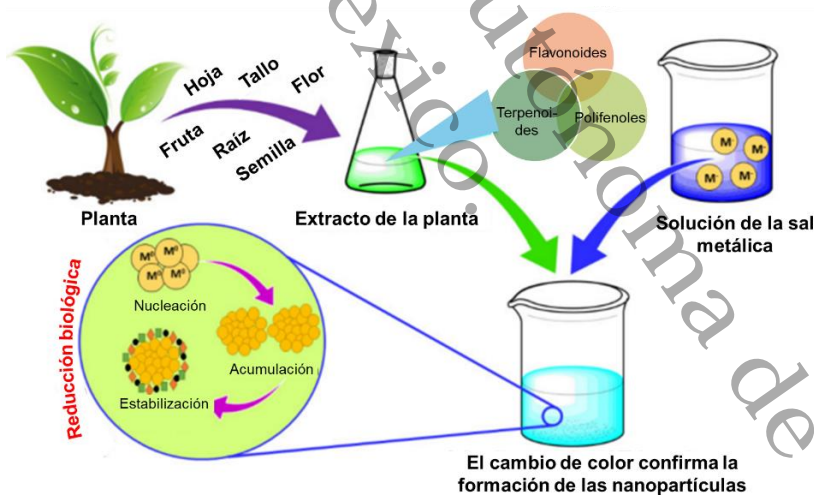
Los componentes de las plantas representan un rol clave en la síntesis de las nanopartículas, ya que se ha reportado que pueden actuar como estabilizadores y reductores de las sales precursoras (Dikshit et al., 2021). Entre los componentes presentes en las plantas se encuentran los ácidos fenólicos, los flavonoides, las metilxantinas y las saponinas (Bandeira et al., 2020). El uso de extractos de plantas proporciona un parámetro adicional a controlar en la síntesis de nanomateriales ya que, se puede variar según el tipo y/o parte de la planta, solvente

para extraer los fitocompuestos, concentración del extracto, además del volumen empleado durante la síntesis. En este sentido, Akintelu et al., (2020) mencionan que se ha encontrado una relación entre el volumen del extracto de planta empleado y la velocidad de la síntesis, dado que, cuando se emplea un mayor volumen, la concentración de los fitocompuestos de la planta es mayor en la solución, lo cual permite que la velocidad de la síntesis sea más rápida.

En general, la síntesis biológica asistida con extractos de plantas consiste en adicionar una solución de la sal precursora al extracto previamente obtenido, y controlar la temperatura y el pH a un valor determinado (Figura 3), dependiendo de las características que tendrán las nanopartículas (Dikshit et al., 2021). Dado que el extracto de una planta en particular contiene una variedad compleja de componentes, no se ha establecido el mecanismo de obtención de nanopartículas por este tipo de síntesis. Sin embargo, Dikshit et al., (2021) establecen que la síntesis de nanopartículas metálicas mediada por extractos puede estar establecida en tres etapas. 1) ocurre la reducción de iones metálicos a átomos metálicos, y la nucleación de dichos átomos reducidos, 2) se presenta la unión de pequeñas nanopartículas en nanopartículas de mayor tamaño y 3) se termina el proceso, obteniendo la forma final de las nanopartículas.

Figura 3

Representación esquemática de la síntesis asistida por extracto de plantas



Nota. Adaptado de “Green synthesis of metallic nanoparticles: Applications and limitations”, por P. K. Dikshit, et al., 2021, *Catalysts*, 3(17).

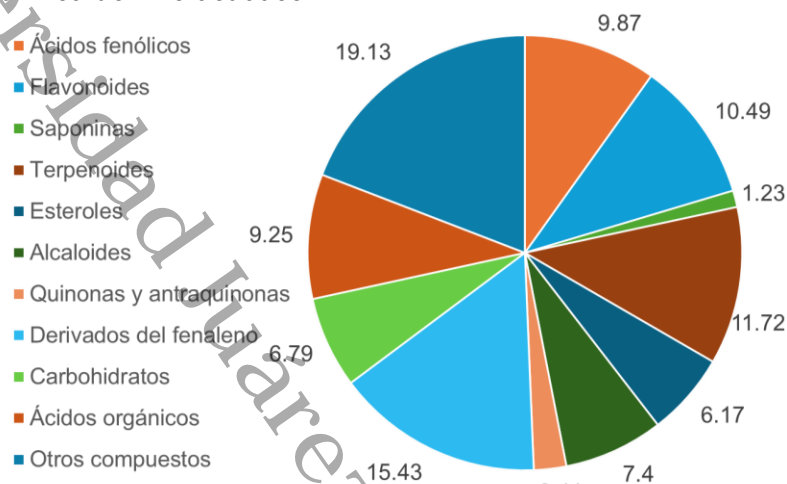
2.2.2. Empleo del lirio acuático en la síntesis de nanopartículas

El lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) está catalogado como una de las especies invasoras de los cuerpos de agua, debido a que, además de su alta velocidad de crecimiento, es altamente resistente a cambios de su entorno, como el pH, los nutrientes disponibles y las condiciones de temperatura en las que se encuentre. Además, la presencia del lirio acuático en

los cuerpos de agua lleva a una disminución del oxígeno disponible y a la obstrucción de la luz solar, lo que tiene un impacto negativo significativo en el ecosistema (Rodríguez-Lara et al., 2022).

Figura 4

Composición fitoquímica del lirio acuático



Nota. Adaptado de *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms: A Comprehensive Review of Its Chemical Composition, Traditional Use, and Value-Added Products”, por Bakrim, et al., 2022, *Frontiers in Pharmacology*, 13.

Se ha reportado la presencia de diversos metabolitos secundarios en esta planta, entre los que se encuentran los polifenoles, flavonoides, ácidos grasos, alcaloides, esteroides entre otros (Figura 4) (Bakrim et al., 2022). La presencia de estos componentes ha provocado que esta planta sea aplicada en diversos ámbitos, como en la producción de etanol, la fitorremediación, el abono verde, la extracción de ácidos grasos volátiles, en la bioadsorción de tintes industriales (como el cristal violeta, el azul de metileno y el rojo Congo) (Rodríguez-Lara et al., 2022) y, recientemente, en el proceso de obtención de distintas nanopartículas, tales como las NP de ZnO (Jaithon et al., 2022; Kalaivani & Ravi, 2023; López González et al., 2024; Vanathi et al., 2014), de Cu (Roy et al., 2019) y el nanomaterial Cu-ZnO (Lemecho et al., 2022). La incorporación del extracto en la síntesis de las nanopartículas antes mencionadas ha mostrado resultados prometedores en el incremento de sus propiedades fotocatalíticas, optoelectrónicas y antimicrobianas, en comparación con aquellas en donde no se usa el extracto.

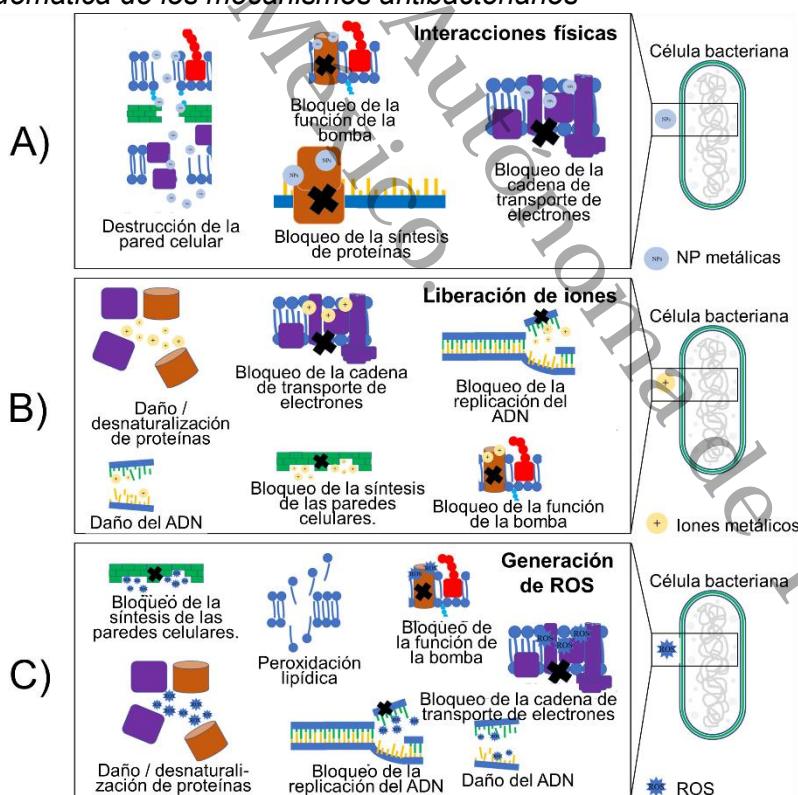
2.3.Efectividad antimicrobiana de nanomateriales

2.3.1.Mecanismos de acción

Aunque no se ha determinado con precisión el mecanismo antibacteriano exacto ejercido por las nanopartículas, se han propuesto algunos mecanismos, entre los que se encuentran a) las interacciones físicas, en las cuales, las nanopartículas se adhieren a la superficie bacteriana y alteran la membrana celular o interactúan con componentes intracelulares (Figura 5A) (Franco et al., 2022), b) liberación de iones, donde los iones pueden difundirse hacia el interior de la célula, y alterar la permeabilidad y el balance iónico, causando daños que finalmente ocasionan la muerte celular (Figura 5B) (Ozda & Gurkok, 2022) y c) la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), considerada el principal mecanismo de acción de muchas nanopartículas metálicas, la acumulación de ROS, tanto extracelular como intracelular, provoca oxidación de lípidos, proteínas y ADN, lo que inhibe el crecimiento bacteriano y pueden derivar en muerte celular (Figura 5C) (Franco et al., 2022).

Figura 5

Descripción esquemática de los mecanismos antibacterianos

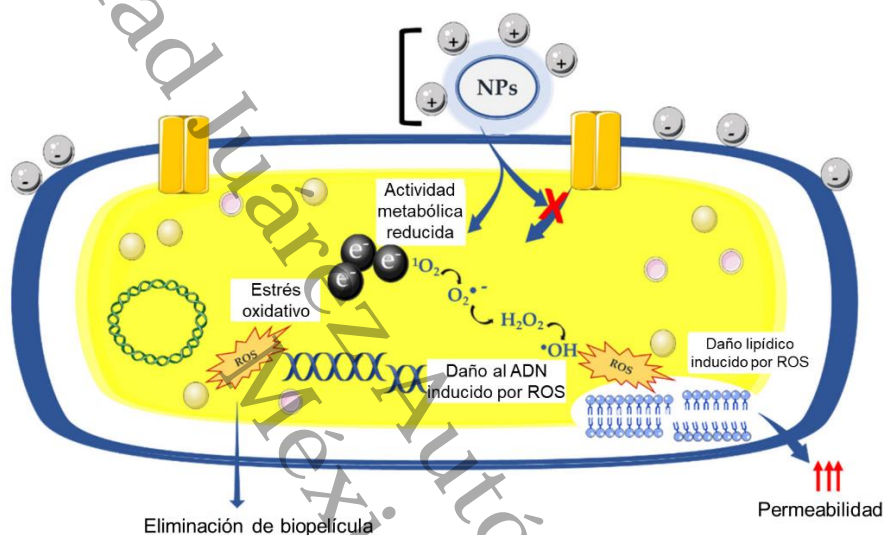


Nota. Mecanismos antibacterianos debido a: A) las interacciones físicas , B) liberación de iones y C) generación de ROS. Adaptado de “Metal-Based Nanoparticles: Antibacterial Mechanisms and Biomedical Application”, por D. Franco, et al., 2022, *Microorganisms*, 25(9).

Por otro lado, Mammari et al., (2022) describen que la actividad antimicrobiana es resultado de una serie de reacciones (Figura 6): primero, se produce una atracción entre la superficie bacteriana y las nanopartículas, lo cual provoca que la membrana celular se desestabilice, generando un cambio en la permeabilidad, seguido de inducción de toxicidad y, debido a que se generan ROS, ocurre el estrés oxidativo.

Figura 6

Representación del efecto antibacteriano de las nanopartículas, provocados a través del estrés oxidativo



Nota. Adaptado de “Current Knowledge on the Oxidative-Stress-Mediated Antimicrobial Properties of Metal-Based Nanoparticles”, por N. Mammari, et al., 2022, *Microorganisms*, 10(2).

2.3.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana

Diversos ensayos antimicrobianos se aplican para analizar las propiedades antimicrobianas de las nanopartículas. Cada ensayo proporciona información que permite evaluar la eficacia y mecanismos mediante los cuales las nanopartículas actúan como agentes antimicrobianos. Hossain, (2024) presentó una recopilación de los métodos mayormente empleados, entre los que se encuentran: el cribado de la actividad antimicrobiana basado en la difusión en agar (entre los que se encuentra la difusión en disco y en pocillo), el método de rayas cruzadas, el ensayo de cocultivo, la técnica de alimentos envenenados, la cinética de muerte en el tiempo, los métodos de dilución en agar y dilución en caldo, el ensayo de resazurina, la prueba de difusión en gradiente antimicrobiano, así como el TLC-bioautografía y la citometría de flujo. Entre estos métodos, la dilución en agar y en caldo son los que se utilizan para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés), la cual es la concentración a la

cual una solución de nanopartículas inhibe el crecimiento de las bacterias evaluadas. Estos métodos son confiables dado que están estandarizados por organizaciones como el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (por sus siglas en inglés, CLSI) (Hossain, 2024).

2.4. Antecedentes

En los años recientes, se ha documentado el uso de recursos biológicos para la obtención de nanopartículas, en lo que se denomina síntesis biológica. Mediante el empleo de estos recursos biológicos, se han obtenido nanopartículas (NP) metálicas y de base óxido metálico como el Cu y el ZnO (Pal et al., 2019). En el caso de las nanopartículas de ZnO (NP de ZnO) obtenidas mediante síntesis biológica, generalmente presentan la estructura de wurtzita hexagonal y suelen variar los tamaños y formas, dependiendo de los parámetros de síntesis (Raha & Ahmaruzzaman, 2022). Además, estas NP de ZnO suelen presentar propiedades mejoradas, como es el caso de la actividad antimicrobiana, debido a que han demostrado buenos resultados contra bacterias Gram positivas, Gram negativas y contra algunas cepas fúngicas, según lo reportado por López González et al., (2024). Por otro lado, en el caso de las nanopartículas a base de Cu, se encuentran las de Cu y las de CuO. En general, la síntesis de NP de Cu implica el uso de un precursor de Cu (como CuCl_2 , CuSO_4 , $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ o $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$), al cual se le adiciona el extracto biológico y se le da el tratamiento para obtener las muestras de Cu y CuO (Chakraborty et al., 2022).

Para la obtención de NP de Cu, el CuSO_4 es el precursor que se ha utilizado con mayor frecuencia. Dashtizadeh et al., (2021) utilizaron como fuente el extracto *Prunus mahaleb* para la obtención de NP de Cu, con el propósito de evaluar la actividad antimicrobiana de las nanopartículas obtenidas, se aplicó el método de difusión en pozos y el método de ensayo de dilución en pocillos, este último, en un rango de concentraciones de 0.0156 a 2 mg/mL. Para ello, eligieron 11 microorganismos diversos, representativos de Gram positivas y Gram negativas y una levadura. Los resultados señalaron que las NP de Cu tienen una buena actividad, sobre todo contra las bacterias Gram positivas como *B. subtilis* y *S. spidermis* con valores de MIC de 0.0156 y 0.25 mg/mL, respectivamente. Un estudio adicional, publicado por Roy et al., (2019), emplea CuSO_4 como precursor, junto con la adición de extracto de lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) como agente reductor, para la obtención de NP de Cu con el propósito de emplearlo en la detección del H_2O_2 .

Otras sales precursoras empleadas en la obtención de NP a base de Cu son el $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ y el $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$. Benassai et al., (2021) emplearon estos precursores en la síntesis bioasistida de nanopartículas de cobre, empleando los extractos acuosos de *Vaccinium myrtillus*

L y *Vaccinium uliginosum* L. subsp. *Gaultherioides*; evaluaron la actividad antimicrobiana contra *E. coli*, *S. aureus*, *S. cerevisiae* y *C. albicans*, encontrando Concentraciones Mínimas Inhibitorias de 3.125 mM, lo cual es equivalente a 0.624 y 0.755 mg/mL, dependiendo del precursor de cobre empleado ($\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ y el $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$); con base en estos resultados, concluyeron que sus nanopartículas son buenos candidatos como agentes antimicrobianos locales o desinfectantes, incluyendo la desinfección de agua. De igual forma, Rajesh et al., (2018), obtuvieron NP de Cu a partir de la adición del extracto de *Syzygium aromaticum* en la síntesis utilizando el precursor $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, con objetivo de determinar sus propiedades físicas, ópticas y antimicrobianas. En este trabajo, usaron el método de difusión en disco de Kirby-Bauer para la evaluación de la actividad antimicrobiana, para lo cual emplearon siete cepas de microorganismos. Los resultados de las NP de Cu indicaron que tenían mayor actividad contra la bacteria *Bacillus sp.* y contra el hongo *Penicillium sp.*, con diámetros de inhibición de 8 y 6 mm, respectivamente, sugiriendo que se pueden emplear como agentes antimicrobianos. Asimismo, Kiranmayee et al., (2023) obtuvo NP de Cu empleando el mismo precursor ($\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) con el extracto de *Piper nigrum*, el cual presentaba buena actividad antimicrobiana a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y un halo de inhibición de 23 mm, específicamente contra *S. aureus*. Por lo que, en los trabajos de investigación antes mencionados (Benassai et al., 2021; Dashtizadeh et al., 2021; Kiranmayee et al., 2023; Rajesh et al., 2018; Roy et al., 2019), se han presentado diferentes resultados de las caracterizaciones de los precursores CuSO_4 , $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ y $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, a partir de los cuales se puede asumir que las propiedades de las NP a base de Cu, están estrechamente vinculadas a las condiciones en que se realice la síntesis, siendo el precursor del Cu una variable importante en la actividad antimicrobiana del material.

Como se ha mencionado anteriormente, las NP a base Cu y las de ZnO presentan propiedades antimicrobianas interesantes de manera independiente, lo cual las convierte en buenas opciones para utilizarse en el tratamiento de microorganismos transmitidos por el agua (Ojha, 2020). Además, se ha reportado que las propiedades de las NP de ZnO presentan una mejora significativa cuando se les agrega un metal, como el Cu. En lo que se refiere a las propiedades antimicrobianas, Al-Rajhi et al., (2022) obtuvieron nanocompuestos de polímeros (carboximetilcelulosa y a gelatina tipo B de piel bovina), a los cuales les adicionaron NP de ZnO dopadas con Cu, utilizando como precursores el acetato de zinc y cobre, respectivamente. Las muestras fueron evaluadas por la técnica de difusión en disco, para ello prepararon suspensiones de los nanocompuestos a una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, de las cuales depositaron 100 μL sobre discos de papel filtro (6 mm), obteniendo una dosis final de 20 μg por disco, frente a diferentes microorganismos (*B. subtilis*, *E. coli*, *E. faecalis*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*,

S. typhimurium y *C. albicans*). Los nanocompuestos mostraron una mejor eficacia en comparación con el antibiótico y el antifúngico usados como control, siendo los diámetros de inhibición de 25 y 44 mm para *S. aureus* y *E. coli*, respectivamente. Por otro lado, en el trabajo reportado por Karthik et al., (2022) emplearon nanopartículas de ZnO dopadas con Cu para la degradación fotocatalítica de contaminantes orgánicos, con distintas cantidades de Cu. En ese estudio, los precursores utilizados fueron el nitrato de zinc y cobre, junto con hojas de *Synadium grantii* como recurso biológico de la síntesis. Los ensayos fotocatalíticos realizados contra tres contaminantes orgánicos mostraron que las NP de ZnO dopadas con Cu al 3 y 5% tienen una mayor actividad fotocatalítica, lo cual permite establecer que los nanomateriales Cu-ZnO obtenidos demostraron ser catalizadores efectivos y reutilizables en la degradación de colorantes orgánicos presentes en aguas contaminadas. Esta misma aplicación del nanomaterial fue estudiada por Lemecho et al., (2022) los cuales emplearon Cu-ZnO en la eliminación del contaminante azul de metileno. Al igual que el trabajo anterior (Karthik et al., 2022), emplean nitrato de zinc y cobre como precursores del ZnO y del Cu, variando el porcentaje de Cu en las muestras, adicionando el extracto de lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) en la síntesis biológica de coprecipitación. En los resultados de caracterización, encontraron formas casi esféricas además que el análisis XPS reflejó la existencia de picos que indican Zn 2p, Cu 2p y O 1s. En cuando a su actividad fotocatalítica, la muestra con mejor rendimiento fue el Cu-ZnO (3%), debido a que degradó el 89% del contaminante azul de metileno.

A partir de la revisión de los antecedentes referentes a las NP de Cu y ZnO, se deduce que hasta el momento no se han encontrado estudios que reporten el uso del nanomaterial Cu-ZnO para el tratamiento de contaminantes biológicos propios de las aguas residuales (es decir, de microorganismos), empleando extracto de lirio acuático. Derivado de lo anterior, se requiere también conocer el efecto del precursor de cobre en la actividad antimicrobiana de NP de ZnO. Por lo que, resulta importante la evaluación del efecto antimicrobiano del nanomaterial de Cu-ZnO sintetizado con extracto de lirio acuático para su aplicación en el tratamiento de contaminantes biológicos presentes en las aguas residuales.

Capítulo 3. Metodología

3.1. Reactivos

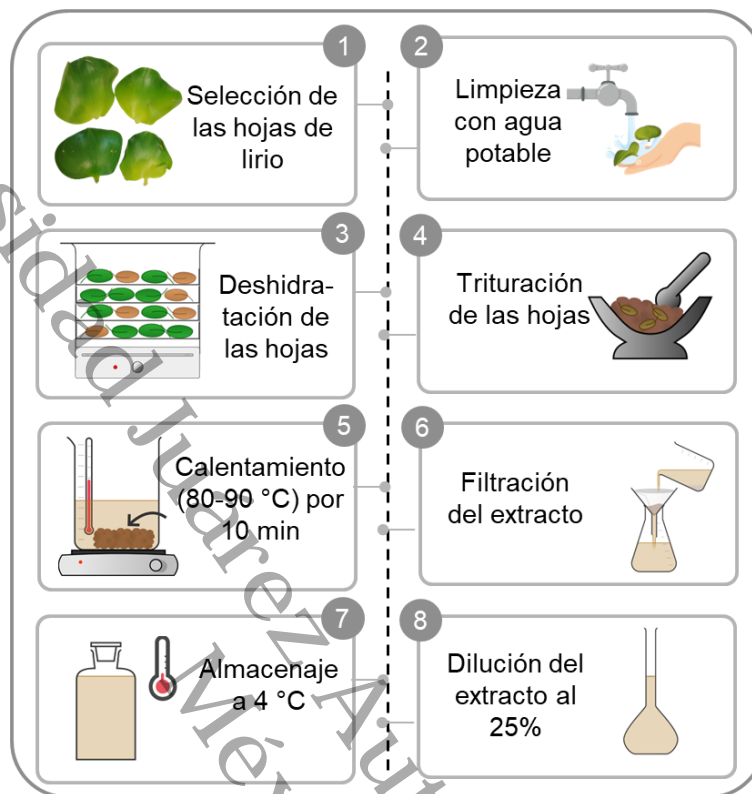
Se emplearon acetato de zinc ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 98% de pureza, Sigma-Aldrich), hidróxido de sodio (NaOH, 98% de pureza, Sigma-Aldrich), acetato de cobre ($\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 98% de pureza, Sigma-Aldrich), sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 95% de pureza, Meyer), nitrato de cobre hidratado ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 98% de pureza, Meyer) y agua desionizada (conductividad $0.055 \mu\text{S cm}^{-1}$, resistividad $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ a 25°C) para la síntesis de las NP de ZnO y los nanomateriales de Cu-ZnO.

3.2. Obtención del extracto acuoso de lirio acuático.

El lirio acuático fue recolectado de la laguna El Negro, en Villahermosa, Tabasco ($18^\circ 00' 33.0''\text{N } 92^\circ 55' 01.1''\text{W}$). El procedimiento para la obtención del extracto acuoso de lirio se ilustra en la Figura 7, y está basada en lo reportado por Vanathi et al. (2014). Las hojas de *E. crassipes* se lavaron con agua potable para retirar impurezas superficiales, se colocaron sobre un paño de tela hasta que el exceso de agua fuera absorbido por esta. Las hojas fueron deshidratadas a velocidad media ($67\text{-}70^\circ\text{C}$) por 5 h en un deshidratador (Cuisinart Dhr-20) y después fueron trituradas. Para la obtención del extracto, se calentaron 100 mL hasta una temperatura cercana a la ebullición ($80\text{-}90^\circ\text{C}$), a la cual se agregaron 5 g del lirio, manteniendo dicha temperatura durante 10 min. Después, el extracto se recuperó por filtración por gravedad, y se almacenó en refrigeración (4°C). El extracto fue diluido al 25% con agua desionizada; este extracto diluido fue empleado durante la síntesis de NP de ZnO y los nanomateriales de Cu-ZnO.

Figura 7

Procedimiento de obtención del extracto acuoso de lirio acuático



3.3. Caracterización del extracto de lirio acuático

Para la caracterización del extracto de lirio acuático, se liofilizó, y se realizó la determinación de polifenoles y flavonoides, así como la técnica de Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) y el Análisis Termogravimétrico (TGA).

3.3.1. Determinación de polifenoles y flavonoides

Para la determinación de polifenoles y flavonoides, se liofilizó 100 mL del extracto acuoso de lirio acuático. A partir del extracto liofilizado, se preparó una solución madre a la concentración de 5 mg/mL.

Se realizó el análisis del Contenido de Polifenoles Totales (TPC) mediante la adaptación de la metodología conocida como Folin-Ciocalteu (Torres-López et al., 2025), empleando ácido gálico (96% de pureza, Spectrum) como compuesto de referencia. Para ello, se realizó una curva de calibración de ácido gálico, empleando concentraciones de 1, 2, 4, 6 y 7 $\mu\text{g/mL}$.

Para el ensayo con la muestra, se mezclaron 10 μL de la solución madre del extracto con 90 μL de metanol (99.8%, Golden Bell). Después, se añadieron 1400 μL de agua, seguido de 250 μL del reactivo Folin-Ciocalteu 1N (2N, Sigma Aldrich). Transcurrido 6 min, se añadieron 250 μL

de Na₂CO₃ (99.5%, Baker) al 20%. Después de 2 h, se midió la absorbancia a 760 nm. El ensayo fue realizado por triplicado, y la concentración de polifenoles se expresa como mg equivalentes de ácido gálico por g extracto seco (mg EAG / g extracto), calculados a partir de la Ecuación 1.

Por otro lado, el análisis del Contenido de Flavonoides Totales (TFC) se llevó a cabo con la metodología del ensayo colorimétrico de cloruro de aluminio con modificaciones menores (Gomes et al., 2017), empleando quercetina (95%, Sigma-Aldrich) como estándar. Para ello, se construyó una curva de calibración con quercetina en concentraciones de 1, 2, 3, 4 y 5 µg/mL. Se empleó 20 µL de la solución madre del extracto, al cual se le adicionaron 80 µL de metanol. Se le añadieron 1675 µL de agua, seguido de 75 µL de NaNO₃ (99%, Meyer) al 5%. Transcurridos 6 min, se agregaron 150 µL de AlCl₃ (97%, Karal) al 10% y, tras 5 min, se añadieron 500 µL de NaOH 1M. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 420 nm. Al igual que el análisis de TPC, la muestra se analizó por triplicado. La concentración de TFC se expresa como mg equivalentes quercetina por g extracto seco (mg EQ / g extracto), calculados a partir de la Ecuación 1.

$$C = \frac{C_1 * V}{m} \quad (1)$$

Donde 'C' es el contenido total en mg / g (equivalente de ácido gálico o quercetina), 'C₁' es la concentración del compuesto de referencia (ácido gálico o quercetina) establecida a partir de la curva de calibración en mg / mL, 'V' el volumen del extracto en mL y 'm' es el peso del extracto liofilizado en g (Molole et al., 2022).

3.3.2. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

Se realizó la espectroscopía FTIR para identificar los grupos funcionales del extracto liofilizado de lirio acuático a diferentes temperaturas: sin calcinar, a 160 °C, 250 °C y 500 °C (con un programa de calcinación de 4 h, a 5 °C/min). Para ello, se analizaron las muestras en un espectrómetro Thermo Nicolet iS50, con resolución de 32 escaneos y en un rango de 4000 a 400 cm⁻¹, se mezclaron 1 mg de muestra y 99 mg de KBr (Meyer, 99%) que se homogeneizaron en un mortero de ágata con pistilo, para posteriormente hacer obleas delgadas empleando una prensa hidráulica (Pike, Crush IR) y una pastilladora de acero (13 mm φ) con una presión de 3 ton.

3.3.3. Análisis termogravimétrico (TGA)

El extracto de lirio liofilizado se analizó por análisis termogravimétrico (TGA), con el fin de analizar las pérdidas de dicha muestra en función de temperatura; el rango empleado fue de 30 a 600 °C, con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. El análisis se llevó a cabo con argón como gas de arrastre, a un flujo de 20 psi empleando un crisol de platino.

3.4. Síntesis ZnO

Se realizó la síntesis de las nanopartículas de ZnO, mediante la reacción de precipitación asistida por extracto de lirio acuático, basado en lo reportado por López González et al. (2024). Para ello, se prepararon 500 mL de una solución 0.02 M del acetato de zinc, y se le adicionaron 19.5 mL del extracto lirio diluido. Después de 2 h de agitación, se ajustó el pH a 12, con una solución 0.2 M de NaOH. La mezcla se dejó por 1 h, y posteriormente se detuvo la agitación y se dejó en reposo aproximadamente 18 h. La muestra fue recuperada por centrifugación (CIVEQ 80-2) a 3500 rpm, y se le realizaron 5 lavados con agua desionizada, para remover residuos del NaOH. La muestra fue secada a 70°C en un horno de secado (ECOSHEL 9023A), se trituró y finalmente se calcinó en una mufla (TERLAB TE-M12DR) a 500°C por 4 h, empleando una rampa de 2 °C/min. La muestra obtenida fue tamizada (tamiz del número 100, con apertura de 0.0059 pulgadas) y etiquetada como "ZnO".

3.5. Síntesis nanomateriales Cu-ZnO

La síntesis de los nanomateriales Cu-ZnO fue realizada empleando como precursor el acetato de zinc, mientras que, para el cobre, se utilizaron tres precursores: el acetato, sulfato y nitrato de cobre, con el objetivo de evaluar la influencia del tipo de precursor en la incorporación del Cu²⁺ en la estructura del ZnO y en las propiedades de los nanomateriales. En la Figura 8 se ilustra el procedimiento modificado de las nanopartículas de ZnO. Inicialmente se prepararon soluciones del precursor de Cu²⁺ (acetato, sulfato y nitrato de cobre) en proporciones de 0.5, 1 y 3 %m, a los cuales se les adicionó acetato de zinc al 0.02 M. Después, se agregaron 19.5 mL del extracto de lirio diluido, y la solución se mantuvo en agitación por 2 h. Se ajustó el pH de la solución a 12, adicionando NaOH 0.2 M, y se continuó con la agitación por 1 h. Transcurrido este tiempo, se detuvo la agitación y se mantuvo en reposo hasta el día siguiente (aproximadamente 18 h). La muestra precipitada se recuperó por centrifugación (3500 rpm), se realizaron 5 lavados con agua desionizada, y se secó a 70°C, para después triturarse en un mortero de ágata. Como tratamiento térmico, se calcinó por 4 h a 500 °C, con una rampa de 2 °C/min. Finalmente, las muestras fueron tamizadas en un tamiz del número 100, con una apertura de 0.0059 in. Los nanomateriales Cu-ZnO obtenidos se enlistan en la Tabla 1.

Figura 8

Procedimiento de la síntesis de nanomateriales Cu-ZnO

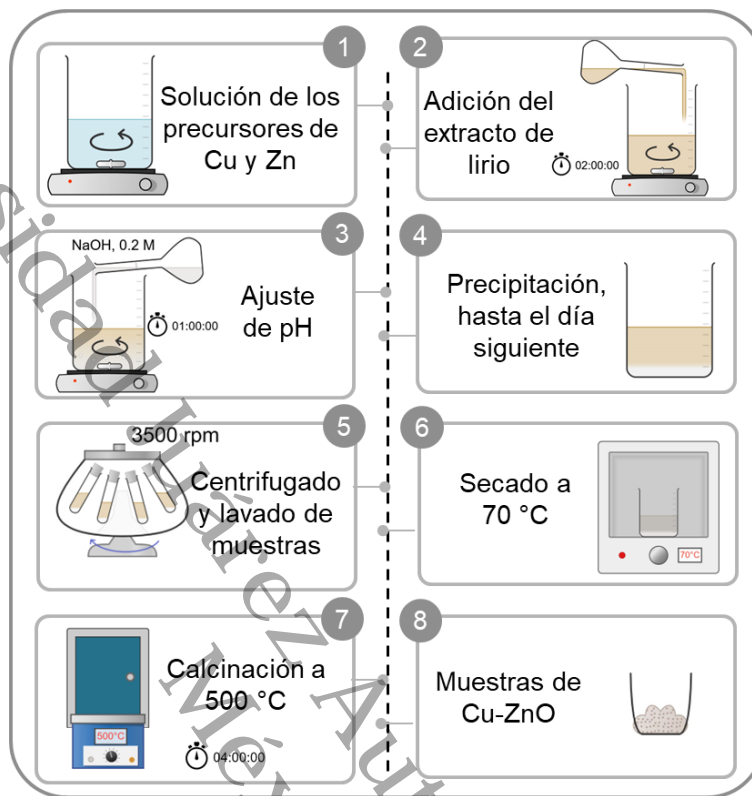


Tabla 1

Lista de nanomateriales Cu-ZnO

Muestra	Precursor de Cu ²⁺	% Cu ²⁺
Cu-ZnO-A-0.5		0.5
Cu-ZnO-A-1	Acetato de cobre	1
Cu-ZnO-A-3		3
Cu-ZnO-S-0.5		0.5
Cu-ZnO-S-1	Sulfato de cobre	1
Cu-ZnO-S-3		3
Cu-ZnO-N-0.5		0.5
Cu-ZnO-N-1	Nitrato de cobre	1
Cu-ZnO-N-3		3

3.6. Actividad antimicrobiana (MIC y MBC)

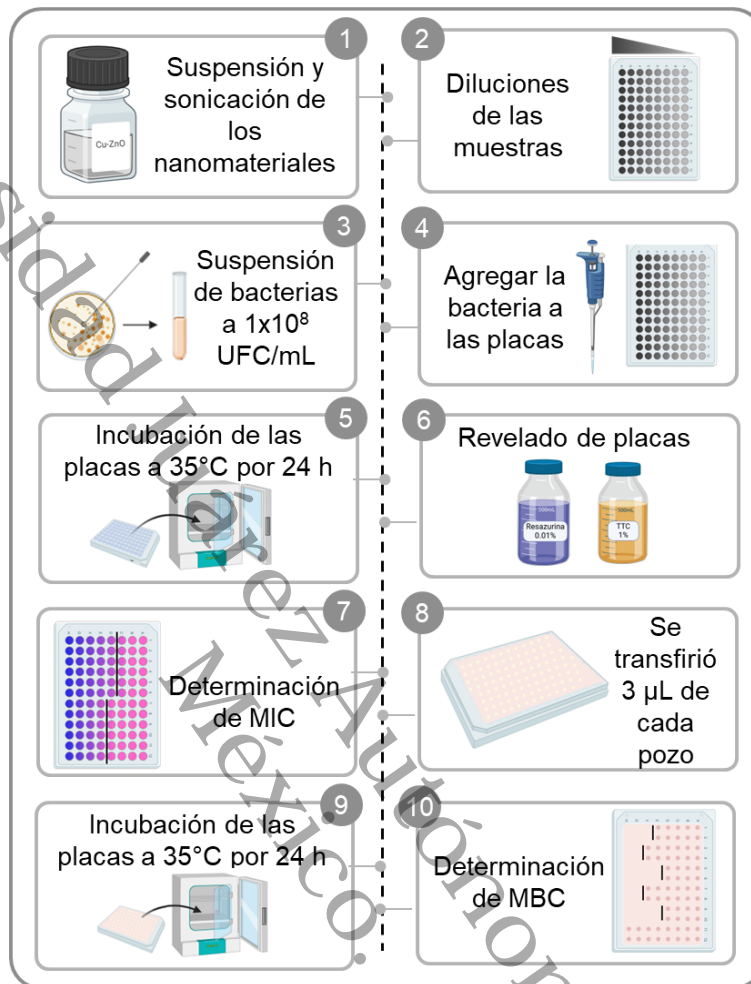
La evaluación de la actividad antimicrobiana de los nanomateriales de Cu-ZnO, así como las nanopartículas de ZnO, fue realizada mediante la técnica de microdilución en caldo, con el fin de determinar la MIC y modo de acción de los nanomateriales contra dos bacterias modelo.

Para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y Bactericida (MBC), se realizó la técnica de microdilución con base en las directrices emitidas por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), con algunas modificaciones (NCCLS, 1999). El procedimiento se ilustra en la Figura 9. El ensayo fue realizado en placas de 96 pozos, empleando cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) (Gram positiva) y *Escherichia coli* (ATCC 5922) (Gram negativa), en caldo de soya tripticaseína (TSB). Se suspendieron las nanopartículas de ZnO y Cu-ZnO en agua destilada estéril, y se sometieron a sonicación por 2 h. Estas soluciones fueron colocadas en placas de 96 pozos, con una concentración inicial de 10 mg/mL, y se realizaron diluciones en hasta 0.08 mg/mL. Como testigo se evaluó el extracto acuoso de lirio.

Las suspensiones de las bacterias fueron ajustadas a 1×10^8 UFC/mL, se realizó una dilución 1:10 y después se depositaron 100 μ L en cada uno de los pozos. Como control positivo a la inhibición, se colocó antibiótico comercial de amplio espectro (amikacina) a diferentes concentraciones seriadas, y como control negativo, se dejaron pocillos sin nanomaterial. Las placas fueron incubadas a 35 °C por 24 h, el ensayo se realizó por duplicado. Transcurrido el tiempo de incubación, una microplaca se reveló con el colorante de viabilidad resazurina (0.01%) y la otra con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazoilo (TTC) al 1%, agregando 30 μ L cada pocillo. Las Concentraciones Mínimas Inhibitorias se establecieron de forma visual, de acuerdo con los cambios de color presentados: la resazurina, de color azul/morado oscuro, indica que no hay viabilidad celular, mientras que las células de las bacterias activas reducen la resazurina en resorufina, la cual presenta tonos rosados y amarillos (P. Costa et al., 2021); por otro lado, para el TTC, los pozos con tonos rojos indican la formación de cristales de formazán debido a la actividad celular.

Figura 9

Esquema de la determinación de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y Bactericida (MBC)



Para la determinación de la Concentración Mínima Bactericida (MBC), tras 24 h de incubación del ensayo de microdilución, se tomaron alícuotas de $3 \mu\text{L}$ de cada pocillo y se transfirieron a placas de agar soya tripticasa (TSA) para evaluar el crecimiento bacteriano. Este procedimiento se realizó antes de la adición del revelador TTC. Las placas se incubaron a 35°C durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se determinaron las MBC de acuerdo con la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano de cada uno de los pozos. Además, para determinar el modo de acción de los nanomateriales se calculó del cociente de MBC/MIC ; considerando efecto bactericida si MBC/MIC es ≤ 4 (es decir, muerte celular), y bacteriostático si el MBC/MIC es superior a 4 (inhibición del crecimiento) (Mogana et al., 2020).

3.7. Técnicas de caracterización

Los nanomateriales obtenidos (ZnO y Cu-ZnO), fueron caracterizados mediante las técnicas: Análisis termogravimétrico (TGA), Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR), Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS), Difracción de Rayos X (DRX), Dispersión de luz dinámica (DLS), Dispersión de luz electroforética (ELS) y Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

3.7.1. Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico (TGA, *thermogravimetric analysis*) es una técnica en donde la masa de la muestra es medida en función del cambio de temperatura, empleando una rampa de temperatura (Haines, 1995). El análisis de las muestras de ZnO y Cu-ZnO secadas a 70°C fue realizado en un analizador termogravimétrico y diferencial de barrido, modelo Setaram LABSYS evo DTA/DSC, en un rango de temperatura de 35 a 600 °C, con una rampa de calentamiento de 10 °C/min. Se empleó como gas de arrastre un flujo de argón a 20 psi. Esta técnica permite identificar las pérdidas de masa de los nanomateriales relacionados a los orgánicos presentes en las muestras tratadas a 70°C.

3.7.2. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopía FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) se emplea para la identificación de grupos funcionales de las muestras, las cuales son analizadas en la región del infrarrojo medio (4000-400 cm^{-1}). De esta técnica, el espectro obtenido evidencia las posiciones de las bandas, las cuales están relacionadas con los enlaces presentes (Mourdikoudis et al., 2018). En el caso del ZnO y Cu-ZnO, se analizaron las señales correspondientes al enlace metal oxígeno del Zn-O, así como a las señales relacionadas con los restos del extracto de lirio empleado durante la síntesis. El equipo utilizado para esta técnica es el Thermo Nicolet iS50, en el módulo de transmisión, con una resolución de 32 escaneos. Para ello, las muestras de ZnO y Cu-ZnO se depositaron al 1 %m pastillas de bromuro de potasio (KBr, 99% de pureza, Meyer), preparadas en una pastilladora de 13 mm de diámetro, con 3 ton de fuerza.

3.7.3. Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS)

La espectroscopía XPS (*X-ray Photoelectron Spectroscopy*) es una técnica de superficie empleada para determinar la composición elemental de muestras que se someten a ultra alto vacío y que son irradiadas con rayos X. Además de la composición elemental, la técnica XPS permite conocer el estado de oxidación de los elementos presentes en las muestras (Faraldos & Goberna, 2011). Las muestras de ZnO y Cu-ZnO fueron analizadas en un equipo K-Alpha (Thermo Fisher Scientific), equipado con un analizador de hemisferio de doble enfoque a 180° y

un detector de 128 canales, con una presión de base de 2×10^{-9} mbar. Para la erosión de las muestras, se empleó un haz de iones de argón acelerados a 3 kV, con una potencia de 30 W, que impacta sobre un área de 1x2 mm, alineado concéntricamente con el haz de rayos X. El espectro de amplio barrido se obtuvo con una energía de 100 eV y 1 eV/paso.

3.7.4. Difracción de Rayos X (DRX)

La técnica de Difracción Rayos X (DRX) permite determinar la cristalinidad de las muestras, además los parámetros de red y el tamaño de cristalito. Este último, se puede determinar mediante la ecuación de Scherrer (Ecuación 2) :

$$D = \frac{K\lambda}{\beta \cos(\theta)} \quad (2)$$

Donde 'D' es el tamaño de partícula cristalina, 'K' la constante de Scherrer ($0.8 < K < 1.1$), ' λ ' la longitud de la onda de la radiación X empleada, ' β ' es el valor del ancho medio del pico con mayor intensidad (medido en radianes) y θ es el ángulo de difracción (Faraldos & Goberna, 2011).

Las muestras de ZnO y Cu-ZnO fueron analizadas en un difractómetro de rayos X Bruker D8 Advance Eco, equipado con un detector de ojo de lince, y con una fuente de radiación Cu-K α ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$), operando a 40 kV y 25 mA. El análisis fue realizado en una región de 2θ , en un intervalo de 10 a 80° , tiempo de 0.4 s y un paso de 0.020° .

3.7.5. Dispersión de luz dinámica y electroforética (DLS y ELS)

La técnica de dispersión de luz dinámica (DLS, *Dynamic Light Scattering*) y electroforética (ELS, *Electrophoretic Light Scattering*) permite caracterizar las muestras dispersas en una solución coloidal, esto considerando que las nanopartículas dispersas están en movimiento browniano continuo. En el caso del DLS, este comportamiento es considerado para medir la dispersión de luz en función del tiempo, lo que permite determinar el tamaño de las partículas en suspensión, en lo que se denomina "tamaño hidrodinámico". Por otro lado, en la técnica ELS se obtienen los valores de potencial zeta, el cual es una medida de la carga de la superficie de las muestras que están en suspensión; este valor permite determinar la estabilidad de las partículas (Titus et al., 2019). Las muestras de ZnO y Cu-ZnO fueron suspendidas al 0.005 %m en agua inyectable estéril, se ultrasonicaron por 1 min, con pulso de 10 s y una amplitud del 20%. Las suspensiones de los nanomateriales se caracterizaron en un analizador de dispersión de luz dinámica Malvern Zetasizer Nano ZS, empleando las celdas Malvern DTS0012 y DTS1070 para las mediciones de DLS y ELS, respectivamente.

3.7.6. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

La microscopía TEM (*Transmission Electron Microscopy*) es una técnica para determinar el tamaño y forma de los nanomateriales. Las imágenes TEM son obtenidas a partir de la interacción de un haz de electrones que se transmite a través de la muestra. Además, las imágenes se pueden obtener en campo claro o campo oscuro; siendo en el campo claro en donde las imágenes se forman a partir de seleccionar el haz no difractado (Sardela et al., 2014). Las muestras deben ser delgadas para que permita la transmisión de los electrones. Para las muestras de Cu-ZnO seleccionadas, junto con las NP de ZnO, se dispersaron en alcohol isopropílico, se sonicaron por 15 min; y posteriormente se colocaron una gota de cada muestra en rejillas de cobre (malla de 300, con recubrimiento de carbono, de 3.05 mm de diámetro) y se secaron en un horno a 60 °C, por 24 h. Las muestras fueron analizadas en un microscopio electrónico de transmisión, JEOL JEM-2100, con un voltaje de aceleración 200 kV y filamento LaB₆, en el modo TEM claro.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

Capítulo 4. Resultados y Discusión

4.1. Caracterización del extracto de lirio acuático

4.1.1. Determinación de polifenoles y flavonoides

Debido a la variabilidad reportada en el contenido de estos fitocompuestos en las plantas, asociado a la zona de recolección, la parte de la planta utilizada, etapa de crecimiento y pre-tratamiento (triturado/seccionado/pulverizado) (Palaigiannis et al., 2023), se caracterizó el extracto liofilizado de *E. crassipes*, con la finalidad de la reproducibilidad de este estudio. Los resultados indicaron una concentración de 196.0 mg EAG / g extracto seco para los polifenoles totales, mientras que, para los flavonoides totales, fue de 37.5 mg EQ / g extracto seco.

Oliveira et al. (2016) reportaron el contenido de polifenoles y flavonoides de tres extractos de plantas, empleando ácido gálico y quercetina como compuestos de referencia. Sus resultados indican el rango de valores para dichos fitocompuestos: *Punica granatum* (167.2 mg/g y 14.9 mg/g), *Crotton lechleri* (85.8 mg/g y 3.03 mg/g) y *Salvia officinalis* (57.1 mg/g y 7.7 mg/g).

Considerando que la formación de nanopartículas está relacionada con la composición fitoquímica del extracto, y dado que el extracto de lirio presenta un mayor contenido de polifenoles y flavonoides en comparación con otras especies, se infiere que posee un contenido adecuado de estos fitocompuestos para emplearse en la síntesis de nanomateriales de ZnO y Cu-ZnO.

4.1.2. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

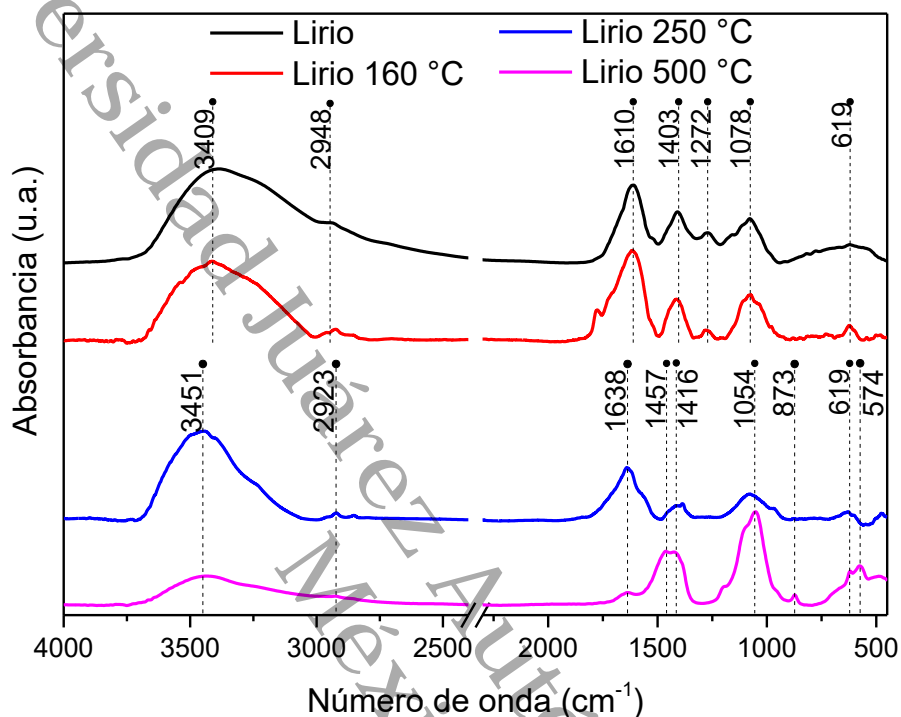
Se realizó el análisis por Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) al extracto acuoso de lirio liofilizado seco y tratado a diferentes temperaturas 160, 250 y 500°C (4 h, 5 °C/min), y los espectros correspondientes se muestran en la Figura 10. Trabajos previos han reportado que, en el caso del lirio acuático, el extracto acuoso contiene polifenoles, flavonoides, taninos, glucósidos, así como otros fitocompuestos (Jayanthi et al., 2011; Lalitha et al., 2012).

Por otro lado, Bakrim et al. (2022) reportaron compuestos fenólicos, flavonoides, esteroides, alcaloides, entre otros, en el lirio acuático; además, en dicho trabajo menciona que de esta variedad de fitocompuestos, los polifenoles y los flavonoides son los que se encuentran en mayor porcentaje.

Esta evidencia, respaldada por tablas de asignación de señales FTIR (Mistry, 2009), y por estudios previos que analizan los extractos acuosos de 25 hierbas (Wongsa et al., 2022), permiten identificar los grupos funcionales presentes en el extracto de lirio acuático.

Figura 10

Espectros FTIR del extracto de lirio liofilizado sin tratamiento térmico y sometido a tratamientos térmicos a 160, 250 y 500 °C.



En el espectro del liofilizado del extracto de lirio sin calcinar y del tratado a 160°C (Figura 10, líneas negra y roja), la señal con mayor intensidad es la localizada en 3409 cm⁻¹, la cual corresponde a grupos OH provenientes del agua. De igual forma, la señal en 2948 cm⁻¹ correspondería a los grupos OH, aunque en este caso se asignan a los ácidos carboxílicos presentes en moléculas de polifenoles, como, por ejemplo, el ácido genticónico o el ácido clorogénico. Además de esta asignación, la señal en alrededor de 2900 cm⁻¹ generalmente se superpone con las vibraciones del enlace C-H (Pavia et al., 2009), por lo que Wongsa et al. (2022) mencionan que en esa misma región se presentan las vibraciones de estiramiento -CH, -CH₂ y -CH₃.

En cuanto a la señal en 1610 cm⁻¹, se puede atribuir tanto a la vibración de los enlaces C=C presentes en moléculas fenólicas como el ácido ferúlico o el ácido cafeico, además de las señales del estiramiento del OH. El pico de intensidad media centrado en 1403 cm⁻¹ también corresponde al grupo OH, aunque podría estar referido a la flexión del OH de un ácido carboxílico, o a la deformación del OH en los fenoles presentes, que son parte de la estructura molecular tanto de los polifenoles como de los flavonoides; por otro lado, en el intervalo de 1420 a 1300

cm^{-1} se presenta el estiramiento asimétrico del $\text{O}=\text{C}-\text{O}$, que puede corresponder al grupo carboxilo presente en gran parte de los compuestos fenólicos del lirio acuático, como los ya mencionados (ácidos gentísico, clorogénico, ferúlico y cafeico), entre otros (ácidos vainílico, siríngico, gálico, etc) (Bakrim et al., 2022; Mistry, 2009).

Las señales en 1272 y 1078 cm^{-1} , son atribuidas a señales de éter presentes en moléculas de polifenoles (por ejemplo, ácido vanílico) y flavonoides (como el crisoeriol) (Mistry, 2009; Pavia et al., 2009). Además, para el caso de la señal en 1272 cm^{-1} , se ha reportado que podría corresponder al estiramiento $\text{C}-\text{O}$ proveniente del pirano, el cual es un anillo de carbono presente en todas las moléculas de los flavonoides (Wongsa et al., 2022). Finalmente, la señal en 619 cm^{-1} corresponde a varias flexiones aromáticas fuera del plano $\text{C}-\text{H}$ (Wongsa et al., 2022).

Los espectros del extracto liofilizado y calcinado a 250 y $500 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 10, líneas azul y rosa), muestran el desplazamiento de la mayoría de las señales antes mencionadas. Las bandas que presentaron un corrimiento hacia el rojo fueron las de 2948 y 1078 cm^{-1} , que se desplazaron a 2923 y 1054 cm^{-1} . Este desplazamiento hacia números de onda menores indicaría que los enlaces OH de los ácidos carboxílicos y $\text{C}-\text{O}$ del éter se debilitaron, debido a que los enlaces débiles requieren menos energía, por lo que vibran a frecuencias más bajas (Pavia et al., 2009). Por otro lado, la señal en 1638 cm^{-1} estaría relacionada con el estiramiento del OH , mientras que las señales 1457 y 1416 cm^{-1} estarían relacionadas con un desplazamiento de la señal 1403 cm^{-1} del espectro de lirio sin calcinar y a $160 \text{ }^{\circ}\text{C}$; además de la descomposición de dicha señal en otras dos señales que vibran a diferentes frecuencias, como resultado directo de la calcinación del extracto. Por lo que, de estas dos nuevas señales, a 1457 cm^{-1} correspondería a la flexión del $\text{C}-\text{O}-\text{H}$ y a los $\text{C}-\text{H}$ de alcanos, mientras que la señal en 1416 cm^{-1} estaría relacionada con enlaces $\text{R}-\text{CH}=\text{CH}_2$ de alquenos (Mistry, 2009; Pavia et al., 2009). Además, en el espectro del extracto liofilizado y calcinado a $500 \text{ }^{\circ}\text{C}$, se observa la presencia de una señal de baja intensidad a 873 cm^{-1} , también relacionada con la flexión del $\text{C}-\text{H}$.

Finalmente, de acuerdo con la Figura 10, después de la calcinación a $250 \text{ }^{\circ}\text{C}$, la ausencia de la señal de 1272 cm^{-1} , relacionada con el grupo pirano, característico de la familia de los flavonoides, es notable. Este comportamiento es atribuido a que estas moléculas presentan reacciones de oxidación en los grupos hidroxilos unidos a los anillos de benceno, los cuales tienden a oxidarse a grupos aldehídos, sobre todo cuando la descomposición térmica es realizada sin atmósfera al vacío (ElGamal et al., 2023; Yang et al., 2021). De aquí, se infiere que, después de la calcinación del extracto liofilizado, las moléculas pertenecientes a la familia de los flavonoides son removidas, quedando principalmente los grupos funcionales provenientes de los polifenoles, los cuales se descomponen en cadenas más cortas, debido a que estos

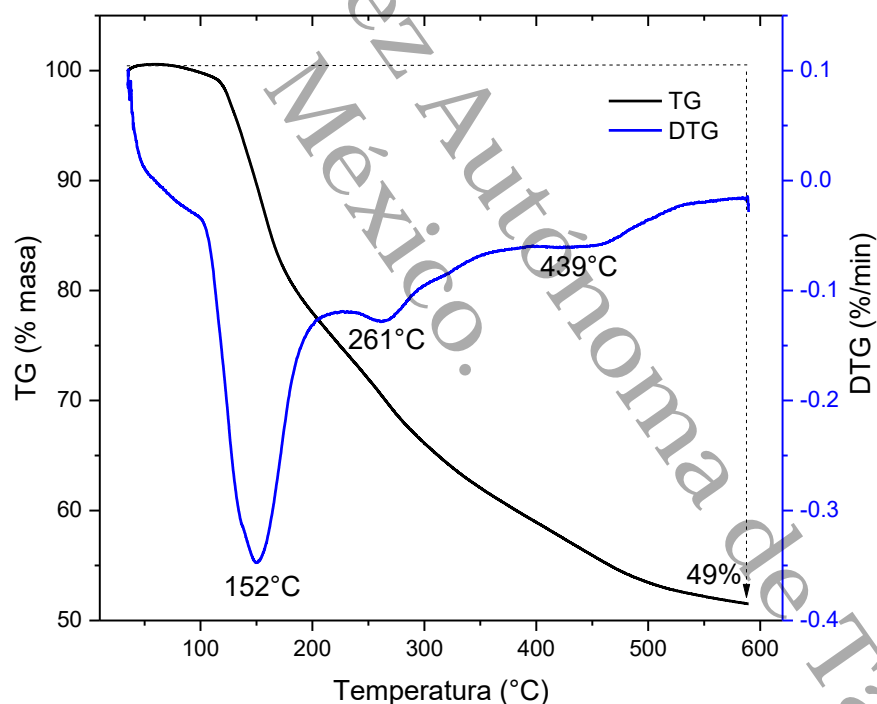
fitocompuestos tienen mayor presencia de grupos oxigenados. Por lo que, además, debido a que el extracto presenta un mayor contenido de polifenoles, los fragmentos de estos compuestos son los que están principalmente presentes después del tratamiento térmico.

4.1.3. Análisis termogravimétrico (TGA)

Se realizó el análisis termogravimétrico del extracto de lirio liofilizado, así como el cálculo de la primera derivada de éste (Figura 11). El análisis se realizó en el rango de temperaturas de 30 a 600 °C observando una pérdida de masa del 49%. De la curva de TGA, no se permiten distinguir las temperaturas exactas en las que ocurren las pérdidas, ante ello, la curva de la primera derivada de TGA (DTG) muestra las tres temperaturas en las que ocurren estas pérdidas de masa, las cuales fueron 152, 261 y 439 °C.

Figura 11

Curva termogravimétrica (TGA) y su derivada (DTG) del extracto de lirio liofilizado



Se ha reportado la descomposición térmica de la biomasa del lirio acuático (Bronzato et al., 2017; Huang et al., 2020); encontrando que las etapas de descomposición ocurren de 25 °C hasta 1000 °C, siendo atribuibles a las pérdidas de agua, hemicelulosa, celulosa y lignina. Sin embargo, la forma de obtención del extracto en este trabajo corresponde a una extracción tradicional, en el que se empleó como solvente agua desionizada, por lo que los compuestos

presentes en el extracto acuoso de lirio no son los mismos que se reportan en trabajos donde analizan la biomasa del lirio.

Está documentado que la obtención de extractos de plantas cerca o por debajo del punto de ebullición del agua, ayudan a extraer fitocompuestos como los polifenoles y los flavonoides (Antony & Farid, 2022). Además, Volf et al. (2014) determinaron el comportamiento de algunos de los polifenoles presentes en las plantas, mediante la estabilidad térmica de tres de polifenoles (catequina, ácido gálico y ácido vanílico), tanto de soluciones estándar como de soluciones extraídas de plantas (corteza de madera de abeto y semillas de uva), empleando tres temperaturas (60, 80 y 100°C); como resultados, encontraron que tanto el ácido gálico como el ácido vanílico tienen mayor estabilidad térmica a 60 y 80°C, y además, los polifenoles extraídos de fuentes naturales presentan menor degradación en comparación con las soluciones estándar de polifenoles. Por otro lado, Alberti et al. (2016) se centraron en la descomposición térmica sólo del ácido gálico; encontrando que dicha descomposición sucede en tres pasos, de los cuales, la mayor pérdida de masa ocurre entre 210 y 264°C, lo cual es comparable con la temperatura de 261 °C presentada en la Figura 11.

Por otro lado, existen estudios previos en donde evalúan el comportamiento térmico de algunos flavonoides, como la quercetina y la rutina. E. Costa et al. (2002) presentan la caracterización térmica de estos flavonoides, encontrando que en ambas se presenta cuatro etapas de pérdida de masa, dentro del rango de 25 a 900 °C, bajo una atmósfera de nitrógeno: la primera, de 26 a 139 °C, la segunda etapa de 136 a 366 °C, la tercera etapa hasta los 500 °C y la última etapa, de 500 hasta los 900°C. En ambos tipos de flavonoides, la tercera etapa es la que presenta mayor pérdida de masa. En el rango analizado, la rutina tuvo una pérdida de masa del 49.6%, equiparable con la pérdida de masa observado en la Figura 11, que corresponde al 49%.

Para la rutina, se ha reportado que la mayor pérdida de masa tiene lugar alrededor de 283.92°C (Remanan & Zhu, 2024). Además, en un estudio presentado por Latos-Brozio et al. (2023), realizaron la polimerización de tres especies de flavonoides (quercetina, rutina y catequina), a los cuales posteriormente evaluaron sus propiedades térmicas. En dicho trabajo determinaron que, en el caso de la rutina, su termograma evidenciaba pérdidas del 7.5% a 170°C, 20% a 270°C y 45% a 432°C, lo cual es comparable con las temperaturas determinadas en la Figura 11 (152, 261 y 439°C). Aunque mediante esta técnica no es posible determinar con exactitud cuáles compuestos se encuentran presentes en el extracto de lirio, estas temperaturas permiten evidenciar que los compuestos extraídos pertenecen principalmente a la familia de

polifenoles y flavonoides, lo cual coincide con las observaciones realizadas por espectroscopía FTIR y el contenido de flavonoides y polifenoles determinados para el liofilizado del extracto.

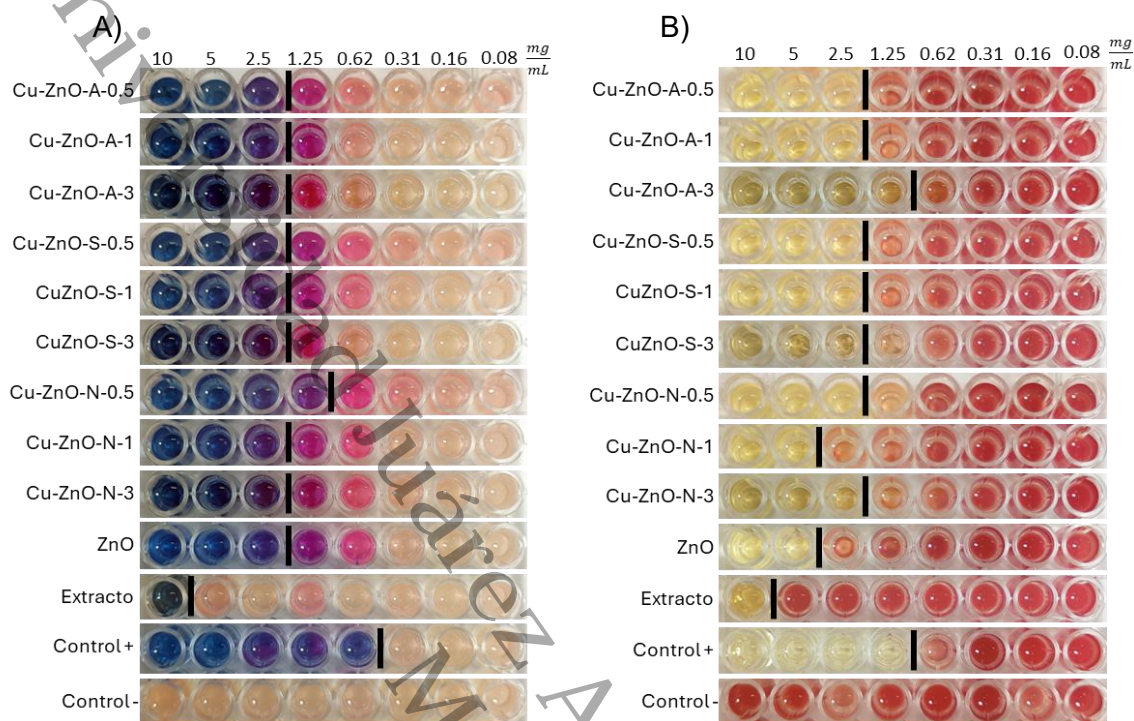
4.2. Actividad antimicrobiana (MIC y MBC)

La actividad antibacteriana de los nanomateriales de Cu-ZnO, así como las nanopartículas de ZnO, fue realizada mediante la técnica de microdilución en caldo, con el fin de determinar las MIC, así como las MBC. La evaluación de la actividad antimicrobiana se realizó frente a dos cepas: *S. aureus* y *E. coli*. Por otro lado, para determinar las MIC, se emplearon dos reveladores de viabilidad, resazurina y 2,3,5-trifeniltetrazolo (TTC). Para la determinación de las MBC, se realizaron las réplicas de las placas de 96 pocillos en plagas de TSA. Con los valores de MIC y MBC obtenidos, se calculó el cociente MBC/MIC, con el fin de determinar el modo de acción de los materiales, es decir, si son bactericidas ($MBC/MIC \leq 4$) o bacteriostáticos ($MBC/MIC > 4$).

En la Figura 12 se muestran las placas reveladas con los diferentes colorantes para evidenciar las MIC de los nanomateriales de ZnO y Cu-ZnO frente a *S. aureus*. Los valores de MIC variaron ligeramente, dependiendo del revelador de viabilidad empleado. En los ensayos revelados con resazurina, la mayoría de los nanomateriales muestran valores de 2.5 mg/mL. En cambio, con TTC los valores de MIC fueron desde 1.25 hasta 5 mg/mL, siendo la MIC de 2.5 mg/mL la más predominante, encontrando una mejor efectividad en la actividad antibacteriana de Cu-ZnO en comparación con solo ZnO. Además, el extracto acuoso de lirio tiene valores de MIC altos, de 10 mg/mL, tanto para el revelado con resazurina como con TTC, por lo que indica una actividad antibacteriana limitada frente a *S. aureus*.

Figura 12

Ensayo de microdilución de los nanomateriales Cu-ZnO y ZnO contra *S. aureus*

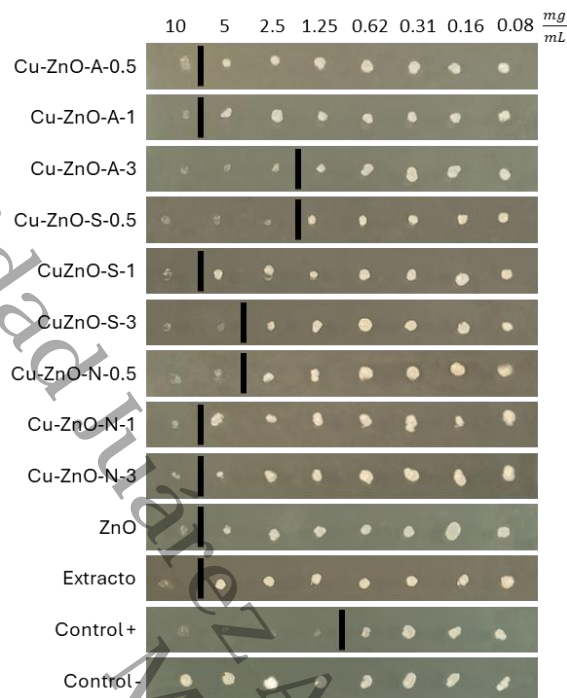


Nota. Ensayos revelados con A) resazurina y B) TTC. Las líneas negras indican la MIC.

Con respecto a las MBC, en la Figura 13 se muestra la réplica correspondiente contra la bacteria *S. aureus*. Las MBC registradas se encuentran en un intervalo de 2.5 a 10 mg/mL, donde cinco de los nanomateriales de Cu-ZnO presentaron una MBC de 10 mg/mL. Con estos valores de MIC y MBC, se determinó el modo de acción, siendo que esta, tanto en los ensayos con resazurina como con TTC, muestran que todos los nanomateriales de ZnO y Cu-ZnO tienen un efecto bactericida contra el *S. aureus*.

Figura 13

Determinación de la MBC de los nanomateriales Cu-ZnO y ZnO contra *S. aureus*

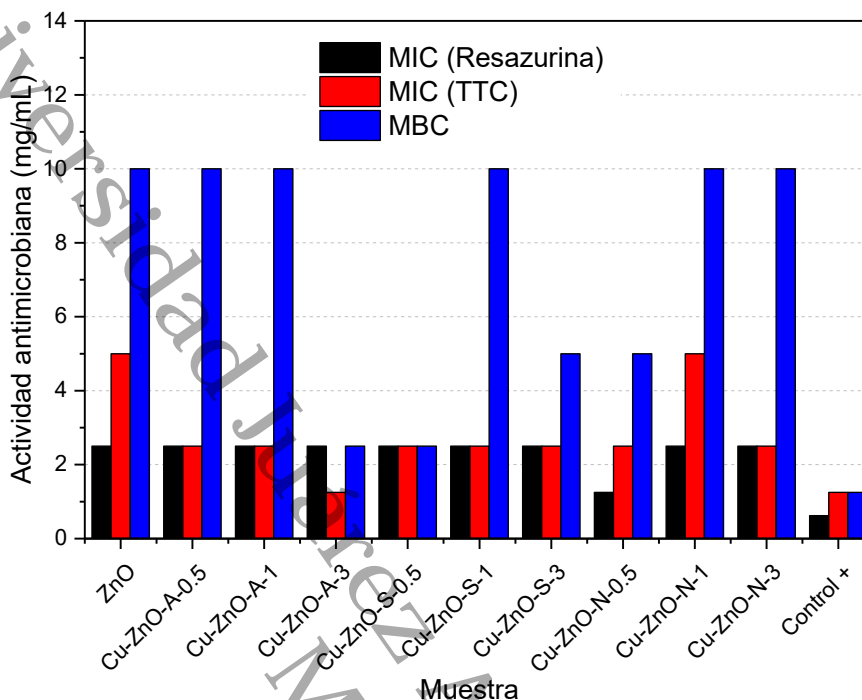


Nota. La MBC se confirmó mediante subcultivo en agar tras 24 h de incubación del ensayo de microdilución, antes de la adición del indicador de viabilidad en la placa.

En la Figura 14 se comparan los valores de MIC y MBC obtenidos para los nanomateriales de Cu-ZnO y ZnO contra *S. aureus*. En general, el Cu-ZnO-A-3 presentó la mayor actividad antibacteriana, con una MIC de 1.25 mg/L con TTC y con unos valores de MBC más bajos (2.5 mg/L). El Cu-ZnO-S-0.5 fue el segundo nanomaterial con mejor actividad contra esta bacteria Gram positiva, con una MIC y MBC de 2.5 mg/mL con ambos reveladores. En tercer lugar, destaca el material Cu-ZnO-N-0.5, debido a que el MIC con resazurina es de 1.25 mg/mL, pero la MIC con TTC tuvo una MIC más alta, de 2.5 mg/mL, y un MBC mayor a las muestras de Cu-ZnO-A-3 y Cu-ZnO-S-0.5 (es decir, de 5 mg/mL), con un modo de acción bactericida en todos los nanomateriales, con ambos reveladores.

Figura 14

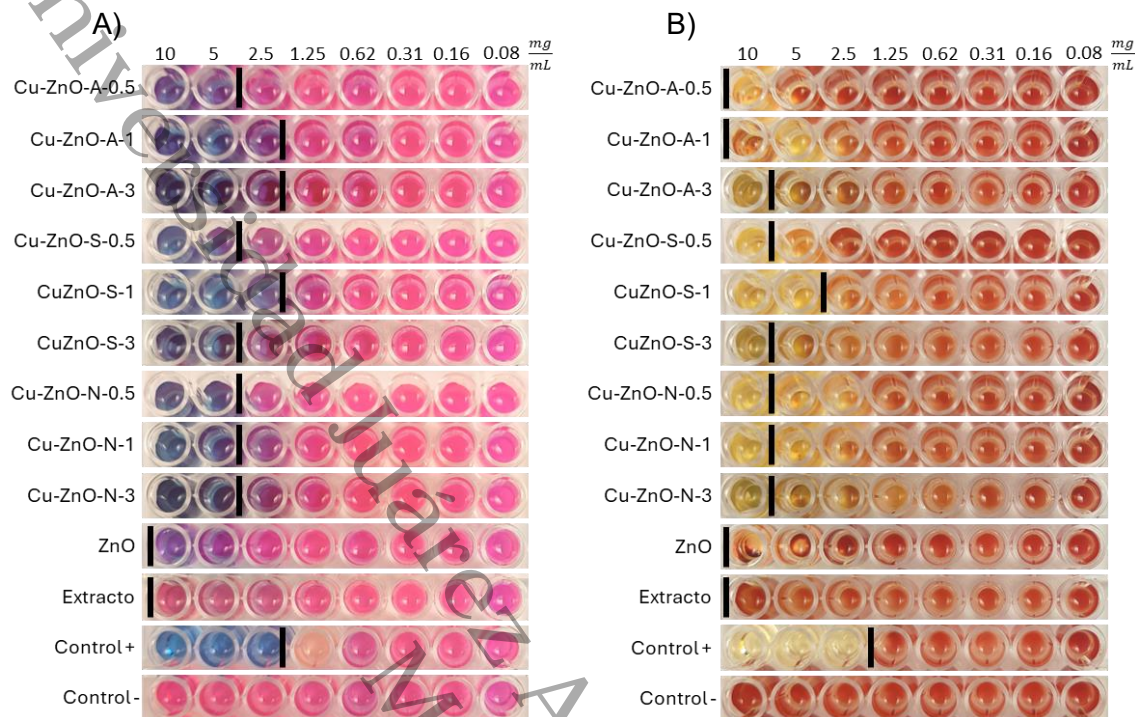
Valores de MIC y MBC de los nanomateriales Cu-ZnO y ZnO frente a *S. aureus*



En la Figura 15 se muestran los ensayos de microdilución realizados contra la bacteria *E. coli*. Las diferencias entre los valores de MIC obtenidos fueron más notorios dependiendo del revelador (resazurina o TTC) empleado. Con resazurina (Figura 15A), los nanomateriales de Cu-ZnO registraron valores en un intervalo de 2.5 a 5 mg/mL, mientras que con TTC (Figura 15B), los valores de MIC fueron más altos, entre 5 y 10 mg/mL. Además, ninguna muestra coincidió en su valor de MIC entre ambos reveladores; a pesar de esto, en seis de los nanomateriales de Cu-ZnO, las MIC obtenidas con TTC fueron a una concentración superior a las determinadas con resazurina. Esto indicaría que, si bien la sensibilidad de cada revelador es diferente, no obstante, la tendencia general de inhibición se mantuvo con ambos reveladores. A pesar de las diferencias de las MIC registradas por dos tipos de colorantes, los nanomateriales Cu-ZnO mostraron una mayor actividad antibacteriana que el ZnO sin modificar. Por otra parte, al igual que el ZnO, el extracto de lirio acuoso no mostró actividad inhibitoria contra *E. coli*, a la concentración máxima evaluada, es decir, a 10 mg/mL.

Figura 15

Ensayo de microdilución de los nanomateriales Cu-ZnO y ZnO contra *E. coli*

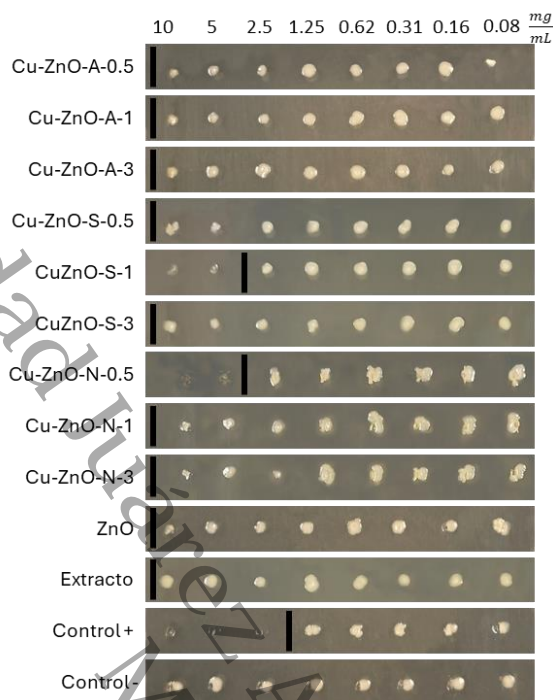


Nota. Ensayos revelados con A) resazurina y B) TTC. Las líneas negras indican la MIC.

Los ensayos de MBC contra *E. coli* se muestran en la Figura 16. Los resultados revelaron que la mayoría de los materiales analizados no presentaron MBC dentro del rango de concentraciones evaluadas, es decir, que a 10 mg/mL se observó crecimiento bacteriano, con excepción de las muestras Cu-ZnO-S-1 y Cu-ZnO-N-0.5 que presentaron un MBC a 5 mg/mL. Por lo tanto, debido a que para determinar el modo de acción de las muestras evaluadas se requieren de los valores de MIC y MBC, solo se confirmó el comportamiento bactericida de los nanomateriales Cu-ZnO-S-1 y Cu-ZnO-N-0.5, y el resto de los nanomateriales con actividad bacteriostática.

Figura 16

Determinación de la MBC de los nanomateriales Cu-ZnO y ZnO, contra *E. coli*

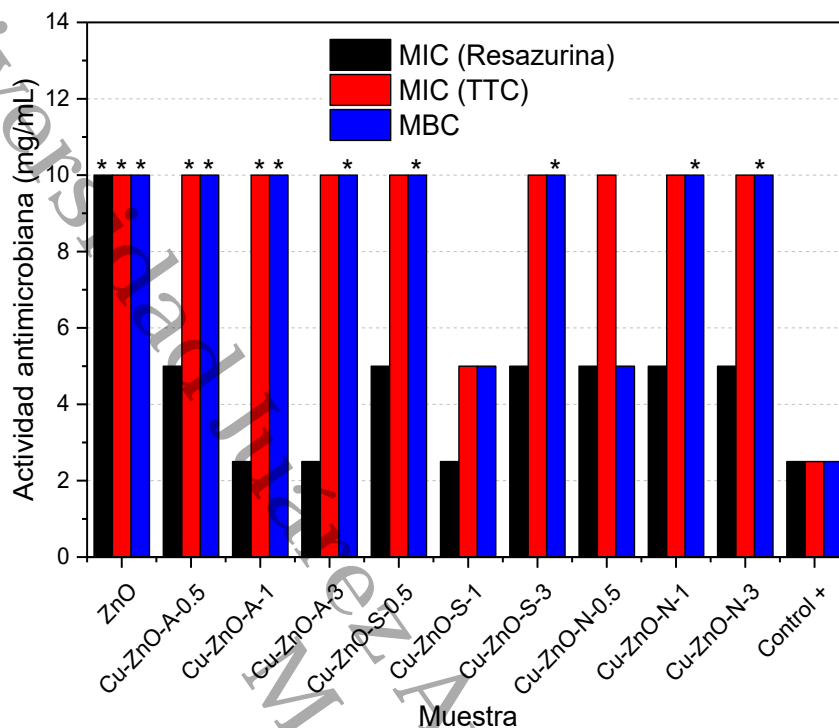


Nota. La MBC se confirmó mediante subcultivo en agar tras 24 h de incubación del ensayo de microdilución, antes de la adición del indicador de viabilidad en la placa.

La representación gráfica de los valores de MIC y MBC se visualizan en la Figura 17. Los resultados de MIC obtenidos con resazurina reflejan de forma más precisa el comportamiento de los materiales, dado que las MIC obtenidas se encuentran dentro del rango de concentraciones analizadas. De los nanomateriales de Cu-ZnO, la muestra que presentó mejores resultados es el Cu-ZnO-S-1, dado que registró las menores MIC tanto con resazurina como con TTC (con 2.5 y 5 mg/mL, respectivamente), además con la MBC más baja (5 mg/mL). Después destaca el Cu-ZnO-N-0.5 con un bajo MIC con resazurina y un bajo MBC (ambas a 5 mg/mL), aunque la MIC con TTC fue ligeramente más elevado (10 mg/mL). Finalmente, de los nanomateriales sintetizados con el acetato de cobre, el Cu-ZnO-A-3 fue el nanomaterial con mejor respuesta frente a *E. coli*, debido a que presentó una MIC baja con resazurina, aunque sus valores de MIC con TTC y MBC fueron más altos en comparación con los dos nanomateriales antes mencionados.

Figura 17

Valores de MIC y MBC de los nanomateriales Cu-ZnO y ZnO frente a *E. coli*



Nota. El asterisco (*) corresponde a las muestras cuyas MIC o MBC se encuentra por encima de la concentración máxima evaluada.

En los ensayos antibacterianos realizados con *S. aureus* y *E. coli*, se observaron diferencias notables entre los resultados obtenidos para los nanomateriales de ZnO y Cu-ZnO frente a cada bacteria. En términos generales, los nanomateriales Cu-ZnO-A-3, Cu-ZnO-S-0.5 y Cu-ZnO-N-0.5 mostraron una actividad destacable contra *S. aureus*, mientras que, para *E. coli*, fueron los nanomateriales más efectivos Cu-ZnO-A-3, Cu-ZnO-S-1 y Cu-ZnO-N-0.5. Sin embargo, las concentraciones efectivas frente a ambas cepas fueron diferentes.

A diferencia de los resultados obtenidos en *S. aureus*, para *E. coli* no se determinó el modo de acción en la mayoría de los nanomateriales, debido a que no se alcanzó una MBC a las concentraciones evaluadas. Además, las MIC fueron mayores en comparación con las obtenidas para *S. aureus*. Estos resultados sugieren que la acción de la mayoría de los nanomateriales sobre *E. coli* podrían ser predominantemente bacteriostática a las concentraciones ensayadas (a excepción de Cu-ZnO-S-1 y Cu-ZnO-N-0.5, que son bactericidas), requiriendo concentraciones más elevadas para inducir un efecto bactericida; contrario a los observado contra *S. aureus*, donde todos los nanomateriales de Cu-ZnO presentaron un efecto bactericida.

Estas diferencias pueden atribuirse a la forma en la que los nanomateriales interactúan con la superficie bacteriana, y en particular, a las diferencias estructurales entre las paredes celulares Gram positivas y Gram negativas. Las bacterias Gram positivas, como *S. aureus*, poseen una gruesa capa de peptidoglicano y ácidos teicoicos cargados negativamente los cuales, de acuerdo con la literatura, facilitan la adsorción y penetración de las nanopartículas con carga positiva mediante interacciones electrostáticas, provocando daño directo a la membrana celular (Jayanetti et al., 2024; Sánchez-López et al., 2020). Por otra parte, las bacterias Gram negativas, como *E. coli*, presentan una membrana externa compuesta por lipopolisacáridos (LPS), lipoproteínas y fosfolípidos, que aumentan la carga superficial negativa, y, además, funciona como una barrera, limitando la entrada de nanopartículas (Jayanetti et al., 2024; Sánchez-López et al., 2020; Wang et al., 2017).

Estas diferencias estructurales influyen de manera directa en la respuesta de las bacterias frente los nanomateriales de ZnO y Cu-ZnO. Estudios previos han reportado que las nanopartículas de ZnO presentan un efecto antimicrobiano más pronunciado contra bacterias Gram positivas, particularmente *S. aureus*, en comparación con bacterias Gram negativas, como *E. coli*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*. Esta susceptibilidad se atribuye a la ausencia de una membrana externa en las bacterias Gram positivas, lo que permite un contacto más directo entre las nanopartículas y la pared celular (Jayanetti et al., 2024; Wang et al., 2017).

Asimismo, Jayanetti et al. (2024) señalan que el modo de acción de un agente antimicrobiano puede indicar el tipo de efecto que ejerce sobre los microorganismos: los agentes con acción bactericida actúan sobre la pared celular, provocando su ruptura, mientras que los de acción bacteriostática interfieren en la síntesis de proteínas o en procesos metabólicos. En este contexto, los resultados coinciden, ya que la acción antimicrobiana de los nanomateriales de Cu-ZnO es más efectiva contra *S. aureus* que contra *E. coli*, presentando, en general, modos de acción bactericida y bacteriostática, respectivamente.

Además de las diferencias biológicas antes mencionadas, en los resultados de los ensayos antibacterianos, se observa una clara diferencia en los resultados de MIC, dependiendo del revelador empleado (resazurina o TTC). Si bien ambos permiten determinar la concentración mínima inhibitoria de los nanomateriales mediante cambios de color, estas variaciones están directamente relacionadas con el mecanismo de detección de cada indicador.

En el caso de la resazurina, se trata de un colorante redox permeable a las membranas celulares, que en presencia de bacterias activas se reduce a resorufina, un compuesto rosa fluorescente. Esta, a su vez, puede reducirse a hidrorosorufina, de color amarillento, lo que indica la presencia de células muy activas (Chakansin et al., 2022; Rampersad, 2012). De acuerdo con

Rampersad (2012) la resazurina actúa como un indicador del deterioro del metabolismo celular, por lo que los resultados obtenidos con este indicador son altamente sensibles, permitiendo detectar crecimiento bacteriano incluso en condiciones de mínima actividad metabólica.

Esta característica explica que los valores de MIC con resazurina sean menores que los obtenidos con TTC, ya que la resazurina presenta un rango de detección más amplio, capaz de reflejar la transición entre la inhibición y el crecimiento bacteriano a través de cambios de color que van del azul al rosa y, en algunos casos, al amarillo, correspondientes a las especies resazurina, resorufina e hidroresorufina, respectivamente, las cuales representan diferentes niveles de la actividad metabólica bacteriana (Petiti et al., 2024). En el presente estudio, esta transición cromática fue dependiente de la cepa bacteriana evaluada, observándose en *S. aureus* la progresión de azul a rosa y amarillo, lo que sugiere una mayor actividad metabólica reductora, mientras que en *E. coli*, predominó el cambio de azul a rosa.

Por otro lado, el TTC (cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio), en presencia de bacterias metabólicamente activas, es reducido por enzimas oxidativas, principalmente deshidrogenasas y oxidasas, para formar un compuesto insoluble de color rojo denominado formazán, que es directamente proporcional al número de células viables presentes (Moussa et al., 2013). Por tanto, la presencia de formazán se da cuando el metabolismo de la bacteria es suficientemente activo, lo que puede conducir a valores de MIC aparentemente mayores a los determinados con resazurina. En ese sentido, Veiga et al. (2019) señalan que el TTC, a diferencia de otros indicadores, como la resazurina, genera un producto más estable y visible, cuyo color no varía significativamente con el tiempo; sin embargo, el formazán formado es insoluble en agua (Gabrielson et al., 2002; Moussa et al., 2013).

La capacidad de reducción del TTC puede variar entre microorganismos; Moussa et al. (2013) reportaron una mayor correlación entre la formación de formazán y el recuento de colonias en *S. aureus* (Gram positiva) que en *Salmonella typhimurium* (Gram negativa), atribuyéndolo a la mayor actividad reductora de las bacterias Gram positivas. Esto podría estar relacionado con diferencias en la capacidad reductora y en la respuesta metabólica de los microorganismos frente al TTC (Berridge et al., 2005), lo que explicaría la tendencia a obtener valores de MIC más altos con TTC en bacterias Gram negativas, como *E. coli*, en comparación con los obtenidos mediante resazurina.

Por lo tanto, considerando la información disponible en la literatura sobre los mecanismos de detección de ambos indicadores, los valores menores de MIC obtenidos con resazurina se deben a que los nanomateriales inhiben parcialmente el metabolismo bacteriano antes de afectar completamente la respiración celular. Además, esta diferencia es más evidente en *E. coli*, ya que,

al ser una bacteria Gram negativa, presenta una menor capacidad para reducir el TTC a formazán.

Es importante señalar que la mayoría de los trabajos previos donde evalúan la actividad antibacteriana de nanomateriales de ZnO dopados con Cu^{2+} , lo realizan mediante los métodos de difusión en disco o en pocillos de agar (Rahman et al., 2021; Rashid et al., 2024; Shahid et al., 2018). Estas técnicas, aunque son ampliamente utilizadas, presentan desventajas cuando se emplean para evaluar la actividad antimicrobiana de nanomateriales, debido a la difusión limitada de las nanopartículas a través del medio sólido de agar, lo que restringe el contacto físico directo entre el material y los microorganismos (Chung et al., 2023).

Por otro lado, la técnica de microdilución permite evaluar de forma más precisa la actividad antimicrobiana de los nanomateriales, ya que favorece un mayor contacto entre el agente antimicrobiano y las bacterias, además de determinar la MIC y la MBC, y con ello, el modo de acción de los nanomateriales (bactericida o bacteriostático).

Entre los trabajos reportados, Shahid et al. (2018) obtuvieron nanopartículas de ZnO y Cu-ZnO, mediante síntesis de coprecipitación, sin el empleo de extracto y usando como precursores el nitrato de zinc y cobre; la actividad antimicrobiana la evaluaron mediante los métodos de difusión en agar y microdilución, encontrando que, a la concentración de 1 M, los diámetros de inhibición del ZnO y el Cu-ZnO son de 26 y 28 mm para *E. coli*, y de 22 y 25 mm para *B. subtilis*, respectivamente; por otro lado, los nanomateriales de Cu-ZnO tienen valores menores de MIC (25 mg/mL para *E. coli* y 19 mg/mL para *B. subtilis*), en comparación con el ZnO (30 mg/mL para *E. coli* y 23 mg/mL para *B. subtilis*), los cuales son valores mayores a los obtenidos en el presente trabajo, tanto para la bacteria Gram positiva (*S. aureus*, Figura 14), como para la Gram negativa (*E. coli*, Figura 17).

En cuanto a la síntesis asistida por extracto de plantas, Rashid et al. (2024) obtuvieron nanopartículas de ZnO sin dopar, y dopadas con Ag y Cu, mediante la adición de extracto de *Aloe vera*; para el caso de Cu-ZnO, emplearon como precursores el nitrato de zinc y cobre. Mediante la técnica de difusión en disco, evaluaron los nanomateriales a las concentraciones de 75 y 100 $\mu\text{g/mL}$ frente a cepas de *S. aureus* y *E. coli*. Para *S. aureus*, a la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$, observaron mayores diámetros de inhibición para ZnO (10.5 mm) que los nanomateriales de Cu-ZnO (10 mm). En cambio, se observó un efecto contrario para *E. coli*, ya que Cu-ZnO tuvieron un diámetro de inhibición mayor (de 12.5 mm) que el ZnO (de 12 mm), inclusive mayor que la bacteria Gram positiva.

Por otro lado Rahman et al. (2021) también emplearon el método de difusión para evaluar la actividad antimicrobiana del ZnO y Cu-ZnO obtenidos con el extracto de *Ziziphus mauritiana*.

Variaron el porcentaje de Cu añadido, al 1 y 5%, y empleando nitrato de zinc y cobre como precursores. Realizaron los ensayos microbiológicos empleando cepas de *S. aureus* y *E. coli*, a las concentraciones de 25, 50, 100, 200 y 400 mg/mL. A la menor concentración evaluada (25 mg/mL), sus resultados evidencian una mayor inhibición de la muestra de Cu-ZnO al 1% (con un diámetro de inhibición de 7 mm), mientras que el Cu-ZnO al 5%, presentó inhibición similar que el ZnO sin dopar (diámetro de inhibición de 6 mm).

Si bien los trabajos reportados en la literatura emplean principalmente el método de difusión en disco para evaluar la actividad antimicrobiana de los nanomateriales de Cu-ZnO, los resultados disponibles permiten establecer una comparación en términos de concentraciones efectivas y microorganismos evaluados, lo que facilita contextualizar el desempeño antimicrobiano de los materiales obtenidos en este trabajo frente a nanomateriales previamente reportados.

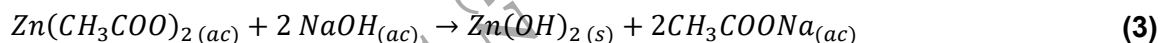
De lo anterior, se observa que los nanomateriales de Cu-ZnO sintetizados en este trabajo, empleando distintos precursores de cobre (acetato, sulfato y nitrato de cobre) y el extracto acuoso de lirio acuático como agente bioasistente, presentan actividad antibacteriana a concentraciones inferiores a las reportadas en la mayoría de los trabajos previos. Este comportamiento puede atribuirse a la funcionalización del ZnO promovida por los compuestos fitoquímicos presentes en el extracto, lo que se traduce en una mayor bioactividad.

4.3. Técnicas de caracterización

4.3.1. Análisis termogravimétrico (TGA)

En las Figura 18 y 19, se presentan los termogramas de ZnO y Cu-ZnO, en los cuales se pueden identificar los eventos térmicos relacionados con la descomposición de cada nanomaterial en función de la temperatura. Dichos termogramas proporcionan información sobre la presencia de los componentes que se degradan en distintas etapas.

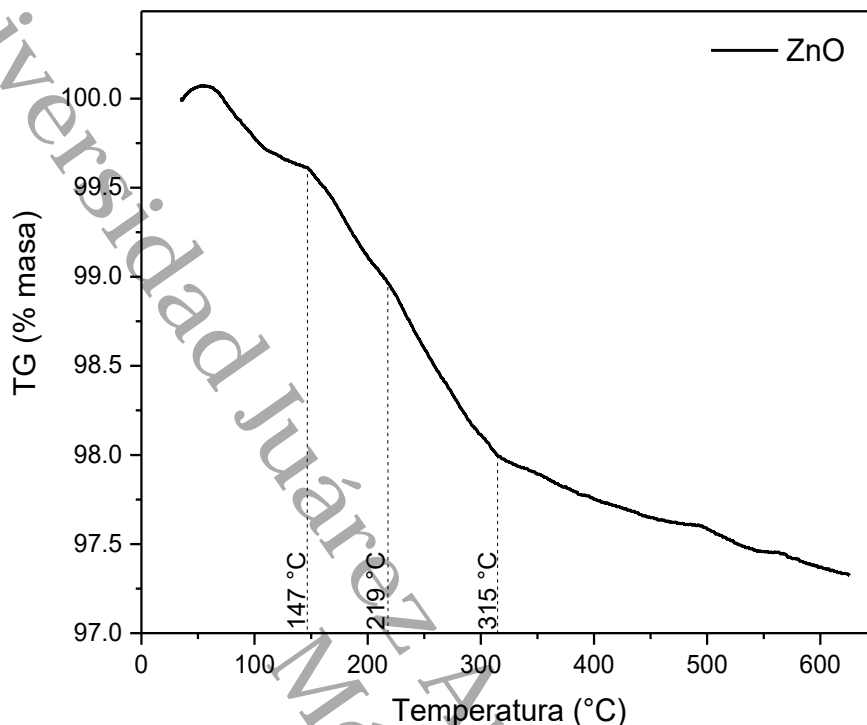
En el caso de las nanopartículas de ZnO (Figura 18), presenta cuatro etapas de descomposición térmica (de 35 a 147 °C, 147 a 219°C, 219 a 315 °C y 315 a 600°C), las cuales corresponden a pérdidas de masa mínimas en cada una de ellas, con una pérdida de masa total del 2.63%. La primera etapa corresponde a la pérdida de moléculas de agua adsorbidas en la superficie del material. En el caso de la síntesis por precipitación del acetato de zinc e hidróxido de sodio, está reportado la formación del hidróxido de zinc como intermediario en la reacción, el cual, mediante un tratamiento térmico, forma el ZnO (Ibrahim et al., 2017):



Por lo que, la pérdida de masa ocurridas en las etapas dos y tres, es decir, por debajo de los 300 °C aproximadamente, se deben a la descomposición del hidróxido de zinc (Moharram et al., 2014), además de que, por encima de esa temperatura, corresponde al reacomodo y cristalización del ZnO (Dejene et al., 2011). Asimismo, es importante considerar que en el mismo rango de temperatura analizado (de 35 a 600 °C), podría estar ocurriendo simultáneamente la degradación térmica de compuestos provenientes del extracto de lirio, tal como se observó en la Figura 11. En dicho análisis, se identificaron tres eventos térmicos del extracto a las temperaturas de 152, 261 y 439 °C, los cuales se superponen parcialmente con las temperaturas registradas por el ZnO.

Figura 18

Curva termogravimétrica del ZnO sintetizado empleando acetato de zinc



Las muestras obtenidas empleando como precursor el acetato de cobre (Figura 19A) presentan comportamientos térmicos similares, con tres etapas de descomposición. Aunque los rangos de temperatura de cada etapa varían dependiendo de la muestra analizada, los tres nanomateriales de Cu-ZnO-A presentan en común las dos primeras etapas: la primera etapa entre 35 y 150 °C, relacionada con el proceso de deshidratación, y la segunda etapa entre 150 a 175 °C, en la cual se presenta la mayor pérdida de masa de las tres muestras de Cu-ZnO-A. Además, el nanomaterial Cu-ZnO-A-1 presenta una ligera pérdida que puede asociarse a la descomposición de residuos orgánicos entre 160 y 259 °C, mientras que, Cu-ZnO-A-3 tiene un escalón más pronunciado de pérdida de masa entre 175 y 368 °C, siendo este nanomaterial la que presenta el mayor porcentaje de pérdida de masa de todas las muestras de Cu-ZnO.

Lin et al. (2012) analizaron la descomposición térmica del acetato de cobre, bajo una atmósfera de aire, en un rango de 30 a 500 °C, a 10 °C/min; encontrando que se descompone en tres etapas: la primera, de 30 a 168 °C donde, además de presentarse la deshidratación de la muestra, mencionan que una pequeña cantidad del acetato de cobre se oxida a peróxido, el cual, al ser inestable, comienza a descomponerse por debajo de 168 °C, con una pérdida de masa adicional; la segunda etapa de 168 a 302 °C, consiste en la descomposición del acetato

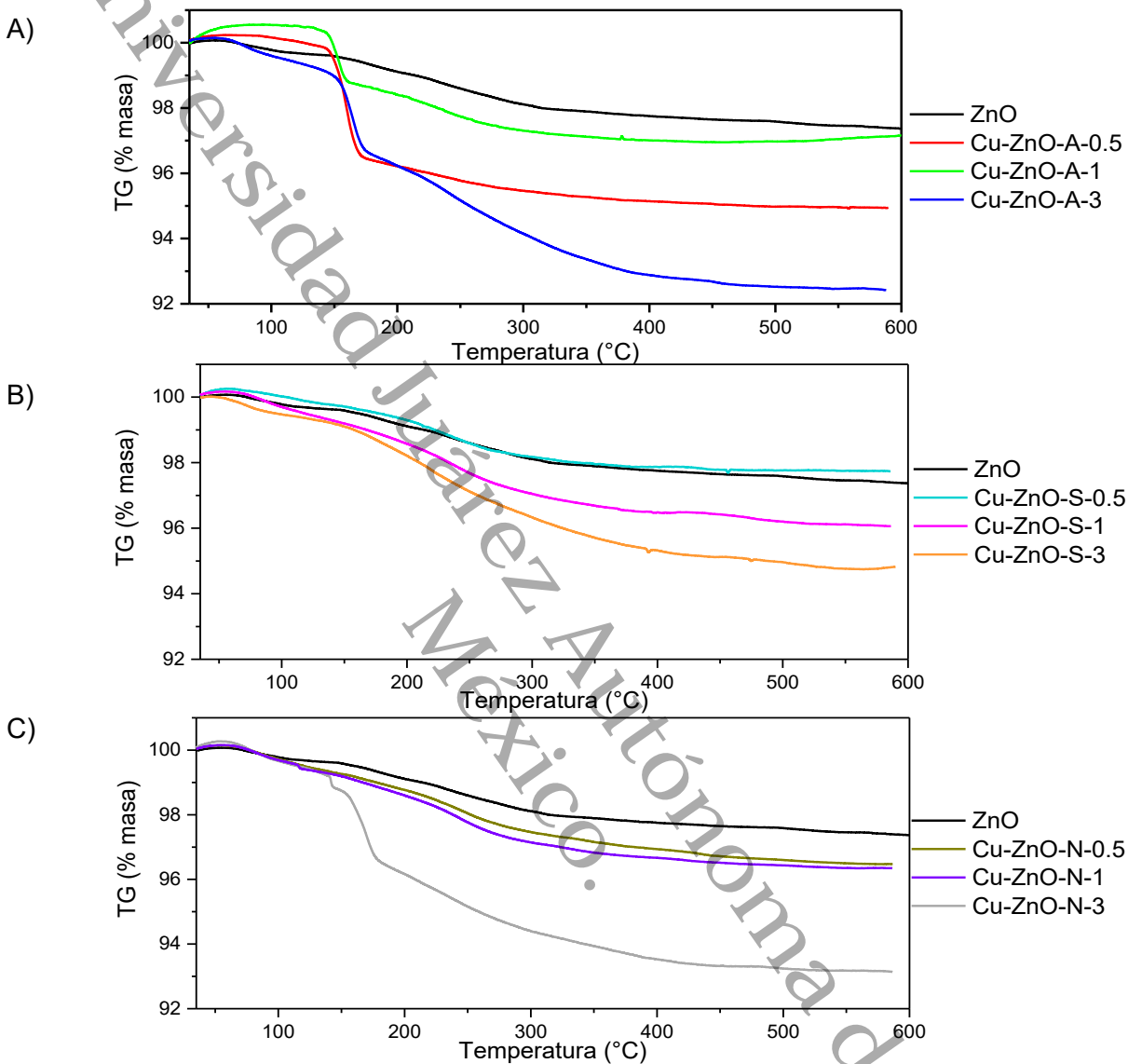
de cobre a pequeños productos volátiles, así como el inicio de la formación de Cu y Cu₂O; mientras que en la tercera etapa, de 302 a 500 °C, los productos sólidos de Cu y Cu₂O se oxidan a CuO en el aire. Por otro lado, Youssef et al. (2019) presentan la descomposición del acetato de cobre bajo una atmósfera de argón, identificando los siguientes eventos: de 80 a 140 °C, la deshidratación del acetato de cobre; en 190 °C, la descomposición total del acetato de cobre; de 200 a 275 °C, la presencia de Cu₂O y CuO, y, finalmente en 370 °C, los óxidos se reducen a Cu. Por lo que, con base en lo reportado en la literatura, la mayor pérdida de masa del acetato de cobre se presenta entre 168 y 302 °C (bajo flujo de aire) (Lin et al., 2012) y 200 y 275 °C (bajo flujo argón) (Youssef et al., 2019), asociado a la descomposición del propio acetato de cobre en otros compuestos, mientras que, en el presente trabajo, se observó un evento térmico similar, aunque desplazado hacia un intervalo de temperatura menor (entre 150 y 175 °C), lo cual podría atribuirse a las condiciones de la síntesis, así como la presencia e interacción de otros compuestos con el precursor de cobre.

En cuanto a los nanomateriales obtenidos con el sulfato de cobre (Figura 19B), las tres muestras presentaron un comportamiento térmico similar, siendo el Cu-ZnO-S-0.5 el nanomaterial que tiene un comportamiento más parecido al del ZnO. Una primera etapa de descomposición de las tres muestras es la que abarca las temperaturas de entre 35 y 118 °C, dentro de la cual los tres nanomateriales presentan comportamientos térmicos ligeramente diferentes. Entre 118 y 260 °C ocurre la mayor pérdida de masa de los materiales Cu-ZnO-S, y, por encima de esta temperatura, la pérdida de masa continúa de forma gradual, sin escalones definidos.

Para este precursor, Widjaja et al. (2010) analizaron la descomposición térmica del CuSO₄*5H₂O en el intervalo de 22 a 500°C; empleando una atmósfera de nitrógeno. Reportaron tres etapas de pérdidas de moléculas de agua, a 67, 92 y 221 °C correspondientes a la liberación de dos, dos y una moléculas de agua, respectivamente. Además, dentro del rango de temperaturas analizado (hasta 500 °C), no encontraron ninguna otra etapa de descomposición. Por su parte, Mu & Perimutter (1981) estudiaron el comportamiento térmico de este mismo precursor, hasta los 900 °C, bajo atmósfera inerte de nitrógeno; encontraron que la descomposición del CuSO₄*5H₂O ocurre entre 572 a 678 °C, mientras que la formación de CuO se inicia entre 660 y 704 °C. Las altas temperaturas a las que el sulfato de cobre se descompone, explicaría el comportamiento térmico de los nanomateriales de Cu-ZnO-S, ya que en ellos no se observan escalones de pérdidas de masa pronunciados.

Figura 19

Curvas termogravimétricas de las muestras de ZnO y Cu-ZnO



Nota. Termogramas del ZnO y de Cu-ZnO sintetizado empleando como precursores: A) acetato de cobre, B) sulfato de cobre y C) nitrato de cobre.

Las muestras sintetizadas empleando nitrato de cobre como precursor (Figura 19C), los nanomateriales al 0.5 y 1% tienen un comportamiento similar: un ligero descenso de la pérdida de masa entre los 35 y 120 °C, y una segunda etapa entre 120 y 280 °C, y una última etapa entre 280 y 600 °C, en donde la descomposición se dio con una ligera pendiente. Para la muestra Cu-ZnO-N-3, la primera etapa comprende de 35 a 140 °C, seguido por dos escalones pronunciados,

el primero, entre 140 y 143 °C, y el segundo entre 143 y 175 °C; a medida que la temperatura aumenta, la pérdida de masa ocurre de forma progresiva y constante, con una tendencia descendente uniforme hasta los 280 °C, donde el proceso continúa, aunque con una pendiente menos pronunciada, es decir, hay una disminución más lenta de la masa.

Morozov et al. (2003) analizaron la descomposición térmica del $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, identificando las siguientes etapas principales: entre 40 y 80 °C ocurre la pérdida de las moléculas de agua; de 80 a 100 °C se observa la formación del $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ anhidro, el cual se sublima entre 120 y 150 °C; posteriormente, entre 150 y 200 °C, tiene lugar la termólisis, con la presencia de HNO_3 , NO_2 y $\text{Cu}_2(\text{OH})_3$; finalmente, entre 200 y 250 °C, se forma del CuO . Un comportamiento térmico similar fue reportado por Ashok et al. (2015), aunque en un rango más amplio (de 25 a 800 °C) y bajo una atmósfera inerte de nitrógeno, encontrando que la mayor pérdida de masa del nitrato de cobre, de hasta el 55%, ocurre entre 151 a 214 °C; intervalo análogo al de 150 y 200 °C reportado por Morozov et al. (2003). Esta pérdida de masa significativa del $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ explicaría el comportamiento del nanomaterial con mayor contenido de cobre del presente trabajo (Cu-ZnO-N-3), el cual presenta dos escalones pronunciados entre 140 a 175 °C.

La Figura 20 presenta los porcentajes de pérdidas de masa totales de todos los nanomateriales de Cu-ZnO, en función del contenido de cobre añadido durante la síntesis. En el caso de los nanomateriales de Cu-ZnO sintetizados con acetato de cobre se observa un comportamiento no lineal, es decir, presenta un mínimo de la pérdida de masa a la concentración intermedia (Cu-ZnO-A-1), y posteriormente aumenta conforme se incrementa el contenido de cobre, alcanzando su valor máximo en la muestra Cu-ZnO-A-3. Esta última muestra, al 3 %m de Cu^{2+} , registra la mayor pérdida de masa de todos los nanomateriales de Cu-ZnO, lo que refleja su menor estabilidad térmica, atribuido posiblemente a la presencia de una mayor proporción de compuestos volátiles en comparación con el resto de los materiales. Dicho comportamiento puede atribuirse tanto a una mayor cantidad de fitocompuestos retenidos en la superficie de las nanopartículas, como a la mayor cantidad del acetato de cobre, cuyo proceso de descomposición empieza alrededor de los 168 °C y cuya formación del CuO ocurre por encima de los 300 °C.

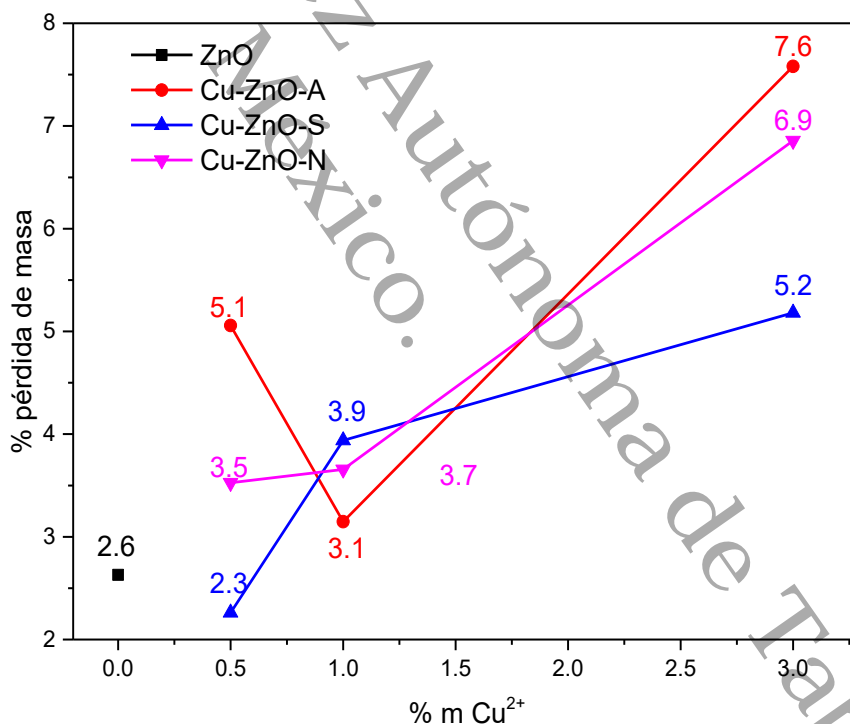
En contraste, los nanomateriales de Cu-ZnO sintetizados a partir de sulfato y nitrato de cobre presentan una tendencia distinta, caracterizada por el aumento progresivo de la pérdida de masa a medida que se incrementa el contenido del cobre. Esta tendencia es más marcada en los nanomateriales de Cu-ZnO obtenidos con el sulfato de cobre, que presentan los valores más bajos de pérdida de masa a las concentraciones extremas, es decir, al 0.5 y 3 %m de Cu^{2+} . Este comportamiento se explica por el hecho de que el sulfato de cobre se descompone a temperaturas superiores a 500 °C, mientras que la formación de CuO ocurre por encima de los

660 °C. En el caso de los nanomateriales de Cu-ZnO con nitrato de cobre, la pérdida de masa tiende a aumentar proporcionalmente al contenido de cobre, siendo más notoria en la muestra con mayor contenido de Cu^{2+} , es decir, la muestra de Cu-ZnO-N-3. Esto se debe a que presenta una mayor pérdida de masa en el mismo intervalo de temperatura en el que se presenta la descomposición del nitrato de cobre, es decir, entre 150 y 200 °C; además de que el comienzo de la formación del CuO a partir de este precursor, es por encima de 200 °C.

En conjunto, estos resultados evidencian que el efecto del cobre sobre la estabilidad térmica de los nanomateriales de Cu-ZnO no depende únicamente de su concentración, sino también del tipo de precursor empleado durante la síntesis. Las diferencias observadas sugieren que tanto las especies provenientes de cada precursor de cobre, así como la forma en la que el catión de Cu^{2+} se incorpora en la matriz del ZnO, influyen de manera determinante en el comportamiento térmico de los nanomateriales.

Figura 20

Porcentajes de pérdida de masa de los nanomateriales de ZnO y Cu-ZnO



4.3.2. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

En la Figura 21 se presentan los espectros de la muestra de ZnO sintetizadas en presencia del extracto de lirio acuático, tanto a la temperatura de secado (70°C) como de calcinado (500°C). En dicha muestra, las señales registradas eran similares, con diferencias en

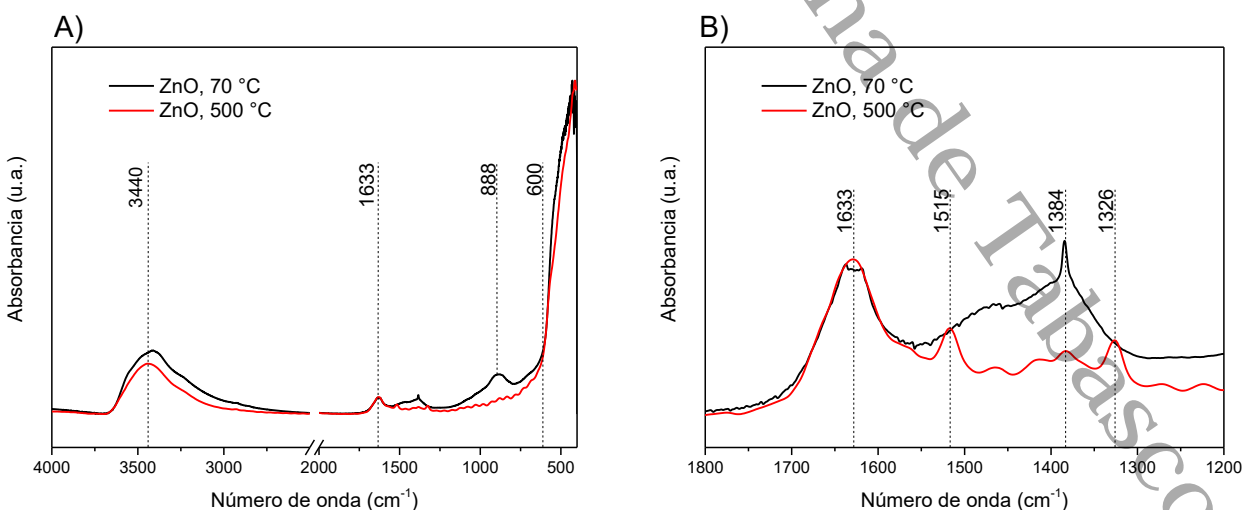
la intensidad. La banda en 3440 cm^{-1} y el pico en 1633 cm^{-1} corresponden al estiramiento O-H perteneciente a las moléculas de agua absorbidas por el material.

En la región de entre 1600 y 1300 cm^{-1} , se encuentran las señales relacionadas a los restos del extracto de lirio. En el caso del material seco (Figura 21B, línea negra), solo se identifica un pico definido en 1384 cm^{-1} , la cual disminuye en intensidad cuando el material es calcinado a 500 °C (Figura 21B, línea roja). Por otro lado, en el material calcinado se presentan otras dos señales relacionadas con los restos orgánicos del extracto, a 1515 y 1326 cm^{-1} . En cuanto a las señales asociadas a las vibraciones del enlace metal-oxígeno, la banda en 888 cm^{-1} (observada únicamente en el ZnO seco) corresponde a las vibraciones del enlace Zn-OH, relacionadas con la presencia de $\text{Zn}(\text{OH})_2$ que de acuerdo con lo reportado en la literatura está presente a temperaturas inferiores a 300 °C (Moharram et al., 2014; Pulit-Prociak & Banach, 2016). Por otro lado, en ambas muestras de ZnO (secas y calcinadas), se detectan las señales relacionadas al enlace del metal-oxígeno, localizadas por debajo de 600 cm^{-1} .

En el ZnO seco, la ausencia de la señal en alrededor de 1270 cm^{-1} , asociada al grupo pirano proveniente de los flavonoides e identificada en el espectro FTIR del extracto de lirio liofilizado (Figura 10), puede interpretarse como la pérdida de estos fitocompuestos. Dicha pérdida estaría relacionada con el proceso de lavado realizado para la obtención del ZnO, debido a que los flavonoides son compuestos hidrosolubles y se encuentran en menor concentración, tal como se lo indica el análisis de contenido de flavonoides. En consecuencia, es posible que los flavonoides hayan sido removidos después de los cinco lavados realizados.

Figura 21

Espectros FTIR de ZnO a 70 y 500 °C

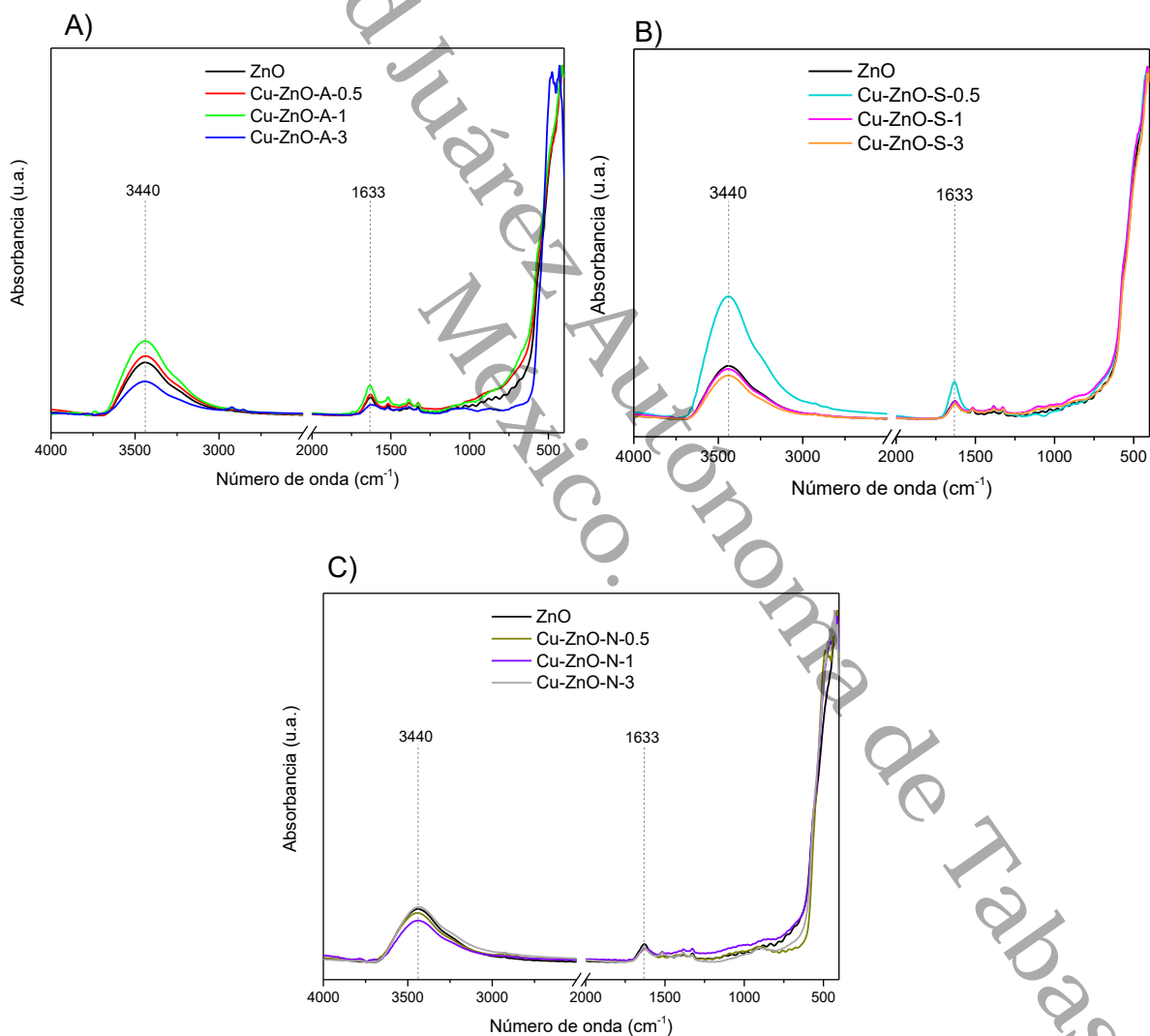


Nota. Espectros del ZnO en el rango de A) 4000 a 400 cm^{-1} y B) 1800 a 1200 cm^{-1}

Además, la espectroscopía FTIR se empleó para identificar los grupos funcionales presentes en las muestras Cu-ZnO calcinadas a 500 °C (Figura 22). Todas las muestras presentaron señales similares, con ligeras variaciones en cuanto a la intensidad y la aparición de señales superpuestas por debajo de 750 cm^{-1} . La banda amplia observada en todas las muestras en 3440 cm^{-1} , así como la señal en 1633 cm^{-1} corresponden al estiramiento O-H del agua absorbida, debido a que el análisis se realizó por la técnica de transmisión, en la cual las muestras fueron soportadas en pastillas de KBr.

Figura 22

Espectros FTIR de los nanomateriales de ZnO y Cu-ZnO



Nota. Espectros del ZnO y de Cu-ZnO sintetizado empleando como precursores: A) acetato de cobre, B) sulfato de cobre y C) nitrato de cobre.

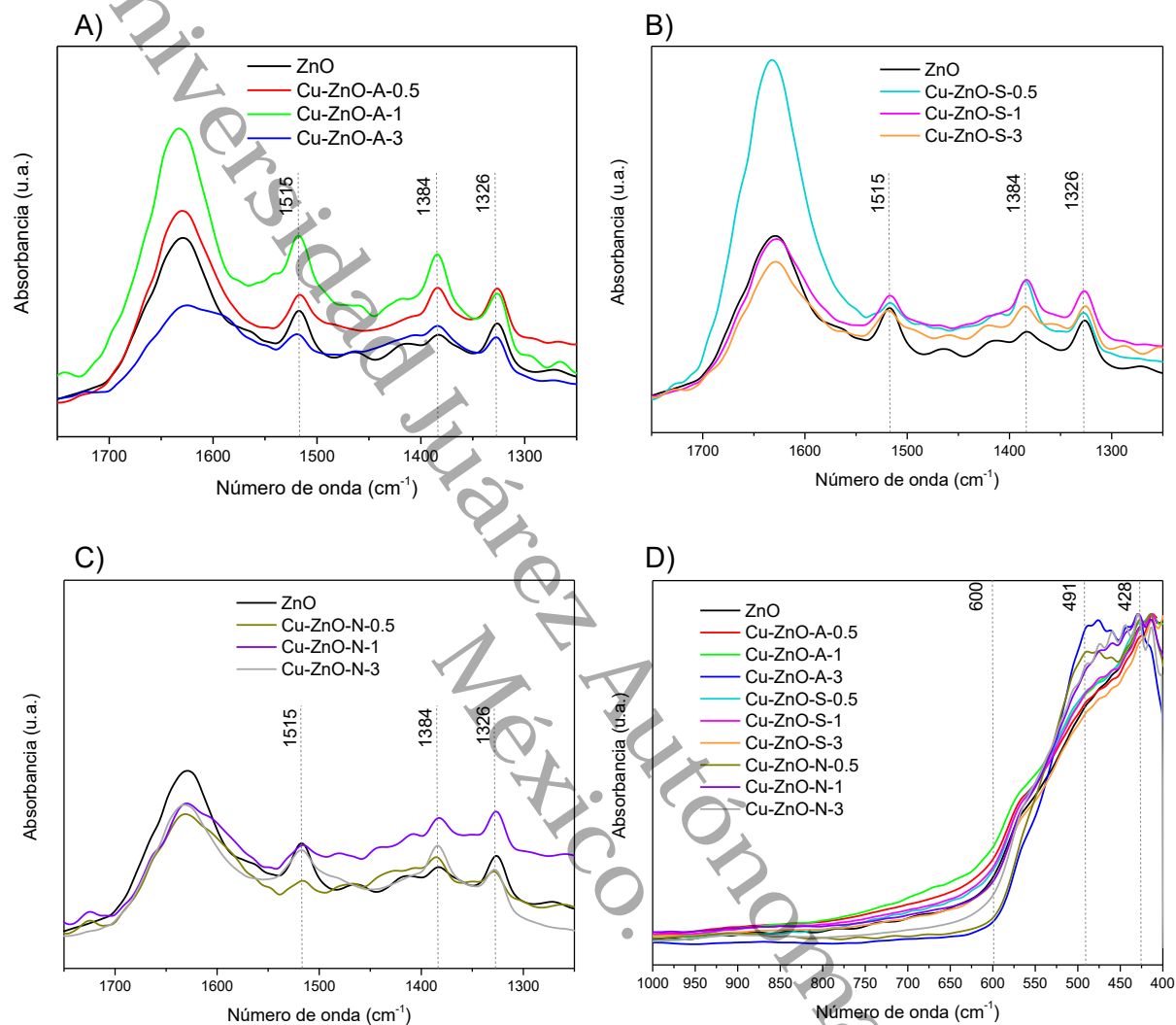
Al igual que en el espectro FTIR del ZnO, las señales atribuibles a restos del extracto de lirio empleado durante la síntesis de los nanomateriales de Cu-ZnO se encuentran en el rango de 1600 a 1300 cm^{-1} (Figura 23). La señal en 1515 cm^{-1} ha sido asociada al estiramiento del enlace C-O de grupos carbonilo (Sonthongphithak et al., 2024), los cuales pueden estar presentes en la muestra como parte de las cadenas orgánicas remanentes de la descomposición térmica de los fitocompuestos del extracto, aunque esta señal también se ha reportado para vibraciones del mismo enlace pero de tipo COO ionizados y coordinados con átomos de metales de transición en complejos tipo EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), lo que también podría estar sucediendo en las muestras analizadas ya que, la presencia de Cu^{2+} y Zn podría estar interactuando con las cadenas orgánicas cortas que aún se encuentran presentes (Nakamoto, 2009).

Por otro lado, la señal en 1384 cm^{-1} corresponde al estiramiento del C=O, posiblemente de los ácidos carboxílicos (Mistry, 2009; Vo et al., 2023), mientras que la señal en 1326 cm^{-1} , la cual es poco reportada en trabajos previos, puede tratarse de una señal relacionada a un anillo aromático, como, por ejemplo, un estiramiento C-O-C de un compuesto fenólico (Sathishkumar et al., 2017). Estas señales (1384 y 1326 cm^{-1}), presentan una distancia de separación similar a las señales en 1457 y 1416 cm^{-1} , encontradas en el extracto liofilizado calcinado. Por lo cual, estas señales podrían ser análogas entre sí, dado que el desplazamiento hacia menores números de onda se asocia a la formación de enlaces con átomos más pesados, lo que reduce la frecuencia vibracional. Debido al método de preparación de los nanomateriales, se asume que estos grupos se encuentran estabilizados en la superficie del material, ya sea mediante enlaces químicos o fuerzas intermoleculares, las cadenas orgánicas fragmentadas provenientes del extracto de lirio actuarían como agentes “capping”, es decir, ocluyendo la superficie del material (Villagrán et al., 2024).

Por lo que, con estas señales registradas es posible inferir los grupos funcionales provenientes de la extensa variedad de fitocompuestos que se encuentran presentes en el lirio acuático (Bakrim et al., 2022), las cuales abarcan diferentes compuestos como polifenoles y flavonoides, los cuales tienen como estructura básica, anillos aromáticos como el fenol o el benceno, además de otros grupos funcionales como el ácido carboxílico.

Figura 23

Magnificación de los espectros FTIR de ZnO y Cu-ZnO



Nota. Espectros FTIR en un rango de 1750 a 1250 cm⁻¹ del ZnO y de Cu-ZnO sintetizado empleando como precursores: A) acetato de cobre, B) sulfato de cobre y C) nitrato de cobre, así como D) espectros FTIR en un rango de 1000 a 400 cm⁻¹

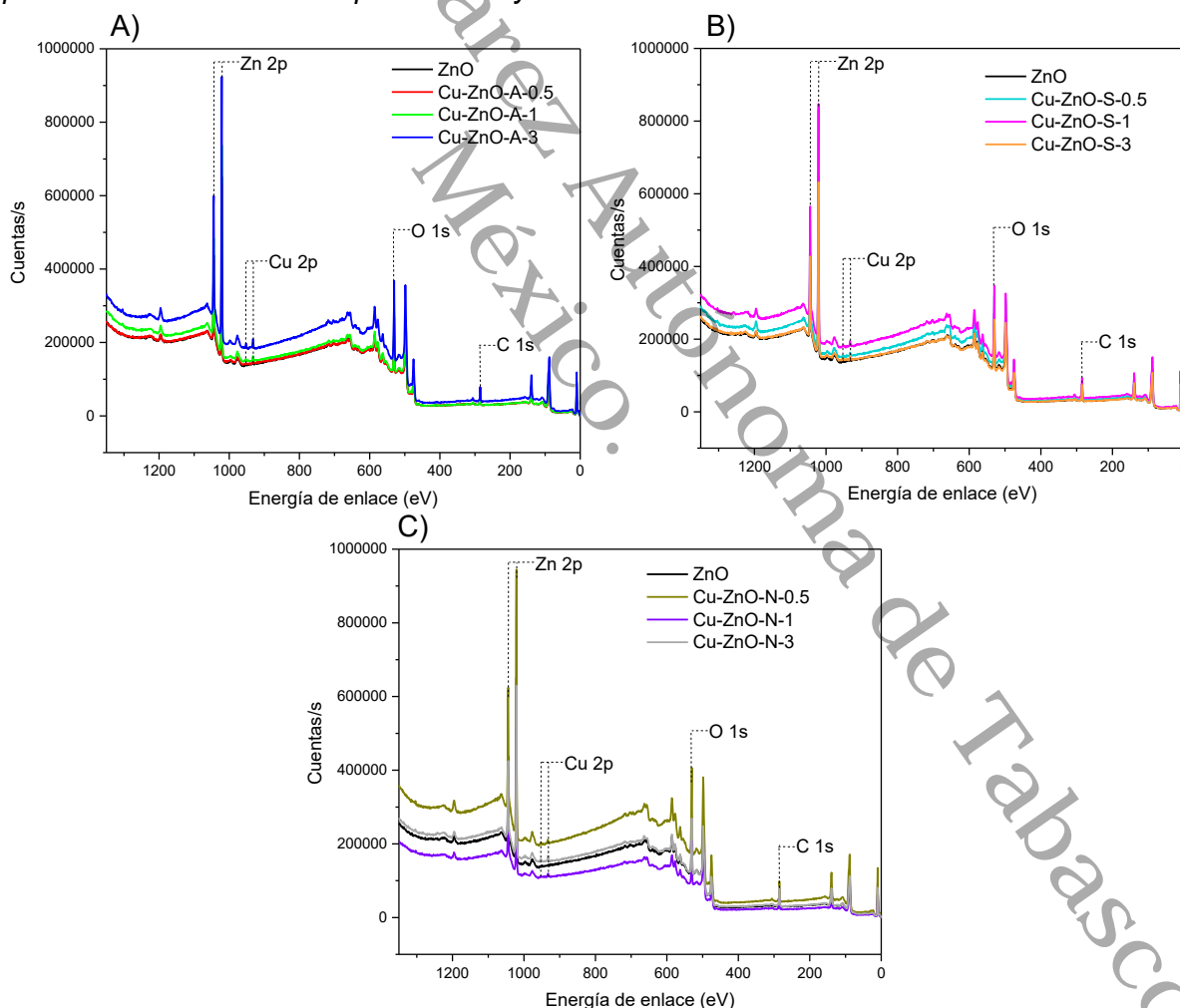
En la región por debajo de 1000 cm⁻¹ (Figura 23D), las muestras presentaron una banda amplia que se extiende desde 600 cm⁻¹ hacia número de onda menores, atribuidas a las vibraciones del metal-oxígeno. En todas las muestras se observa una señal intensa alrededor de 428 cm⁻¹, correspondiente a la señal de estiramiento del enlace Zn-O (Socrates, 2001). En los nanomateriales Cu-ZnO-A-3 y el Cu-ZnO-N-0.5 aparece una banda adicional alrededor de 491 cm⁻¹, atribuida al estiramiento Cu-O (Socrates, 2001; Yadeta Gemachu & Lealem Birhanu, 2024). Asimismo, en otras muestras de Cu-ZnO (Cu-ZnO-N-1 y el Cu-ZnO-N-3) se aprecia una superposición menos intensa de ambas vibraciones alrededor de 400 cm⁻¹.

4.3.3. Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS)

La espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS) se empleó para identificar y confirmar los elementos presentes en las muestras de ZnO y Cu-ZnO, así como sus estados de oxidación y sus porcentajes atómicos. En la Figura 24 se muestran los espectros en un amplio rango de energía (de 1350 a 0 eV) de los nanomateriales de ZnO y Cu-ZnO. A partir de estos espectros, se confirmaron la presencia de los elementos Zn, Cu, O y C en las muestras de Cu-ZnO; mientras que en el ZnO está ausente el elemento Cu, dado la naturaleza del proceso de síntesis. El empleo de distintos precursores en las muestras de Cu-ZnO no presenta una influencia significativa en los valores de la energía de enlace registradas en cada una de las muestras, aunque si se observan variaciones en cuanto a las intensidades de dichas señales.

Figura 24

Espectros XPS de barrido amplio de ZnO y Cu-ZnO

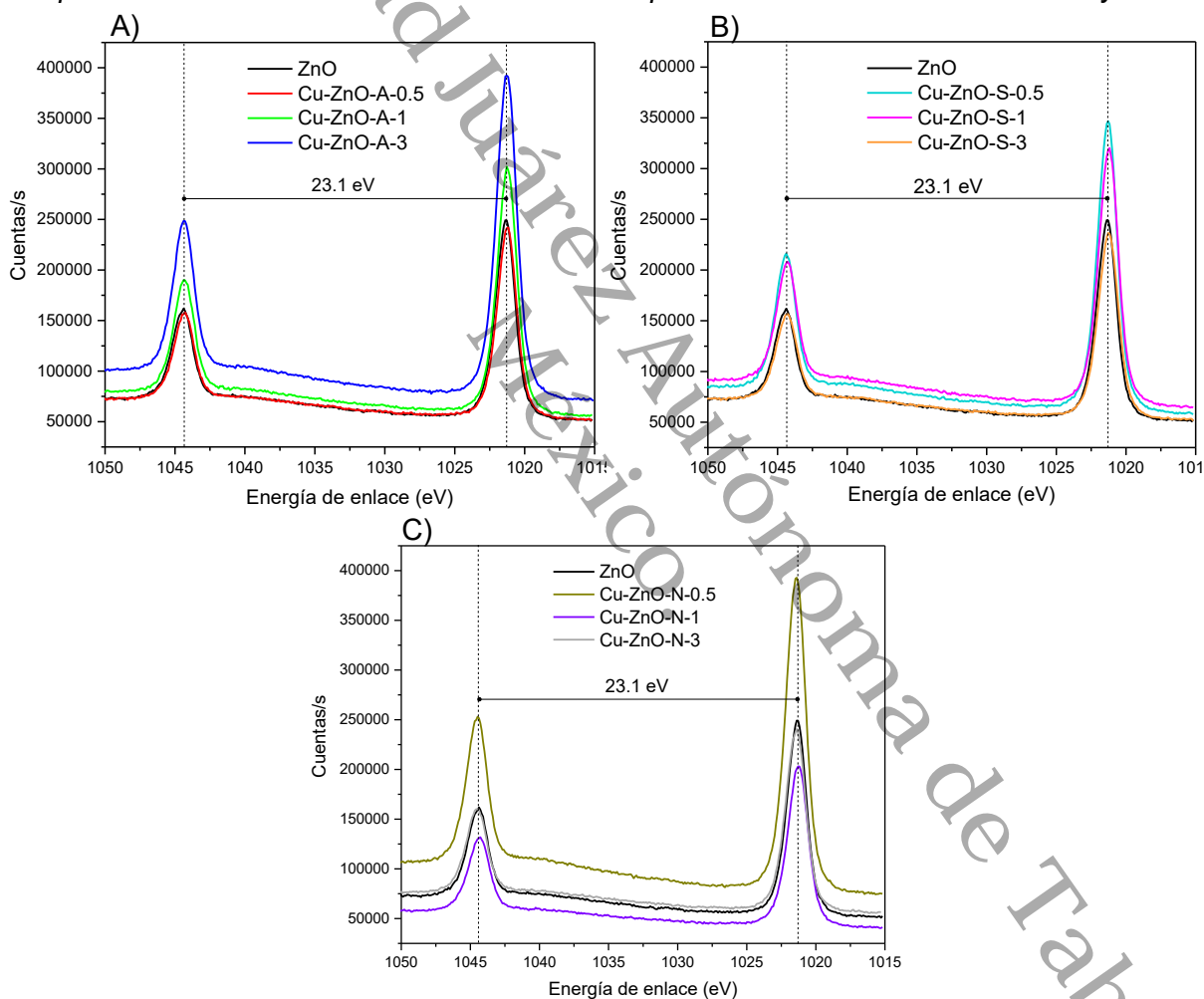


Nota. Espectros del ZnO y de Cu-ZnO sintetizado empleando como precursores: A) acetato de cobre, B) sulfato de cobre y C) nitrato de cobre.

Se colectaron los espectros de alta resolución de todas las muestras, con el fin de estudiar las regiones del espectro de cada uno de los elementos identificados. Para el caso del zinc, éste se realizó en un rango de 1050 a 1015 eV (Figuras 25A, 25B y 25C). En dicho rango, se identificaron las señales en 1044.38 y 1021.28 eV, las cuales son señales correspondientes a la órbita del espín de Zn $2p_{1/2}$ y Zn $2p_{3/2}$, respectivamente (Karthik et al., 2022; Moulder et al., 1992). La diferencia de estos valores de energía de enlace es de 23.1 eV, el cual corresponde al estado de oxidación Zn²⁺ (Morales-Mendoza et al., 2023).

Figura 25

Espectros locales de alta resolución del orbital 2p del zinc de las muestras de ZnO y Cu-ZnO



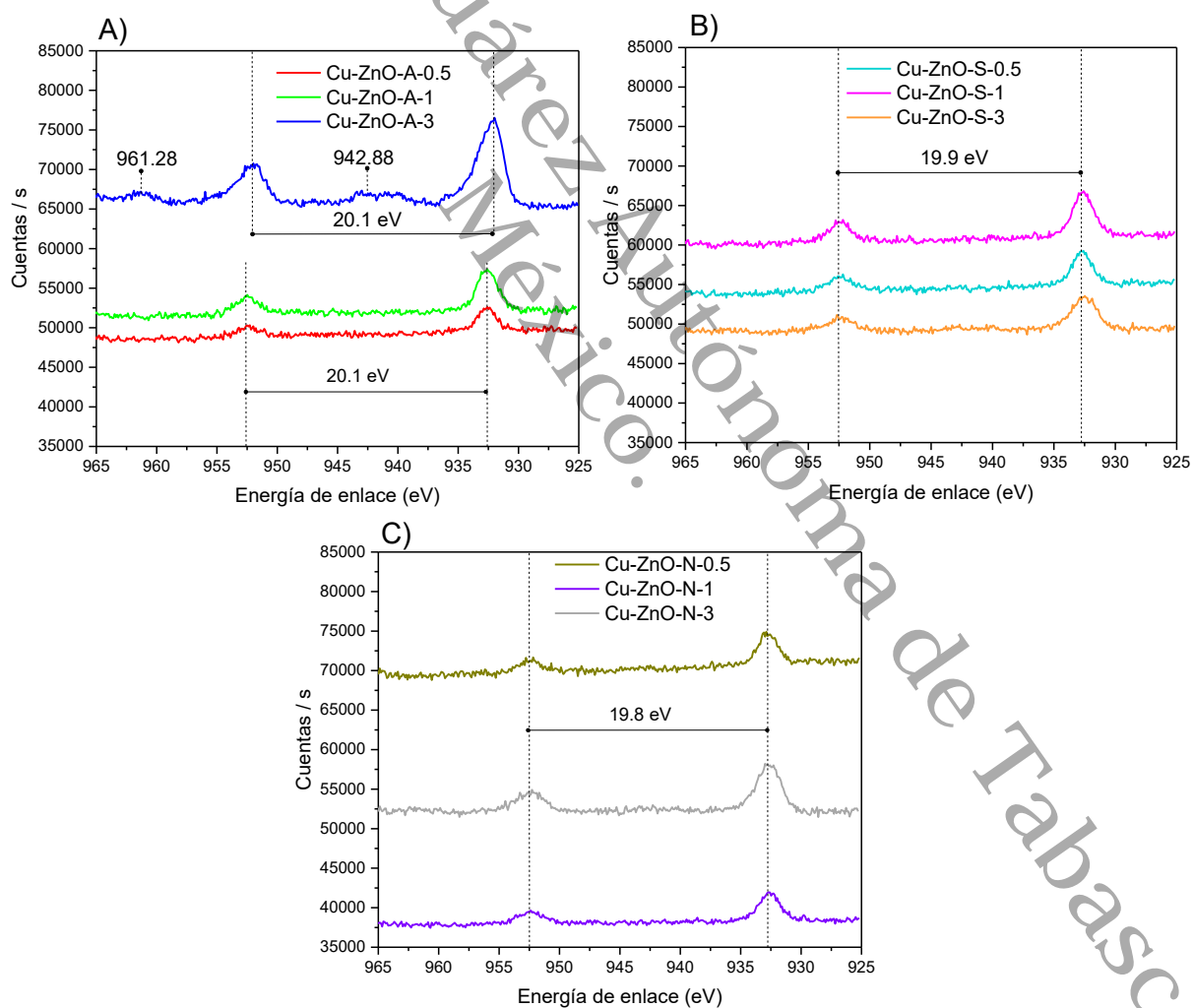
Nota. Espectros del ZnO y de Cu-ZnO sintetizado empleando como precursores: A) acetato de cobre, B) sulfato de cobre y C) nitrato de cobre.

En la Figura 26 se presentan los espectros locales del orbital 2p del cobre, en la región de la energía de enlace de 965 a 925 eV. En este rango, se encuentran las señales a 952 y 932 eV, con ligeras variaciones entre los espectros de las muestras con diferentes precursores del cobre.

La señal en 952 eV corresponde al Cu $2p_{1/2}$, mientras que la señal en 932 eV indica el Cu $2p_{3/2}$ (Lemecho et al., 2022). La diferencia de estas señales resulta de 20.1 eV para las muestras con acetato de cobre (Figura 26A), de 19.9 eV para las muestras con sulfato de cobre (Figura 26B) y de 19.8 eV para las muestras con nitrato de cobre (Figura 26C); los cuales son valores consistentes a lo reportado en la literatura para el estado de oxidación $2+$ del Cu (Morales-Mendoza et al., 2023). En el caso de la muestra Cu-ZnO-A-3, presenta señales en 961.28 y 942.88 eV, las cuales han sido reportadas como picos satélites atribuidos al Cu^{2+} , con el orbital d parcialmente lleno, además de relacionarse con la existencia del CuO (Karthik et al., 2022; Morales-Mendoza et al., 2023).

Figura 26

Espectros locales de alta resolución del orbital 2p del cobre de las muestras de ZnO y Cu-ZnO

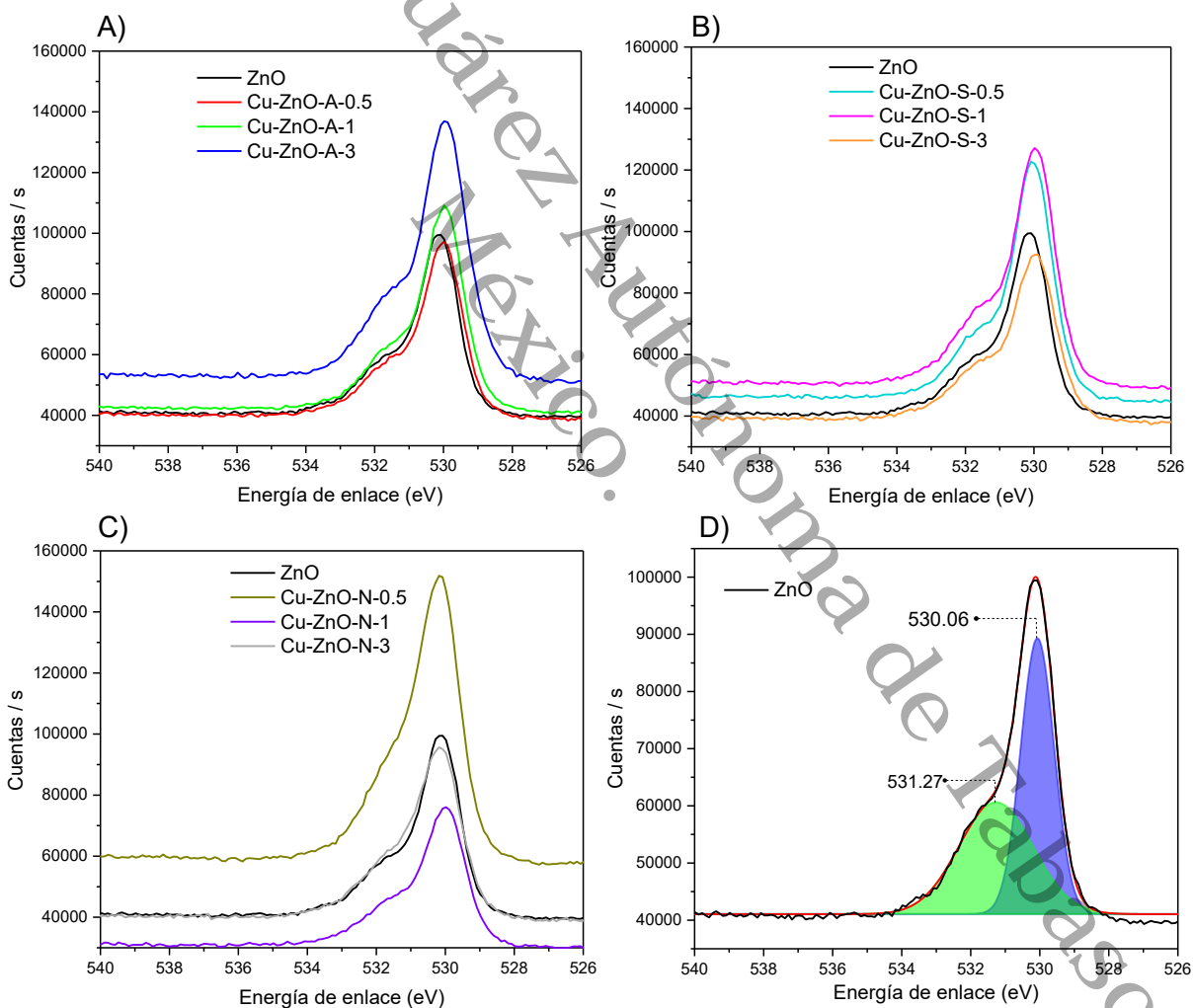


Nota. Espectros del ZnO y de Cu-ZnO sintetizado empleando como precursores: A) acetato de cobre, B) sulfato de cobre y C) nitrato de cobre.

Las señales propias del oxígeno se encuentran identificados en el rango de 540 a 426 eV (Figura 27). En todas las muestras, se observa una sobreposición de dos picos, las cuales son más pronunciadas en las muestras de Cu-ZnO con los precursores de acetato y sulfato de cobre (Figura 27A y 27B). A partir de la descomposición de las señales en el espectro del ZnO (Figura 27D) se identificaron las señales en 530.06 y 531.27 eV. La primera señal puede asignarse a la presencia de especies de oxígeno de la estructura del ZnO, aunque también se han reportado valores cercanos a 530.2 eV para oxígeno asociado a Cu_2O (Vasquez, 1998). Sin embargo, esto puede descartarse debido a que el Cu_2O presenta una coloración característica roja, la cual está ausente en los compuestos de Cu-ZnO sintetizados en este trabajo.

Figura 27

Espectros locales de alta resolución del orbital 1s del oxígeno de ZnO y Cu-ZnO



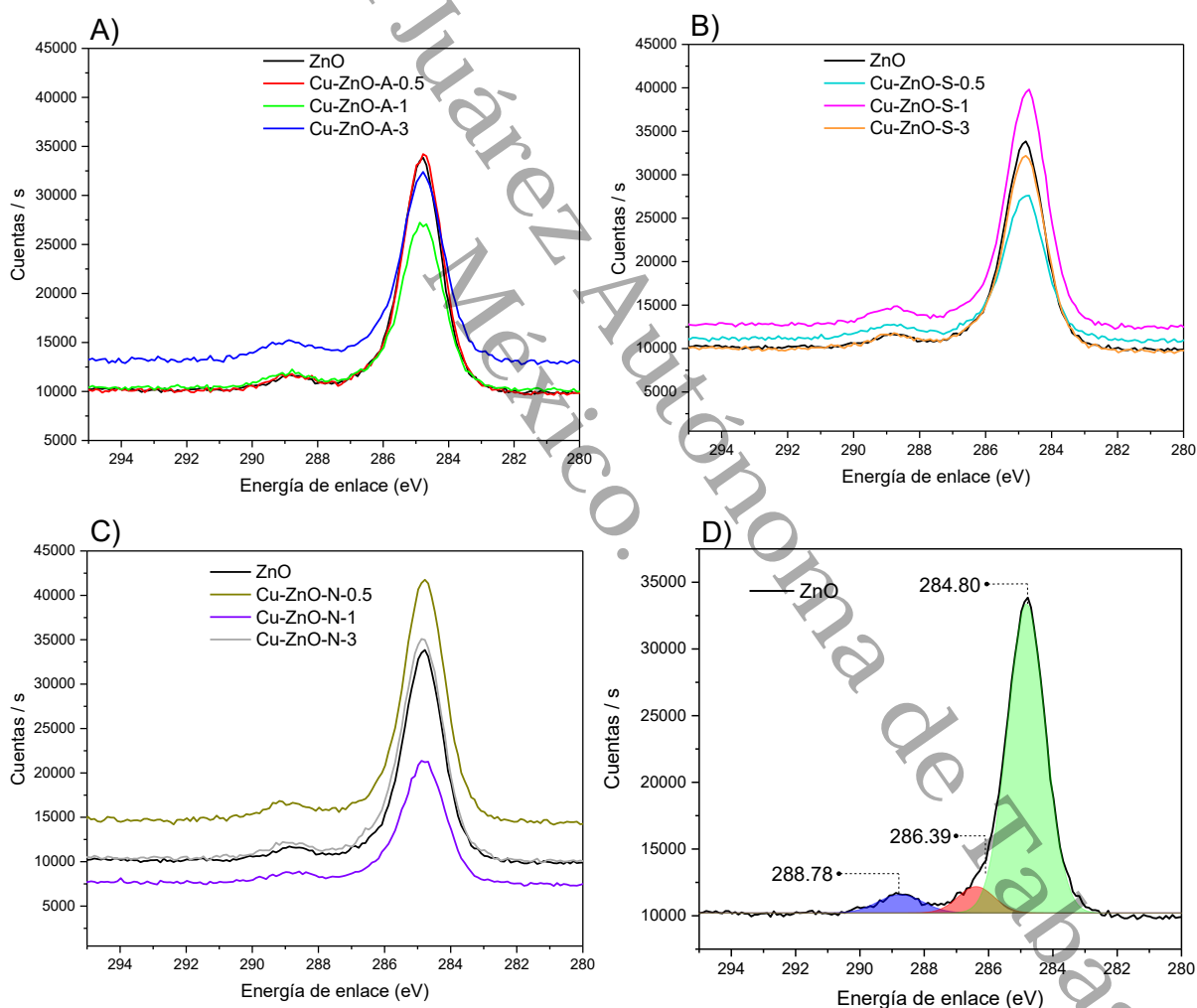
Nota. Espectros del ZnO y de Cu-ZnO sintetizado empleando como precursores: A) acetato de cobre, B) sulfato de cobre, C) nitrato de cobre, así como D) la resolución de picos del ZnO

Por otro lado, la señal en 531 eV (Figura 27) ha sido reportada tanto a la presencia de vacantes de oxígeno, como al hidroxilo (OH) adsorbidos en la superficie del material (Kaur et al., 2022; R. Nan, et al., 2023). La ausencia de señales a valores de energía menores a 530 eV permite asumir que no hay presencia de especies de oxígeno asociadas a CuO, el cual podría también haberse formado como consecuencia de la adición de cobre durante la síntesis.

La última región analizada en los espectros corresponde a la presencia de carbono, dentro del rango de 295 a 280 eV (Figura 28). En todos los casos se registraron principalmente señales en 284.80 eV y 288.78 eV, así como una contribución superpuesta en 286.39 eV.

Figura 28

Espectros locales de alta resolución del orbital 1s del carbono de ZnO y Cu-ZnO



Nota. Espectros del ZnO y de Cu-ZnO sintetizado empleando como precursores: A) acetato de cobre, B) sulfato de cobre, C) nitrato de cobre y D) la resolución los picos del ZnO

De acuerdo con la literatura, la señal alrededor de 285 eV indica la presencia de C 1s (Moulder et al., 1992). En particular, esta señal suele atribuirse al carbono adventicio presente de manera superficial en muestras de ZnO o a la presencia de enlaces C-C provenientes de dicho carbono espurio, presentes durante la medición (Thermo Fisher Scientific, 2021a, 2021b). Por otra parte, en estudios donde no se emplean extractos vegetales como agentes de síntesis, las señales en 288.78 eV y 286.39 eV se han asignado a los enlaces de O-C=O y C-O-C, respectivamente (Sun et al., 2021; Thermo Fisher Scientific, 2021b). Por lo tanto, aunque no se ha sido reportado de forma específica en sistemas que utilizan extractos biológicos como medio de reacción (Karthik et al., 2022; Lemecho et al., 2022), es posible que estas señales estén relacionadas con restos orgánicos del extracto de lirio empleado durante la síntesis. Dichas contribuciones podrían ser homólogas a las bandas observadas en el FTIR en las regiones de 1515, 1384 y 1326 cm^{-1} , correspondientes a los modos vibracionales de C-O, C=O y C-O-C, respectivamente, así como también coincide con los remanentes orgánicos aún observados después de calcinar a 500°C como se identificó mediante el análisis termogravimétrico del extracto liofilizado.

Dado que las señales en 288 y 286 eV están asociadas con carbonos en diferentes entornos químicos, estas podrían reflejar la interacción de los restos del extracto con los nanomateriales de ZnO y Cu-ZnO. Según Stevie & Donley (2020), el área relativa bajo cada pico del espectro C 1s representa la proporción de átomos de carbono en cada entorno químico. Por lo tanto, a partir de la resolución de las señales de carbono en todas las muestras (por ejemplo, para el ZnO en la Figura 28 D), se calculó la relación entre los picos de carbono en 288 y 286 eV (Tabla 2). Esta relación, C_{288}/C_{286} , puede emplearse como indicador de la proporción de ambas especies de carbono (O-C=O/C-O-C), es decir, la fracción relativa de carbonos oxidados (O-C=O) y de carbonos parcialmente oxidados (C-O-C).

Se observa que el ZnO presenta la menor relación C_{288}/C_{286} , lo cual sugiere que, sin la adición de cobre, hay una mayor proporción de carbonos parcialmente oxidados. Por el contrario, las muestras con valores más altos de C_{288}/C_{286} representan una mayor proporción de grupos O-C=O, lo que indicaría un mayor grado de oxidación. Este comportamiento se evidencia en las muestras Cu-ZnO-A-3, Cu-ZnO-S-0.5 y Cu-ZnO-N-0.5. En general, estas diferencias podrían asociarse con modificaciones superficiales del material, o con la interacción entre grupos oxigenados y los sitios metálicos en la superficie de los nanomateriales con cobre. Además, en concordancia con estos resultados, los nanomateriales con mayores valores de C_{288}/C_{286} , mostraron también mayor actividad antimicrobiana.

Por lo tanto, los resultados sugieren que la incorporación de cobre favorece la presencia de especies orgánicas más oxidadas (O-C=O), originando una superficie más polar y funcionalizada. De acuerdo con Sanità et al. (2020), la funcionalización superficial de nanopartículas ha sido empleado como estrategia para mejorar sus propiedades biológicas, esto, mediante la adición de un grupo funcional orgánico (como R-NH₂, R-COOH, etc), que facilitan la unión de las nanopartículas con biomoléculas. Esto refuerza la idea de que el extracto de lirio está actuando como un agente de recubrimiento superficial (*capping*), los cuales son empleados para la mejora de propiedades biológicas de nanopartículas (Javed et al., 2020). Irfan et al. (2022), demostraron que nanopartículas de plata (Ag) recubiertas con grupos de ácidos carboxílicos en su superficie presentan una mejor actividad antimicrobiana frente a distintas cepas, como *E. coli*, *B. subtilis*, *S. typhi* y *S. aureus*, en comparación con las nanopartículas de Ag sin este tipo de recubrimiento. Asimismo, mencionan que la forma desprotonada del ácido carboxílico, el carboxilato (-COO⁻), actúa como estabilizante de nanopartículas de Ag, al coordinarse con la superficie metálica de las nanopartículas de Ag, favoreciendo así, su interacción con las membranas bacterianas. Si bien este sistema no es directamente comparable con el presente trabajo, debido a las diferencias químicas entre la plata metálica y el ZnO, este último tendría mayor afinidad para coordinarse con el carboxilato, dado que generalmente el ZnO tiene un área específica mayor a la de NP metálicas como la plata.

Tabla 2.

Relación entre componentes del espectro C 1s de ZnO y Cu-ZnO

Muestra	Área O-C=O (288 eV)	Área C-O-C (286 eV)	Relación (288 eV) / (286 eV)
ZnO	2398.48	2800.06	0.86
Cu-ZnO-A-0.5	2820.48	2562.36	1.10
Cu-ZnO-A-1	2979.84	2470.21	1.21
Cu-ZnO-A-3	4291.15	2237.02	1.92
Cu-ZnO-S-0.5	3344.74	2018.53	1.66
Cu-ZnO-S-1	3499.42	3585.60	0.98
Cu-ZnO-S-3	3216.73	2654.25	1.21
Cu-ZnO-N-0.5	3958.23	3570.03	1.11
Cu-ZnO-N-1	2250.12	2470.86	0.91
Cu-ZnO-N-3	3231.33	3669.03	0.88

De forma análoga, se encontró que los grupos O-C=O detectados por XPS en los nanomateriales de ZnO y Cu-ZnO, podrían estar coordinados a iones metálicos superficiales (Zn²⁺ o Cu²⁺), contribuyendo a la formación de una superficie más funcionalizada, lo que podría

favorecer la interacción con células microbianas, en concordancia con los resultados de actividad antimicrobiana previamente presentados.

Finalmente, se obtuvieron los porcentajes atómicos de los elementos presentes en las muestras de ZnO y Cu-ZnO (Tabla 3). Las muestras de Cu-ZnO presentaron valores de entre 26.85 a 35.72% atómico de Zn. Se observa que la mayoría de las muestras de Cu-ZnO obtuvieron un mayor porcentaje atómico de este elemento, en comparación con las NP de ZnO sin modificar, siendo las excepciones las muestras de Cu-ZnO-A-0.5, Cu-ZnO-S-3 y Cu-ZnO-N-3. Por otro lado, el porcentaje de Cu²⁺ registrado en las muestras de ZnO modificadas con Cu²⁺ (Tabla 3, Figura 29) presentan variaciones en cuanto a la cantidad añadida de Cu²⁺. En general, todas las muestras presentaron un incremento en el porcentaje de cobre, aunque menores a las concentraciones nominales. En el caso de las muestras de Cu-ZnO al 0.5%, estas alcanzaron un porcentaje atómico cercano a lo añadido; mientras que las muestras al 1% obtuvieron porcentajes ligeramente por debajo de lo añadido durante el proceso de síntesis. En el caso de las muestras de Cu-ZnO al 3%, ninguna obtuvo un porcentaje cercano a lo añadido, siendo la muestra Cu-ZnO-A-3 la que registro el mayor porcentaje, al 2.03% atómico. Esto podría ser indicativo de que el porcentaje máximo que se puede añadir ya que el método de síntesis y las propiedades electrónicas del cobre permitirían que iones de este se introdujeran en la red del ZnO como impurezas o bien como átomos sustituyentes en la red del óxido. En general, se puede concluir que el contenido nominal que presenta menos pérdida de Cu²⁺ en este tipo de síntesis, son las correspondientes al 1%.

Tabla 3.

Porcentajes atómicos de las muestras de ZnO y Cu-ZnO

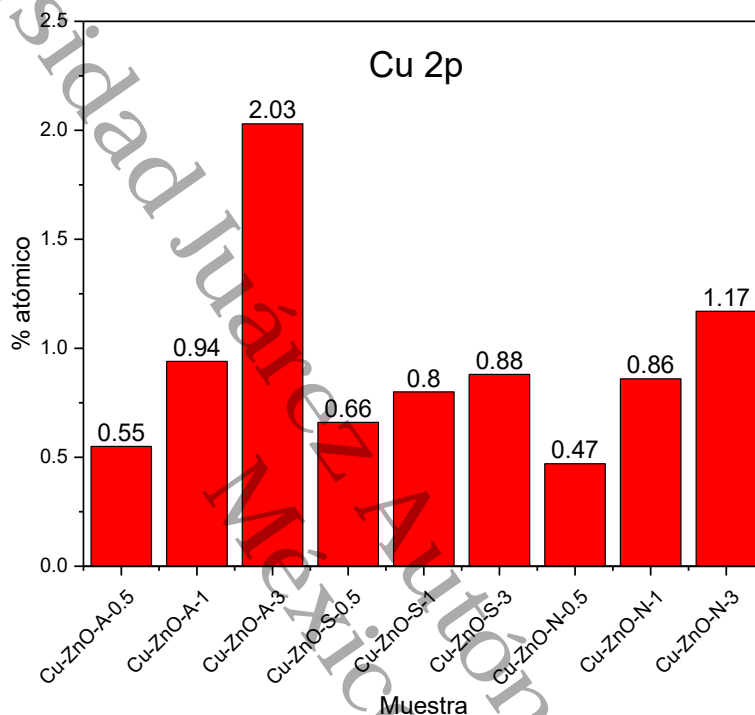
Muestra	Zn 2p	Cu 2p	O 1s	C 1s
ZnO	28.15	-	37.74	34.11
Cu-ZnO-A-0.5	26.85	0.55	37.02	35.58
Cu-ZnO-A-1	33.21	0.94	40.81	25.04
Cu-ZnO-A-3	33.93	2.03	41.64	22.4
Cu-ZnO-S-0.5	35.72	0.66	40.95	22.66
Cu-ZnO-S-1	28.63	0.8	39.22	31.35
Cu-ZnO-S-3	27.19	0.88	38.11	33.82
Cu-ZnO-N-0.5	30.94	0.47	41.48	27.11
Cu-ZnO-N-1	31.31	0.86	39.29	28.55
Cu-ZnO-N-3	25.53	1.17	37.39	35.9

En cuanto al porcentaje de O (Tabla 3), no se observaron grandes variaciones entre las muestras, dado que se encontraron entre el 37.02 y el 41.64%. Finalmente, el porcentaje atómico

del C (Tabla 3) de las muestras de Cu-ZnO con acetato de cobre presentó un comportamiento descendente, mientras que para las muestras con sulfato y nitrato de cobre el efecto fue ascendente.

Figura 29

Porcentajes atómicos del cobre en Cu-ZnO determinados por XPS



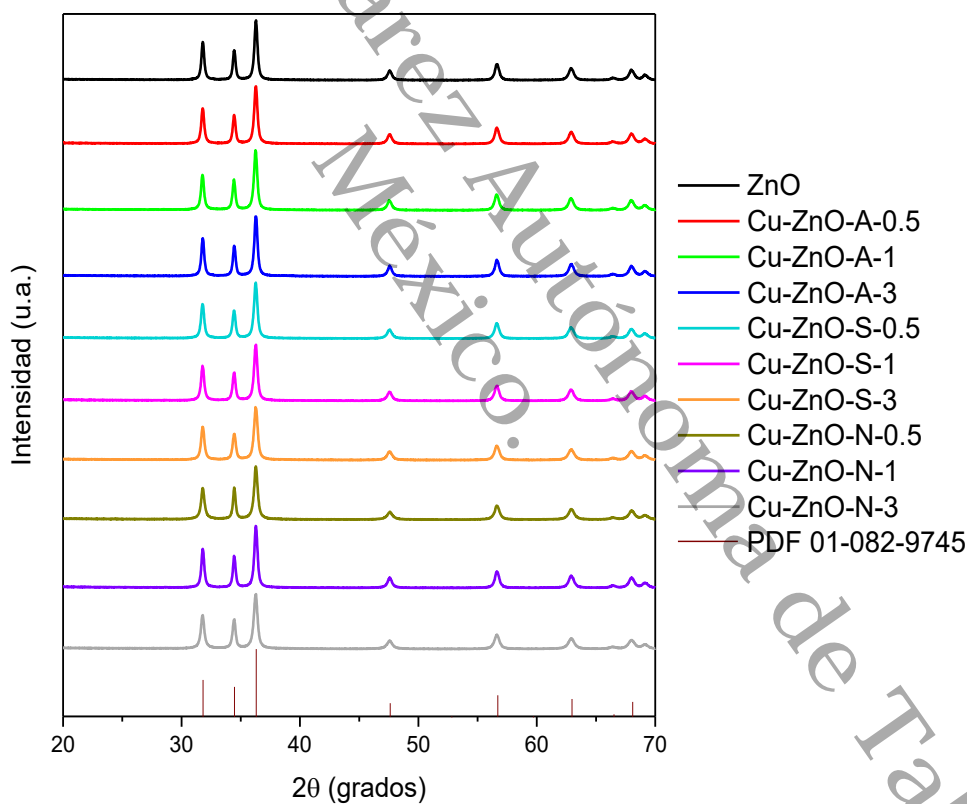
4.3.4. Difracción de Rayos X (DRX)

En la Figura 30 se muestran los patrones de difracción de los nanomateriales de ZnO y Cu-ZnO, en el intervalo de 20° a 70° (2θ). Todas las muestras presentan los picos característicos del ZnO conforme a la carta cristalográfica PDF 01-082-9745, con valores de 2θ de 31° , 34° , 36° , 47° , 56° , 62° , 66° , 68° y 69° , los cuales corresponden a los planos (1 0 0), (0 0 2), (1 0 1), (1 0 2), (1 1 0), (1 0 3), (2 0 0), (1 1 -2) y (0 2 1), respectivamente. La presencia de estas señales indica que el ZnO presenta la fase cristalina hexagonal, tipo wurtzita. Se compararon las señales encontradas con las cartas cristalográficas del Cu (PDF 00-004-0836), CuO (PDF 00-005-0661) y el Cu₂O (PDF 00-005-0667), a partir de lo cual se determinó que no se detectaron picos adicionales que estén relacionados con la adición del Cu²⁺, esto debido al bajo porcentaje al que se añadió durante la síntesis, de 0.5, 1 y 3 %m. Pero, tal como se observó en XPS, el

Cu-ZnO-A-3 fue el nanomaterial con el mayor porcentaje atómico detectado en superficie, con el 2 % de Cu^{2+} . Considerando las limitaciones de detección de la técnica DRX (hasta 2 %m de dopante) se visualizan dos posibles escenarios: 1) que los átomos de cobre se encuentren incorporados en la red del ZnO ya sea como cationes o bien como átomos sustituyendo un átomo de zinc, y 2) formando agregados muy pequeños en los bordes de grano del ZnO que no son detectables por su tamaño o si se encuentran muy dispersos. Debido al método de síntesis empleado, es razonable asumir la primera opción, debido a la similitud entre los radios iónicos de Zn^{2+} y Cu^{2+} . En este sentido, Nandasana et al. (2024), reportaron la ausencia de fases secundarias de cobre en los patrones de DRX, atribuyendo este comportamiento a incorporación del Cu^{2+} en la red del ZnO.

Figura 30

Patrones de difracción de rayos X de ZnO y Cu-ZnO



El cálculo del tamaño de cristalito fue realizado mediante la ecuación de Scherrer (Ecuación 5); considerando el ancho medio del pico con mayor intensidad, es decir, el que corresponde al plano (1 0 0). Los valores del ángulo en 2θ , el ancho medio de pico y los valores de tamaño de cristalito se recopilan en la Tabla 4.

$$D = \frac{K\lambda}{\beta \cos \theta} \quad (5)$$

Los valores de tamaño de cristalito obtenidos oscilan entre 26.723 y 22.40 nm, siendo el ZnO el material con el mayor tamaño de cristalito, mientras que la mayoría de las muestras de Cu-ZnO, a excepción del Cu-ZnO-A-3, tienen tamaños de cristalito con una diferencia de 1 o 2 nm menores a las del ZnO, lo cual evidencia que la adición del cobre tiene una ligera influencia en este parámetro.

Los tamaños de cristal reportados en la literatura para síntesis biológica de Cu-ZnO varían de 13.14 nm (Nandasana et al., 2024) a 29.76 nm, siendo los trabajos de Karthik et al. (2022) y Adeyemi et al. (2022) los que presentan valores similares obtenidos a este trabajo, con 29.76 y 23.21 nm, respectivamente.

Se ha reportado que el aumento de la concentración del cobre es inversamente proporcional al tamaño de cristal, lo cual, conforme a los trabajos previos de Tharayil et al. (2024) y Karthik et al. (2022) ha sido atribuido a la sustitución del Cu^{2+} en la estructura. Este comportamiento se presenta en las muestras sintetizadas con sulfato y nitrato de cobre, ya que los tamaños de cristal de las muestras al 3% de Cu^{2+} fueron menores que los nanomateriales al 0.5% de Cu^{2+} .

Tabla 4

Parámetros cristalinos de los nanomateriales ZnO y Cu-ZnO

Muestra	2θ (°)	D (nm)	Parámetros de red (Å)		Volumen de celda (Å ³)	% C	Intensidad del pico en 36°
			a	c			
ZnO	36.28	26.72	3.25	5.20	47.49	85.41	179.79
Cu-ZnO-A-0.5	36.27	25.53	3.25	5.20	47.52	87.15	172.80
Cu-ZnO-A-1	36.26	25.29	3.25	5.21	47.60	90.49	180.71
Cu-ZnO-A-3	36.28	26.36	3.25	5.20	47.49	85.73	180.27
Cu-ZnO-S-0.5	36.26	24.08	3.25	5.20	47.56	86.35	168.12
Cu-ZnO-S-1	36.27	24.63	3.25	5.20	47.56	88.18	168.62
Cu-ZnO-S-3	36.27	22.67	3.25	5.20	47.51	89.06	159.89
Cu-ZnO-N-0.5	36.28	23.64	3.25	5.20	47.49	88.61	160.55
Cu-ZnO-N-1	36.28	25.97	3.25	5.20	47.49	88.45	186.43
Cu-ZnO-N-3	36.26	22.40	3.25	5.20	47.57	87.18	165.30

También se llevó a cabo el cálculo de la distancia interplanar mediante la Ecuación 6:

$$d = \frac{n\lambda}{2\sin\theta} \quad (6)$$

La distancia interplanar fue utilizada en el cálculo de los parámetros de red. La Ecuación 7 corresponde a la ecuación de la celda unitaria hexagonal:

$$\frac{1}{d^2} = \frac{4}{3} \left(\frac{h^2 + hk + k^2}{a^2} \right) + \frac{l^2}{c^2} \quad (7)$$

La Ecuación 8 permite calcular el volumen de la celda, en la cual ($a = b$), por tratarse de una estructura hexagonal:

$$V = 0.866a^2c \quad (8)$$

Los resultados de los parámetros de red y el volumen de la celda se presentan en la Tabla 4. Los valores obtenidos son ligeramente mayores que los reportados en la carta cristalográfica del ZnO (PDF 01-082-9745) en donde se indica que $a = 3.2444 \text{ \AA}$, $c = 5.1998 \text{ \AA}$ y $V = 47.40 \text{ \AA}^3$. El uso de distintos precursores de Cu^{2+} mostró que, para el caso del sulfato de cobre, el volumen de la celda disminuye ligeramente a medida que aumenta el % de Cu^{2+} añadido; mientras que para el nitrato de cobre este comportamiento se presenta a la inversa, es decir, los valores aumentan ligeramente a medida que la cantidad de Cu^{2+} presente es mayor.

Esto puede explicarse con la cercanía entre los valores de los radios iónicos del Cu^{2+} y Zn^{2+} , los cuales son de 0.73 y 0.74 \AA , respectivamente, lo que puede facilitar que algunos iones Cu^{2+} sustituyan los iones Zn^{2+} en la red cristalina del ZnO, ya que, a pesar de que no hay cambios significativos en los parámetros de red "a" y "c", si se observan cambios en el volumen de la celda (Nandasana et al., 2024; Tharayil et al., 2024), sin embargo se requiere de estudios más específicos para confirmar lo anterior.

El porcentaje de cristalinidad de los nanomateriales de ZnO y Cu-ZnO se estimaron a partir del área integrada de los picos de difracción, considerando la relación entre la fracción cristalina y total (Ecuación 9).

$$\%C = \frac{A_c}{A_c + A_a} * 100 \quad (9)$$

Donde A_c corresponde al área integrada bajo los picos cristalinos, y A_a al área bajo la región amorfa. Los porcentajes de cristalinidad se muestran en la Tabla 4; donde se observan valores entre 85 y 90%. Un mayor porcentaje de cristalinidad implica una mayor proporción de regiones ordenadas dentro del material, por lo que valores obtenidos indican que los nanomateriales presentan una estructura predominantemente cristalina, sin efecto aparente del tipo precursor o el contenido de cobre empleado.

Finalmente, en cuanto a la intensidad de los picos (Tabla 4), las muestras que presentaron mayor intensidad en sus picos, en comparación con el ZnO, fueron las muestras Cu-ZnO-A-1, Cu-ZnO-A-3 y Cu-ZnO-N-1, por lo que son las que se pueden considerar que presentan menor

desorden, debido a que una distribución aleatoria de los iones de Cu^{2+} conduce a una reducción en la intensidad de los picos. Ante esto, Tharayil et al. (2024) reportó que al aumentar el contenido de cobre (del 3 al 8%), la intensidad de los picos disminuyó significativamente, lo cual, para el caso del presente trabajo, solo ocurre en las muestras con sulfato de cobre, donde se observó una ligera disminución en la intensidad de los picos en 36° , a medida que el contenido de Cu^{2+} aumenta de 0.5 a 3 %m.

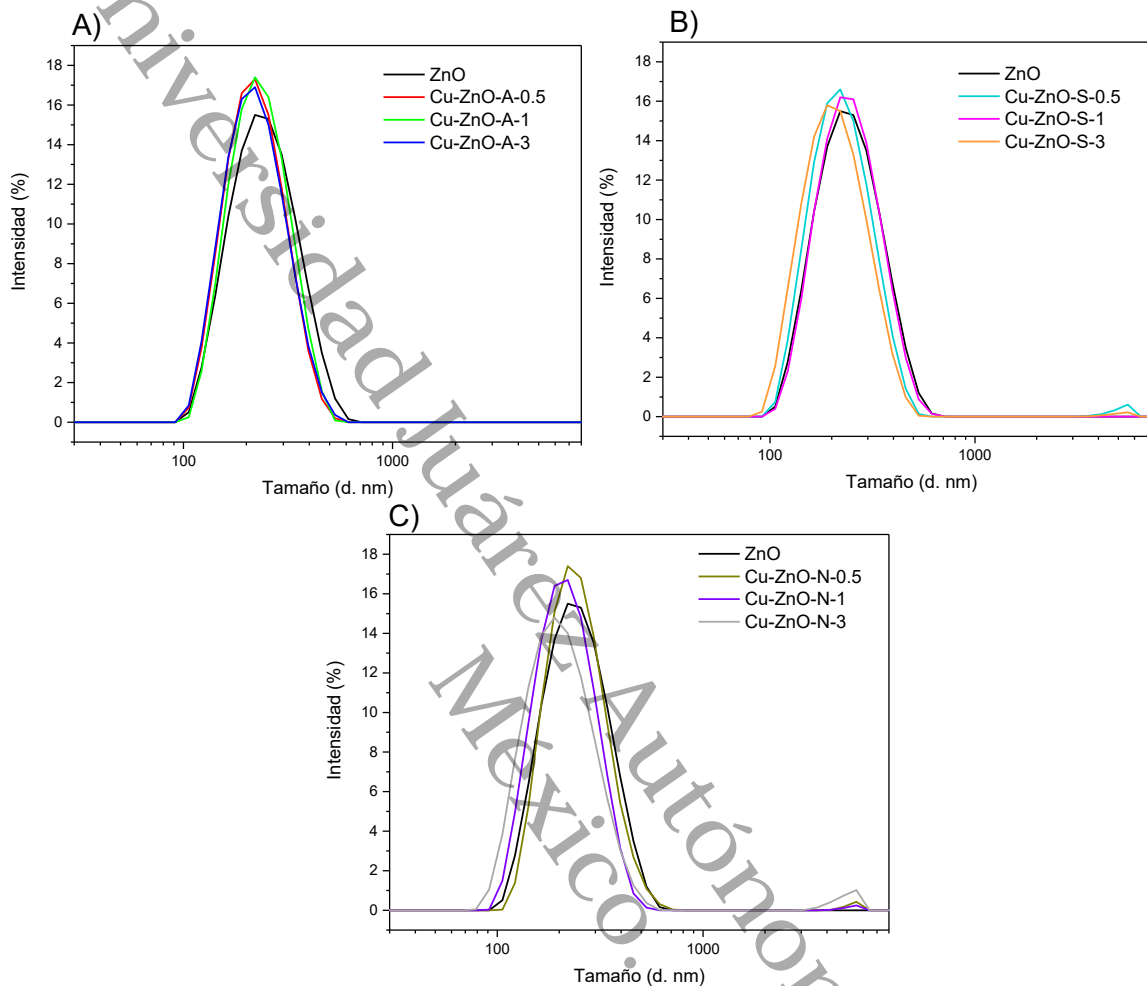
4.3.5. Dispersión de luz dinámica y electroforética (DLS y ELS)

La dispersión de luz es una técnica utilizada para caracterizar las nanopartículas que se encuentran en soluciones coloidales. En el caso de la dispersión de luz dinámica (DLS, por sus siglas en inglés), se utiliza para estimar el diámetro hidrodinámico mediante el análisis del movimiento browniano de las partículas en suspensión.

En la Figura 31 se muestran las distribuciones de los tamaños hidrodinámicos de los nanomateriales de ZnO y Cu-ZnO. La distribución de estos valores se ajusta a una distribución gaussiana, que comprenden valores de entre 100 y 700 nm. Además, se observa que, para los precursores de sulfato y nitrato de cobre, al agregar el mayor porcentaje de Cu^{2+} durante la síntesis, tiende a presentar un ligero desplazamiento de la distribución, hacia menores valores de tamaño hidrodinámico. De igual forma, para estos precursores, se registraron algunas partículas a valores mayores de 1000 nm; los nanomateriales obtenidos con sulfato de cobre presentaron incluso valores de 5570 nm; mientras que con nitrato de cobre se observó una señal de baja intensidad a 5560 nm. Estas señales, pueden deberse a la formación de algunos aglomerados, pero dado que su contribución es muy pequeña, no afectan el tamaño promedio de las partículas *Z-average*.

Figura 31

Distribución del tamaño hidrodinámico de los nanomateriales de ZnO y Cu-ZnO

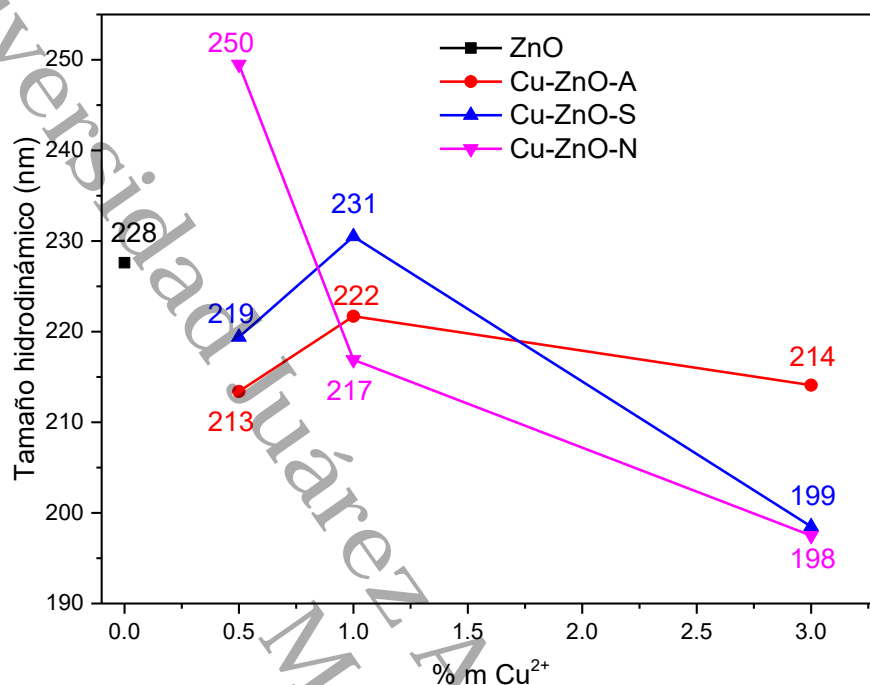


Nota. Distribución del tamaño del ZnO y de Cu-ZnO sintetizado empleando como precursores: A) acetato de cobre, B) sulfato de cobre y C) nitrato de cobre.

Por otro lado, los valores de dichos tamaños hidrodinámicos se presentan en la Figura 32 y en la Tabla 5. El comportamiento encontrado en las curvas de distribución de tamaño de las muestras con sulfato de cobre (Figura 31B) y nitrato de cobre (Figura 31C) se ven reflejados en las muestras con mayor porcentaje de Cu^{2+} (3%), las cuales tienen los menores valores de tamaños hidrodinámicos (199 nm para el Cu-ZnO-S-3 y 198 nm para el Cu-ZnO-N-3), en contraparte con los valores observados para las muestras con los porcentajes de 0.5 y 1% de Cu^{2+} .

Figura 32

Valores de tamaño hidrodinámico de las muestras de ZnO y Cu-ZnO



El índice de polidispersidad es un valor que indica qué tan homogénea es la distribución de los tamaños de una muestra; valores por debajo de 0.1 indican que la muestra es altamente monodispersa, mientras que valores entre 0.1 a 0.4 indican que la muestra es moderadamente polidispersa (Bhattacharjee, 2016). Los valores de índices de polidispersidad los nanomateriales ZnO y Cu-ZnO se reportan en la Tabla 5. Se observa que el ZnO presenta el menor valor de índice de polidispersidad, con 0.105, indicando partículas más homogéneas en tamaño, tal como se observa en la Figura 31 ya que se identifica una distribución unimodal estrecha. Por otro lado, las muestras obtenidas usando el nitrato de cobre como precursor, tienen valores de PDI alrededor de 0.2, lo cual indica partículas moderadamente polidispersas (Figura 31C), en donde las muestras Cu-ZnO-N presentan picos ligeramente más anchos, además de un pico adicional de baja intensidad correspondiente a las partículas de mayor tamaño (5560 nm). Por lo cual, se establece que el tipo de precursor de Cu²⁺ empleado influye en la polidispersidad de los nanomateriales obtenidos, siendo las muestras con nitrato de cobre las que presentan mayor polidispersidad, atribuible a la distinta velocidad de liberación de iones Cu²⁺.

Tabla 5

Tamaño hidrodinámico, índice de polidispersidad y potencial zeta de ZnO y Cu-ZnO

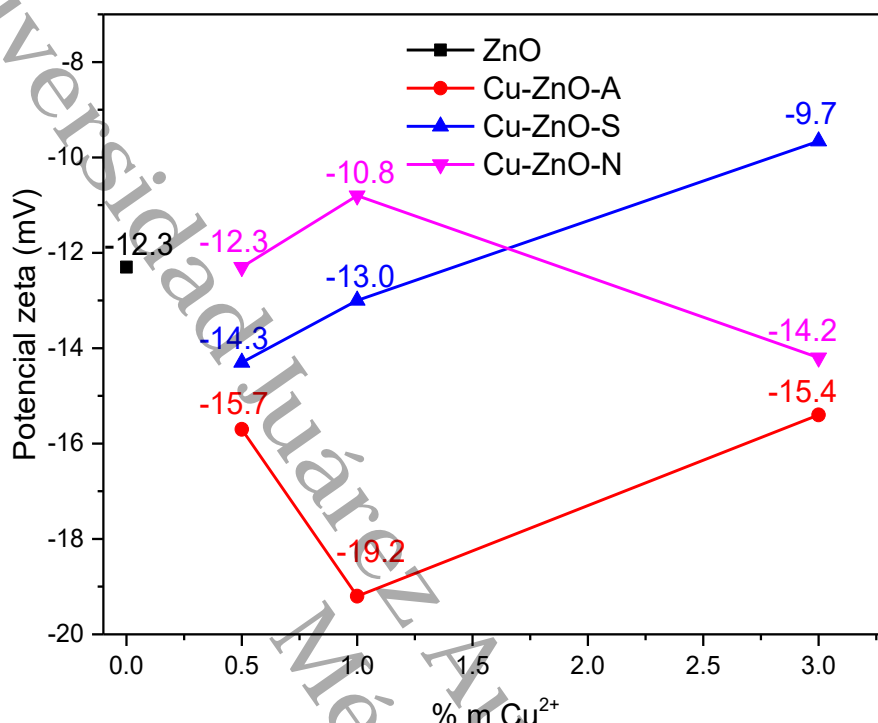
Muestra	Tamaño hidrodinámico (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)
ZnO	228	0.105	-12.3
Cu-ZnO-A-0.5	213	0.130	-15.7
Cu-ZnO-A-1	222	0.126	-19.2
Cu-ZnO-A-3	214	0.141	-15.4
Cu-ZnO-S-0.5	219	0.166	-14.3
Cu-ZnO-S-1	231	0.131	-13.0
Cu-ZnO-S-3	199	0.125	-9.7
Cu-ZnO-N-0.5	250	0.216	-12.3
Cu-ZnO-N-1	217	0.196	-10.8
Cu-ZnO-N-3	198	0.190	-14.2

Por otra parte, la dispersión de luz electroforética (ELS, por sus siglas en inglés), permite obtener el valor del potencial zeta, el cual identifica las cargas superficiales adquiridas por la muestra. Al igual que en el DLS, las nanopartículas se analizan en suspensión, forma que se utiliza para la evaluación microbiológica además de que, al dispersarlas en un medio, se obtiene información sobre la estabilidad del coloide. En la literatura, se suele indicar la relación entre los valores de potencial zeta con su estabilidad: $\pm 0-10$ mV (altamente inestables), $\pm 10-20$ mV (moderadamente estables) y los valores de $\pm 20-30$ mV y ± 30 mV (altamente estables); aunque también indican que dicha clasificación puede no reflejar la realidad de la estabilidad (Bhattacharjee, 2016; Gumustas et al., 2017), además de que los valores absolutos de este parámetro en los cuales una suspensión coloidal es estable, dependen estrechamente de la naturaleza química de las partículas coloidales y del medio dispersante.

En la Figura 33 y en la Tabla 5 se muestran los valores de potencial zeta de los nanomateriales de Cu-ZnO. Todas las muestras presentan valores electronegativos de potencial zeta, siendo la muestra Cu-ZnO-A-1 la que presenta un valor más electronegativo, de -19.2 mV, por lo que se infiere que es el nanomaterial que forma suspensiones más estables.

Figura 33

Valores de potencial zeta de los nanomateriales de ZnO y Cu-ZnO



La aplicación de estas técnicas (DLS y ELS) en la caracterización de nanomateriales de Cu-ZnO mediante métodos asistidos por extractos de plantas ha sido poco explorada en la literatura. En el caso de la dispersión de luz dinámica, Maleki et al. (2021) emplearon un procedimiento solvotermal para obtener nanomateriales de ZnO dopadas con Cu, con nitrato de zinc y acetato de cobre, al 1.5, 2 y 2.5 % de Cu, en un procedimiento exento del empleo de extracto de plantas; los valores de tamaño hidrodinámico que reportaron están en un rango de 150 a 200 nm, con una distribución uniforme de tamaños. En contraste, Nandasana et al. (2024) obtuvieron nanopartículas de ZnO y ZnO dopadas con cobre (Cu@ZnO) al 5%, empleando precursores como el nitrato de zinc y cobre, mediante la adición de *L. frutescens*; en dicho trabajo, reportaron tamaños mayores mediante la técnica de DLS, con 1579 nm para el ZnO y 1345 nm para el Cu@ZnO, con índices de polidispersidad de 0.328 y 0.297, respectivamente. Si bien, el método de síntesis empleado en el presente proyecto guarda mayor similitud con lo reportado por Nandasana et al. (2024), se observa que los tamaños obtenidos (Figura 32) son más cercanos a lo reportado por Maleki et al. (2021), que añadieron menores porcentajes de Cu.

Para el caso de la dispersión de luz electroforética, Khan et al. (2020) reportaron el empleo del extracto de *S. jamaicensis* en la síntesis de nanomateriales de ZnO dopados con Cu,

empleando como precursores nitrato de zinc y cloruro de cobre, al 1 y al 5% de Cu; reportando valores de potencial zeta de 26.63 ± 0.74 mV y 3.66 ± 2.82 mV, respectivamente. Por otro lado, Nandasana et al. (2024), reportaron los valores de potencial zeta de -3.76 mV y -32.92 mV, para los nanomateriales de ZnO y Cu@ZnO. Mientras que Gumustas et al. (2017) mencionan que el valor del potencial zeta se ve influido por diversos factores, entre ellos la composición de la solución, el pH, entre otros.

Sin embargo, con base en los resultados (Figura 33), se puede establecer que no existe una relación directa entre el tipo de precursor o el contenido de cobre añadido. Asimismo, los valores de potencial zeta encontrados sugieren que no hay una correlación evidente entre la carga superficial y el desempeño antimicrobiano de los nanomateriales. Por ejemplo, el ZnO y el Cu-ZnO-N-0.5 presentan el mismo valor de potencial zeta (-12.3 mV), y, sin embargo, ambas muestras exhibieron un comportamiento diferente frente a las bacterias estudiadas, donde el Cu-ZnO-N-0.5 mostró ser más efectivo (con menor MIC) contra ambas bacterias (*S. aureus* y *E. coli*).

Aun así, el potencial zeta es un parámetro relevante, ya que representa la diferencia de potencial en la interfaz entre la superficie de una partícula y el líquido circundante, proporcionando información sobre la repulsión electrostática entre partículas y la carga superficial de los materiales. En este sentido, conocer los valores del potencial zeta de los nanomateriales de ZnO y Cu-ZnO permite inferir la naturaleza de sus posibles interacciones electrostáticas con la membrana bacteriana. Se ha reportado que la superficie de las bacterias presenta una carga negativa, siendo aproximadamente de -19 mV para *S. aureus* y -23.5 mV para *E. coli* (Arakha et al., 2015). La diferencia entre ambas se atribuye a que las bacterias Gram negativas, como la *E. coli*, poseen una capa externa de lipopolisacáridos (LPS) cargados negativamente, la cual está ausente en las bacterias Gram positivas (Ferreya Maillard et al., 2021).

De esta manera, cuando las bacterias entran en contacto con un agente antimicrobiano, las variaciones en el potencial zeta pueden reflejar el tipo de interacción que ocurre en la superficie celular. Según Ferreya Maillard et al. (2021), mencionan que este comportamiento se puede atribuir a dos fenómenos diferentes o a la combinación de estos: la unión del agente cargado a la superficie de la bacteria o a la lesión de la membrana celular. Además, describen que las nanopartículas con carga positiva tienen a neutralizar la carga superficial bacteriana, mientras que las nanopartículas cargadas negativamente inducen un desplazamiento hacia valores de potencial zeta más negativos. En ambos casos, la variación en las cargas superficiales es resultado de la acumulación de las nanopartículas sobre la superficie de la bacteria, considerado como el primer paso para inducir daño bacteriano.

Por su parte, J. Nan et al. (2024) reporta que las nanopartículas de ZnO con carga positiva se adsorben principalmente por interacciones electrostáticas con las superficies bacterianas, las cuales están cargada negativamente, mientras que las nanopartículas de ZnO con carga negativa pueden interactuar mediante mecanismos tipo receptor – ligando, dependiendo de los grupos funcionales presentes en ambas superficies. En este contexto, Arakha et al. (2015) compararon nanopartículas de ZnO con valores de potencial zeta opuestos (12.9 mV y -12.9 mV) frente a distintas cepas de bacterias Gram positivas (*B. subtilis*, *S. aureus*, *B. thuringiensis*) y Gram negativas (*E. coli*, *P. vulgaris*, *S. flexneri*). En el trabajo reportado por Arakha et al. (2015) observaron que las bacterias expuestas a ZnO con carga positiva mostraron una neutralización del potencial superficial, mientras que aquellas bacterias tratadas con ZnO con carga negativa no presentaron cambios significativos. Este comportamiento se reflejó en los ensayos antimicrobianos, donde las nanopartículas de carga positiva mostraron menores MIC, indicando una mayor eficacia antibacteriana que las nanopartículas de ZnO con carga negativa.

En cuanto a nanopartículas cargadas negativamente, Irfan et al. (2022) atribuyen esta carga a la presencia de iones carboxilato, lo cual concuerda con lo observado en el presente trabajo a partir de los resultados de XPS en el análisis del espectro del C 1s y por espectroscopía FTIR. En dicho estudio, obtuvieron nanopartículas de Ag recubiertas superficialmente con ácidos carboxílicos, con un potencial zeta de -35.5 mV. Observaron que, en comparación con las nanopartículas de Ag sin recubrimiento, las nanopartículas con grupos de ácidos carboxílicos en su superficie mostraron un mejor desempeño como agentes antimicrobianos. Además, estas nanopartículas de Ag con carga negativa requirieron una menor concentración para inhibir *S. aureus*, en comparación contra *E. coli*, tendencia que coincide con resultados obtenidos en el presente trabajo.

De manera similar, Ferreyra Maillard et al. (2019), sintetizaron nanopartículas de Ag en presencia de extracto de *Cichorium intybus* L., con potencial zeta de -24 mV, donde evaluaron los cambios en el potencial zeta tanto de las nanopartículas, como de las bacterias (*S. aureus* y *E. coli*), observando un desplazamiento hacia valores más negativos en ambas cepas, junto con una disminución significativa en las unidades formadoras de colonias. Este comportamiento sugiere una correlación entre el potencial zeta y el daño bacteriano, siendo atribuida a la alteración de la envoltura bacteriana por efecto de las nanopartículas.

Por lo tanto, aunque las nanopartículas con carga positiva favorecen una mayor atracción electrostática con las membranas bacterianas, los valores de potencial zeta observados en el presente trabajo (de entre -19.2 y -9.7 mV) indican que también es posible una interacción efectiva con las superficies bacterianas, similar a lo reportado por trabajos previos de

nanopartículas cargadas negativamente (Ferreyra Maillard et al., 2019; Irfan et al., 2022). Además de las interacciones electrostáticas entre las nanopartículas y las bacterias, también debe considerarse que las interacciones están influenciadas por la posible funcionalización superficial de los nanomateriales de ZnO y Cu-ZnO por los restos del extracto de lirio, los cuales podrían contribuir de manera significativa a la actividad antimicrobiana de estos nanomateriales.

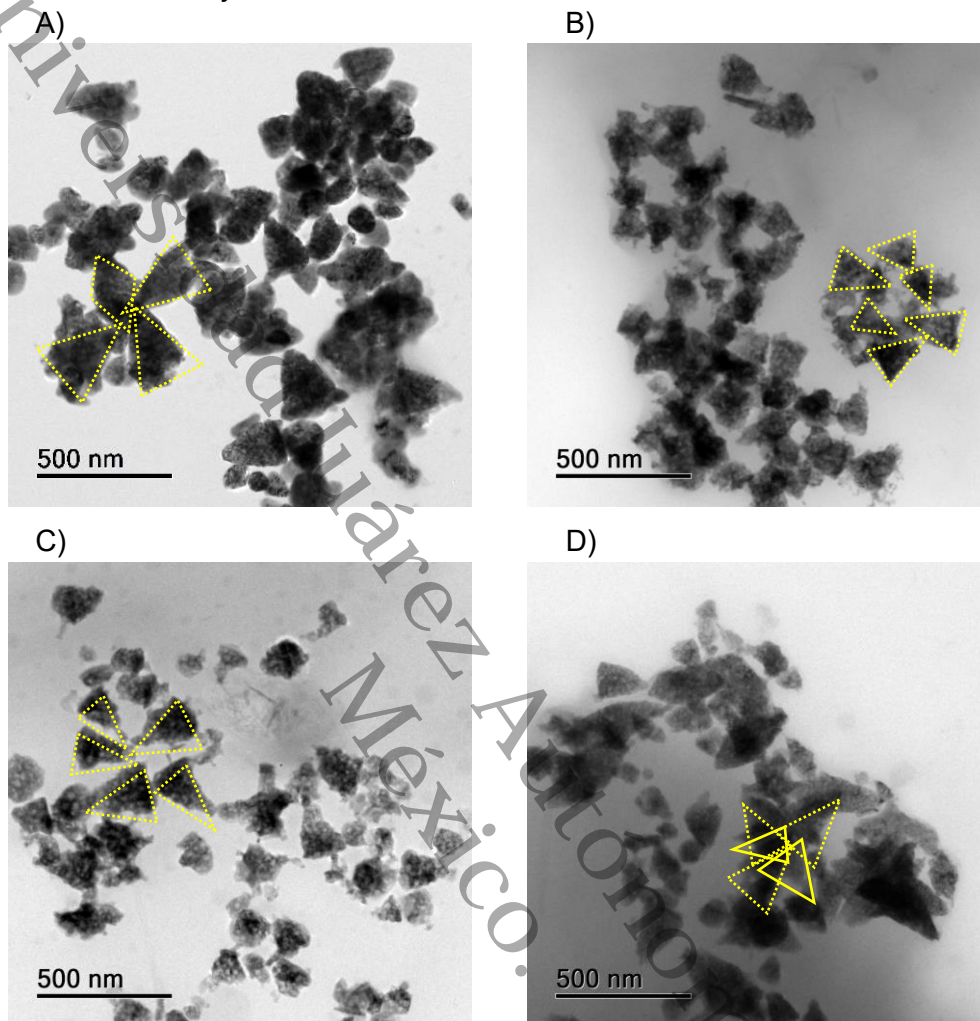
4.3.6. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Se realizó la microscopía electrónica de transmisión (TEM) a los nanomateriales de Cu-ZnO con la mayor actividad antimicrobiana (Cu-ZnO-A-3, Cu-ZnO-S-1 y Cu-ZnO-N-0.5), además del ZnO con fines comparativos.

En la Figura 34 se presentan las micrografías correspondientes a la vista panorámica de los nanomateriales antes mencionados. En todos los nanomateriales se observa una distribución heterogénea de las partículas, con formas mayormente de triángulo. Cada nanomaterial presentó diferentes niveles de aglomeración, en función del tipo de precursor de cobre empleado y del % m de Cu^{2+} incorporado. El ZnO (Figura 34A) presenta partículas con bordes más definidos; se observa que las partículas tienden a agruparse formando agregados tipo racimos, con un patrón parcialmente ordenado, debido a que algunos de los vértices de las partículas triangulares tienden dirigirse hacia un punto común. Por otro lado, los nanomateriales Cu-ZnO-A-3 y Cu-ZnO-S-1 (Figura 34B y 34C) presentan bordes menos definidos, además de que las partículas presentan una distribución más dispersa. En la micrografía del Cu-ZnO-N-0.5 (Figura 34C) se observa la presencia de nanopartículas más alargadas, que tienden a formar racimos de partículas con las bases de los triángulos direccionados al núcleo. Un comportamiento similar fue reportado por Lemecho et al. (2022), quienes sintetizaron nanomateriales de Cu-ZnO, empleando nitrato de zinc, nitrato de cobre y extracto de lirio. En dicho estudio, los resultados de SEM y TEM evidencian la tendencia de las nanopartículas a organizarse en racimos, lo cual coincide con las observaciones encontradas en el presente trabajo.

Figura 34

Micrografías TEM de ZnO y Cu-ZnO. Barra de escala: 500 nm



Nota. Micrografías de los nanomateriales: A) ZnO, B) Cu-ZnO-A-3, C) Cu-ZnO-S-1 y D) Cu-ZnO-N-0.5

La Figura 35 muestra los histogramas de distribución de tamaños de partícula determinados a través del software ImageJ, correspondientes a las micrografías presentadas anteriormente. Los datos se obtuvieron mediante la medición de entre 35 y 50 partículas por muestra. En el caso del ZnO, las partículas presentan una distribución amplia, con tamaños que oscilan desde los 50 a 265 nm. El histograma (Figura 35A) presenta una distribución bimodal, con dos poblaciones predominantes: uno entre 80 y 100 nm, y otro entre 220 y 240 nm. El valor promedio de las partículas del ZnO se sitúa en 133 nm, sin embargo, este valor no es representativo de una población única debido al carácter bimodal de la distribución observada. El Cu-ZnO-A-3 presenta una distribución que se ajusta a una curva gaussiana y presenta la

distribución más estrecha (103 - 192 nm). El histograma del Cu-ZnO-A-3 (Figura 35B) muestra que la mayor concentración de partículas se encuentra en el rango de 120 a 140 nm, ligeramente por debajo del promedio calculado, que fue de 143 nm.

En cuanto a las otras dos muestras analizadas, estas abarcan tamaños entre 88 y 252 nm para el Cu-ZnO-S-1, mientras que para el Cu-ZnO-N-0.5 el intervalo de tamaños fue de 61 y 267 nm. En los histogramas de estas muestras con sulfato y nitrato de cobre (Figura 35 C y 35D), se observa una asimetría hacia la derecha, debido a que las barras situadas a la izquierda del intervalo con mayor concentración de partículas (entre 140 y 160 nm) presentan un conteo mayor de partículas, en comparación con las barras situadas a la derecha; esto indica una mayor proporción de partículas por debajo de la barra central, la cual, en ambos materiales, coincide con el promedio calculado, siendo de 153 nm para el Cu-ZnO-S-1 y 152 nm para el Cu-ZnO-N-0.5.

Los valores promedio de tamaños de partícula obtenidos por TEM resultados menores en comparación con los obtenidos mediante DLS, los cuales se encuentran alrededor de los 200 nm. Esta diferencia se debe a la naturaleza de cada técnica: en TEM se mide directamente el tamaño físico de las nanopartículas en condiciones secas, mientras que en DLS se determina el tamaño hidrodinámico de las nanopartículas dispersas en un medio líquido. Por lo que, en DLS, además del tamaño de la partícula, se incluye la capa de solvatación, y las posibles interacciones entre partículas, como la formación de aglomerados. Además, en el análisis por DLS se asume que las partículas son esféricas, lo cual puede conducir a una sobreestimación del tamaño. En conjunto, estas diferencias entre las técnicas explican por qué los tamaños obtenidos por DLS son mayores a los observados por TEM.

De acuerdo con trabajos previos, los tamaños de partícula reportados para ZnO y Cu-ZnO varían ampliamente en función de las condiciones de síntesis, así como del tipo de material (ZnO o Cu-ZnO). En la mayoría de los estudios, los nanomateriales de Cu-ZnO se obtienen a partir de nitrato de zinc y de cobre como precursores. Por ejemplo, Karthik et al. (2022) emplearon extracto de hojas de *Synadium grantii* y obtuvieron partículas menores a 10 nm, tanto para el ZnO como el Cu-ZnO, con una ligera disminución del tamaño en presencia de Cu. Sin embargo, su metodología corresponde a un proceso tipo combustión asistida por extracto vegetal, sin ajuste de pH y con formación directa de las nanopartículas en un horno precalentado a 500 °C.

Por otro lado, Yousefinia et al. (2023), reportando tamaños de partículas de 20 a 30 nm para el ZnO y de 35 a 50 nm para las muestras de Cu-ZnO, obtenidos mediante una síntesis en dos etapas: (i) la obtención de ZnO por precipitación alcalina en presencia del surfactante dodecylbenzenesulfonate de sodio (SDBS), empleado agente estabilizante para controlar el

crecimiento y la aglomeración, y (ii) el posterior depósito de CuO sobre las nanopartículas de ZnO en presencia del extracto de *Berberis vulgaris*.

De manera similar, Thatikayala & Min (2021) mediante síntesis por biocombustión con extracto de *Ginkgo biloba*, obtuvieron nanomateriales de Cu-ZnO con tamaños de 22 a 26 nm; aunque no especifican los tamaños del ZnO, señalan que las partículas de Cu-ZnO fueron mayores, coincidiendo con lo observado en el presente trabajo. Cabe destacar que los tamaños del nanomaterial Cu-ZnO al 3% de Cu reportados por Lemecho et al. (2022), de entre 91 y 213 nm, son comparables con los obtenidos en el presente trabajo. Esta similitud puede atribuirse a factores en común en ambos estudios, particularmente el uso del extracto de lirio, así como al contenido de cobre añadido.

En conjunto, estos resultados evidencian que el tamaño de partícula no solo depende del dopaje con Cu, sino también de las condiciones de síntesis. Entre estas, el extracto biológico empleado ha sido ampliamente estudiado en la literatura, mientras que el tipo de precursor constituye una variable menos explorada, dado que la mayoría de los trabajos se han limitado al uso de nitrato de zinc y de cobre.

Los parámetros descriptivos del tamaño de partícula (mínimo, máximo, promedio y desviación estándar) de los nanomateriales de ZnO y Cu-ZnO, obtenidos a partir de las mediciones realizadas por TEM, se presentan en la Tabla 6. El ZnO presentó una mayor variabilidad en los tamaños medidos, lo cual coincide con la distribución más amplia observada en su histograma (Figura 35A). En contraste, la muestra Cu-ZnO-A-3, mostró una distribución más estrecha, indicando una mayor uniformidad morfológica respecto al ZnO.

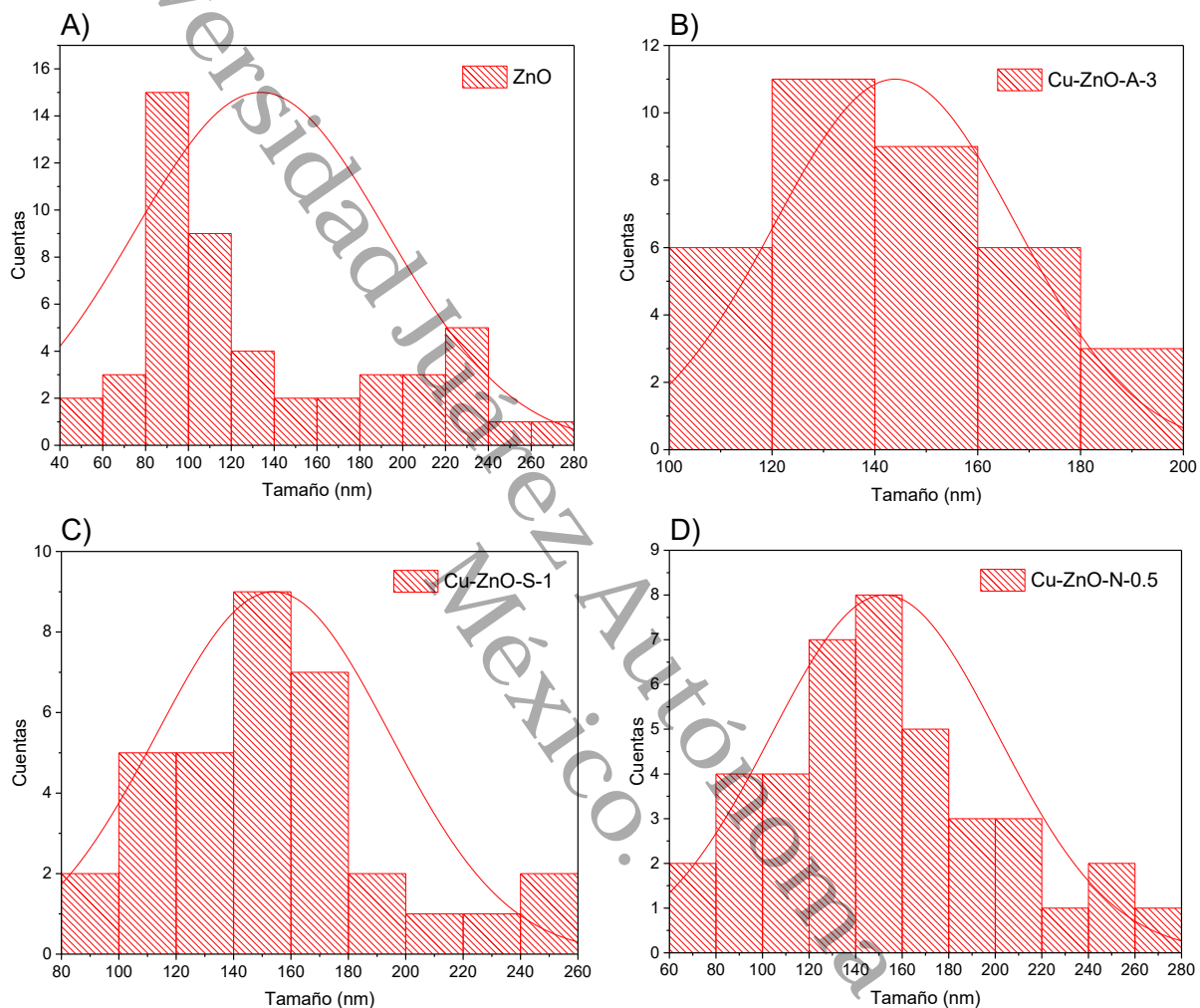
En términos generales, la incorporación de cobre no modificó de forma apreciable el tamaño promedio de partícula; sin embargo, se observó una tendencia hacia distribuciones más homogéneas en los nanomateriales de Cu-ZnO. Este comportamiento podría estar relacionado a variaciones en los procesos de nucleación y crecimiento durante la síntesis, aunque se requieren de estudios cinéticos específicos para confirmar este efecto.

Respecto a la actividad antimicrobiana, aunque se ha reportado que esta suele incrementar con tamaños de partículas más pequeños (Sirelkhatim et al., 2015), en este trabajo se observó que el ZnO, pese a presentar el menor tamaño promedio de partícula, no mostró un desempeño sobresaliente como agente antimicrobiano. En contraste, la muestra Cu-ZnO-A-3 presentó simultáneamente un tamaño promedio bajo y una distribución más homogénea entre los nanomateriales de Cu-ZnO analizados por TEM. No obstante, a partir de los datos obtenidos no es posible establecer una relación directa entre la dispersión del tamaño y la actividad antimicrobiana, por lo que otros factores como la composición y las características superficiales

del material probablemente desempeñen un papel determinante en la respuesta biológica observada.

Figura 35

Histograma de la distribución de los tamaños de partícula de ZnO y Cu-ZnO



Nota. Histogramas de distribución de tamaños de los nanomateriales: A) ZnO, B) Cu-ZnO-A-3, C) Cu-ZnO-S-1 y D) Cu-ZnO-N-0.5

Tabla 6

Parámetros descriptivos del tamaño de partículas los nanomateriales ZnO y Cu-ZnO

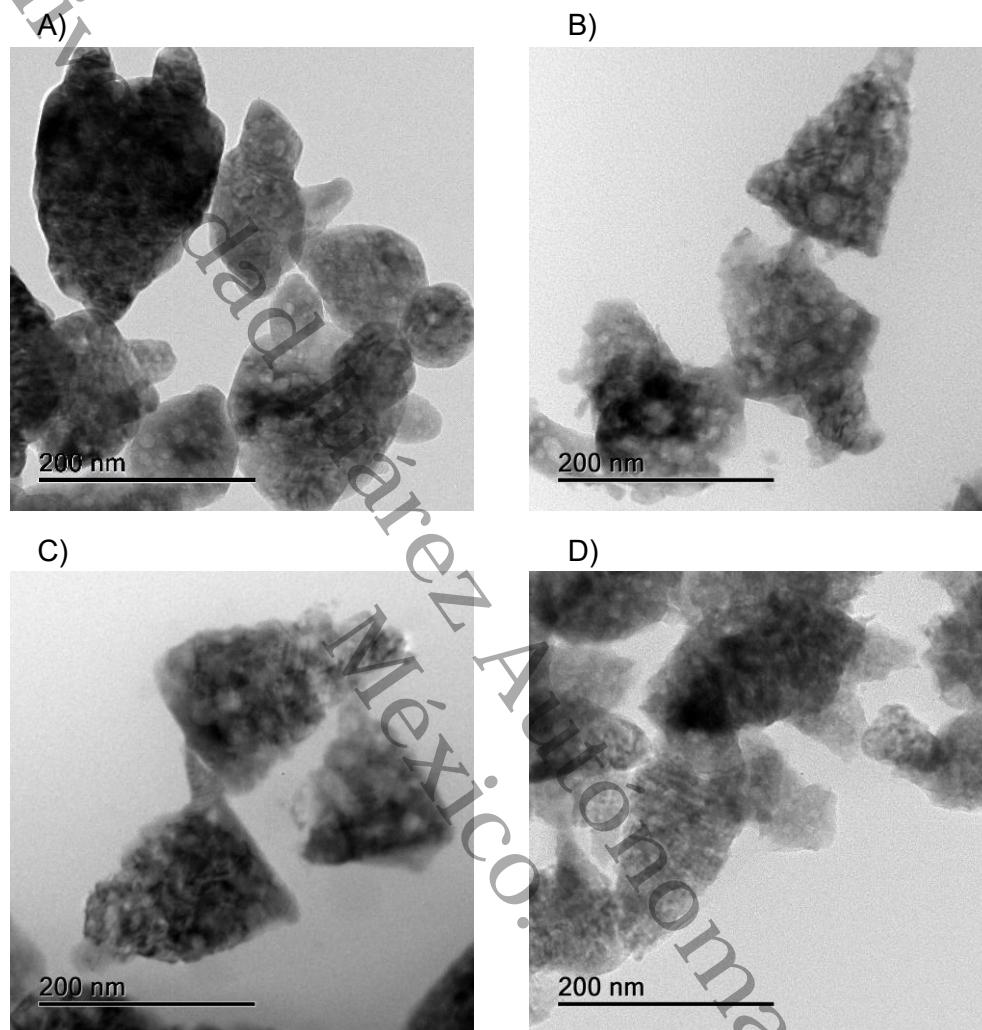
Muestra	Promedio	Mínimo	Máximo	Desviación estándar
ZnO	133.67	50.53	265.35	58.75
Cu-ZnO-A-3	143.95	103.97	192.03	23.54
Cu-ZnO-S-1	153.86	88.90	252.42	40.72
Cu-ZnO-N-0.5	152.41	61.06	267.47	48.89

La Figura 36 presenta micrografías a mayor aumento que las de la Figura 34, permitiendo observar con mayor detalle la morfología y los bordes de las partículas. En el caso del ZnO (Figura 36A), las partículas presentan bordes más definidos, con formas predominantemente de triángulos con lados redondeados, aunque algunas partículas presentan formas de óvalos asimétricos. Las muestras Cu-ZnO-A-3 y Cu-ZnO-S-1 (Figura 36B y 36C) tienen comportamientos morfológicos similares: las partículas presentan formas triangulares con vértices más marcados en comparación con el ZnO, aunque con bordes menos definidos y apariencia menos densa; adicionalmente, ambas muestras la distribución es más dispersa. Por su parte, las partículas del Cu-ZnO-N-0.5 (Figura 36D) presentan una morfología más alargada y un menor contraste en las micrografías, lo que podría estar asociado a un menor espesor aparente en comparación con las muestras previamente descritas.

Gurgur et al. (2020), emplearon acetato de zinc y de cobre, junto con extracto de *Bridelia ferrugínea*, y reportaron que el ZnO obtenido presentaban morfologías de nanobarras y nanolaminas, mientras que en las dopadas con Cu se observaron partículas con bordes redondeados, en algunos casos, con forma esférica. Por otro lado, Lemecho et al. (2022), utilizando extracto de lirio, obtuvieron nanopartículas de morfología ovalada, coexistiendo con partículas esféricas, lo que recuerda a una mezcla de las morfologías observadas en el presente trabajo para ZnO y Cu-ZnO-N-0.5. Asimismo, Yousefinia et al. (2023) describieron partículas esféricas y ligeramente ovaladas para el ZnO, mientras que en Cu-ZnO reportaron morfologías ovaladas o semi esferoidales, con contornos irregulares. Estos autores atribuyeron dichas diferencias a la distinta electronegatividad entre los iones Zn^{2+} y Cu^{2+} , así como a posibles fenómenos de acoplamiento que inducen imperfecciones en los bordes. En conjunto, la evidencia sugiere que la adición de cobre provoca un cambio sutil en la morfología, favoreciendo la formación de partículas más redondeadas y con bordes menos definidos.

Figura 36

Micrografías TEM de ZnO y Cu-ZnO. Barra de escala: 200 nm



Nota. Micrografías de los nanomateriales: A) ZnO, B) Cu-ZnO-A-3, C) Cu-ZnO-S-1 y D) Cu-ZnO-N-0.5

Capítulo 5. Conclusiones Y Perspectivas

5.1. Conclusiones

En el presente trabajo se evaluó la incorporación de cobre en las propiedades electrocinéticas, morfológicas y estructurales de los nanomateriales Cu-ZnO obtenidas por síntesis asistida con extracto de lirio acuático. Además, se evaluó su actividad antimicrobiana contra dos cepas de bacterias.

De manera general, los resultados obtenidos en este trabajo de investigación demuestran que la incorporación de Cu^{2+} en nanopartículas de ZnO sintetizadas en presencia de extracto de lirio acuático incrementa la actividad antibacteriana en comparación de las nanopartículas de ZnO no modificadas, demostrando la hipótesis planteada. Esto puede atribuirse a un efecto colaborativo entre la presencia de Cu^{2+} , y la funcionalización superficial de los nanomateriales, derivado de los residuos orgánicos producto de la descomposición térmica de fitocompuestos del extracto vegetal.

- La caracterización del extracto de lirio acuático permitió identificar qué tipo de compuestos del lirio acuático se incorporan durante la síntesis a los nanomateriales. La determinación del contenido de polifenoles y flavonoides, mostraron mayor contenido de polifenoles que flavonoides en el extracto empleado. Por otro lado, los espectros FTIR del extracto liofilizado y calcinado indican la descomposición térmica de los compuestos orgánicos, así como la pérdida del grupo pirano, procedente de la familia de los flavonoides. El análisis TGA confirma la pérdida de estos compuestos, a las temperaturas de 152, 261 y 439 °C. Esto se relaciona directamente con los restos presentes en los nanomateriales de Cu-ZnO, debido al tratamiento térmico aplicado.
- Los ensayos microbiológicos demostraron que *S. aureus* es más susceptible a los nanomateriales de ZnO y Cu-ZnO, a diferencia *E. coli*. Esto puede ser debido a la estructura superficial de estos microorganismos, posiblemente atribuido a la diferencia en composición de la membrana celular. Asimismo, los ensayos de microdilución indican que los nanomateriales Cu-ZnO requieren menores MIC contra *E. coli*, a diferencia del ZnO; este comportamiento también fue observado para *S. aureus*, en el ensayo realizado con TTC. En este sentido, las muestras Cu-ZnO-A-3 y Cu-ZnO-S-1 presentaron mayor actividad antibacteriana, es decir, la mejor combinación de MIC y MBC, contra *S. aureus*, y *E. coli* respectivamente, exhibiendo un modo de acción bactericida. En cuanto a los nanomateriales

obtenidos con nitrato de cobre, el Cu-ZnO-N-0.5 fue la muestra con un mejor comportamiento contra las dos cepas estudiadas.

- Los grupos funcionales provenientes de los restos del extracto fueron identificados en los espectros FTIR, principalmente en el rango de 2000 a 1000 cm^{-1} . En primera instancia, el ZnO a 70 y 500 $^{\circ}\text{C}$ evidenció la disminución en intensidad de algunas de estas señales relacionadas en la muestra seca, mientras que en la muestra calcinada se observaron señales adicionales, atribuidos a la descomposición de compuestos orgánicos. Las señales por debajo de 600 cm^{-1} son atribuidas a las vibraciones metal oxígeno, con los nanomateriales Cu-ZnO-A-3 y Cu-ZnO-N-0.5 con una superposición de señales en 491 y 428 cm^{-1} , relacionadas con el estiramiento Cu-O.
- Por medio de la espectroscopía XPS se confirmó el estado de oxidación del cobre en los nanomateriales Cu-ZnO, el cual es de 2+; además, se identificaron señales adicionales en el espectro local del Cu en la muestra Cu-ZnO-A-3, las cuales se relacionan con la existencia del CuO. Los porcentajes atómicos corresponden al porcentaje de cobre añadido durante la síntesis de cada una de las muestras, observando que las muestras al 1 %m retienen el porcentaje de cobre más cercano al añadido. Además, la señal en 288 eV indica la presencia de grupos O-C=O en la superficie de los nanomateriales, lo que sugiere que dichos grupos, derivados de los restos del extracto de lirio, funcionalizan la superficie y favorecen su interacción con las membranas bacterianas. Esto se ve respaldado por el hecho de que los nanomateriales con mayores valores C_{288}/C_{286} presentan también un mejor desempeño como agentes antimicrobianos.
- Mediante la Difracción de rayos X se confirmó la fase de wurtzita hexagonal del ZnO, sin picos adicionales relacionados al cobre en las muestras de Cu-ZnO. Los tamaños de cristalitos variaron ligeramente, entre 22 y 26 nm, siendo las muestras al 3 %m de Cu^{2+} las que presentaron los menores valores de tamaño de cristal; este cambio se atribuye a la sustitución del Cu^{+2} en la estructura del ZnO.
- Los valores de tamaño hidrodinámico de los nanomateriales de ZnO y Cu-ZnO, obtenidos por la técnica de DLS, se encuentran entre 198 y 250 nm, siendo las muestras al 3 %m de Cu^{2+} con los precursores de sulfato y nitrato de cobre, los que presentan los valores de tamaño menores, en contraparte con las muestras al 0.5% m de Cu^{2+} . Por otro lado, los valores de potencial zeta, obtenidos mediante la técnica de ELS, se encuentran en el rango de -19.2 a -9.7 mV, por lo cual, las

muestras más electronegativas reflejan comportamientos más estables, es decir, con menos agregación de las nanopartículas. Por tipo de precursor de cobre empleado, las muestras con valores más electronegativos son el Cu-ZnO-A-1, el Cu-ZnO-S-0.5 y el Cu-ZnO-N-3.

- Los tamaños promedio de partículas de los nanomateriales con mayor actividad antibacteriana fueron determinados por TEM. Si bien el ZnO presentó el menor tamaño promedio en comparación con los otros nanomateriales de Cu-ZnO, este parámetro no mostró correlación con la actividad antibacteriana. Por otro lado, la distribución de tamaños sugiere que una mayor uniformidad en el tamaño de las partículas podría favorecer la interacción con la membrana bacteriana.

En conjunto, la evidencia experimental permite concluir que la incorporación de especies de Cu^{2+} en el ZnO y la presencia de fitocompuestos del extracto de lirio, favorecen el incremento de la actividad antibacteriana del ZnO. Sin embargo, aunque el papel que desempeña el precursor empleado de cobre no pudo establecerse con claridad, puede asumirse que el anión de la sal empleada como precursor de cobre tiene un efecto importante en la incorporación del catión, si este es afín al catión del precursor de zinc como es el caso del acetato.

Derivado de las limitaciones del presente trabajo se requiere de estudios adicionales para determinar el efecto del contenido de cobre en la actividad biológica de los nanomateriales obtenidos. Asimismo, es importante realizar un estudio acerca de los posibles mecanismos de interacción entre bacterias y nanopartículas.

5.2.Perspectivas

Derivado de los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, se propone profundizar en los siguientes puntos:

- De acuerdo con el tipo de síntesis empleado en el presente trabajo, se propone evaluar tiempos más prolongados de reacción, particularmente durante en el tiempo de reposo (precipitación) previo a la recuperación por centrifugación del material, con el fin de permitir un mayor tiempo de contacto entre los reactivos y el extracto acuoso de lirio acuático.
- Con base en la caracterización del lirio acuático, emplear temperaturas de calcinación menores a 500°C de los nanomateriales, con el propósito de evitar la pérdida y descomposición de los restos orgánicos, además de evaluar su influencia en la actividad antibacteriana.

- Complementar la caracterización estructural y superficial de los nanomateriales de Cu-ZnO mediante espectroscopía ultravioleta-visible con reflectancia difusa, fisisorción de nitrógeno y mapeo elemental por EDS, este último con el fin de analizar la dispersión del Cu²⁺ en el ZnO.
- Complementar las técnicas de DLS y ELS, mediante la medición de los nanomateriales de Cu-ZnO empleando como dispersante el medio de cultivo TSB, con el fin de evaluar el comportamiento coloidal bajo condiciones más cercanas a las empleadas en los ensayos microbiológicos.
- Estandarizar la adición del extracto acuoso de lirio acuático, mediante el monitoreo por la espectroscopía ultravioleta-visible.
- Implementar un diseño experimental que permita analizar la relación de la polidispersidad de los nanomateriales con su actividad antimicrobiana.
- Realizar estudios dirigidos a esclarecer el mecanismo de acción, incluyendo análisis de interacción nanopartícula-membrana biológica mediante TEM , evaluación de generación de ROS y análisis proteómico.

Capítulo 6. Referencias

- Abebe, B., Gupta, N. K., & Tsegaye, D. (2024). A critical mini-review on doping and heterojunction formation in ZnO-based catalysts. *RSC Advances*, 14(25), 17338–17349. <https://doi.org/10.1039/d4ra02568g>
- Abebe, B., Zereffa, E. A., Tadesse, A., & Murthy, H. C. A. (2020). A Review on Enhancing the Antibacterial Activity of ZnO: Mechanisms and Microscopic Investigation. *Nanoscale Research Letters*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s11671-020-03418-6>
- Adeyemi, J. O., Onwudiwe, D. C., & Oyedeji, A. O. (2022). Biogenic Synthesis of CuO, ZnO, and CuO–ZnO Nanoparticles Using Leaf Extracts of *Dovyalis caffra* and Their Biological Properties. *Molecules*, 27(10). <https://doi.org/10.3390/molecules27103206>
- Akintelu, S. A., Folorunso, A. S., Folorunso, F. A., & Oyebamiji, A. K. (2020). Green synthesis of copper oxide nanoparticles for biomedical application and environmental remediation. *Heliyon*, 6(7). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04508>
- Alberti, A., Granato, D., Nogueira, A., Mafra, L. I., Colman, T. A. D., & Schnitzler, E. (2016). Modelling the thermal decomposition of 3,4,5-trihydroxybenzoic acid using ordinary least square regression. *International Food Research Journal*, 23(1), 30–33.
- Al-Rajhi, A. M. H., Yahya, R., Bakri, M. M., Yahya, R., & Abdelghany, T. M. (2022). In situ green synthesis of Cu-doped ZnO based polymers nanocomposite with studying antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory activities. *Applied Biological Chemistry*, 65(1). <https://doi.org/10.1186/s13765-022-00702-0>
- Antony, A., & Farid, M. (2022). Effect of Temperatures on Polyphenols during Extraction. *Applied Sciences*, 12(4), 2107. <https://doi.org/10.3390/app12042107>
- Arakha, M., Saleem, M., Mallick, B. C., & Jha, S. (2015). The effects of interfacial potential on antimicrobial propensity of ZnO nanoparticle. *Scientific Reports*, 5, 9578. <https://doi.org/10.1038/srep09578>
- Ashok, A., Kumar, A., Bhosale, R. R., Saleh, M. A. H., & Van Den Broeke, L. J. P. (2015). Cellulose assisted combustion synthesis of porous Cu-Ni nanopowders. *RSC Advances*, 5(36), 28703–28712. <https://doi.org/10.1039/c5ra03103f>
- Bakrim, W. B., Ezzariai, A., Karouach, F., Sobeh, M., Kibret, M., Hafidi, M., Kouisni, L., & Yasri, A. (2022). *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms: A Comprehensive Review of Its Chemical Composition, Traditional Use, and Value-Added Products. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 842511. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.842511>
- Bandeira, M., Giovanela, M., Roesch-Ely, M., Devine, D. M., & da Silva Crespo, J. (2020). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles: A review of the synthesis methodology and mechanism

- of formation. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 15, 100223. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100223>
- Baruah, A., Chaudhary, V., Malik, R., & Tomer, V. K. (2019). Nanotechnology Based Solutions for Wastewater Treatment. *En Nanotechnology in Water and Wastewater Treatment: Theory and Applications* (pp. 337–368). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813902-8.00017-4>
- Benassai, E., Del Bubba, M., Ancillotti, C., Colzi, I., Gonnelli, C., Calisi, N., Salvatici, M. C., Casalone, E., & Ristori, S. (2021). Green and cost-effective synthesis of copper nanoparticles by extracts of non-edible and waste plant materials from *Vaccinium* species: Characterization and antimicrobial activity. *Materials Science and Engineering C*, 119, 111453. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111453>
- Berridge, M. V., Herst, P. M., & Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, 11, 127–152. [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(05\)11004-7](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11004-7)
- Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235, 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>
- Bhavyasree, P. G., & Xavier, T. S. (2022). Green synthesised copper and copper oxide based nanomaterials using plant extracts and their application in antimicrobial activity: Review. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 5, 100249. <https://doi.org/10.1016/j.crgsc.2021.100249>
- Bronzato, G. R. F., Ziegler, S. M., Silva, R. C., Cesarino, I., & Leão, A. L. (2017). Characterization of the pre-treated biomass of *Eichhornia crassipes* (water hyacinth) for the second generation ethanol production. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 655(1), 224–235. <https://doi.org/10.1080/15421406.2017.1360696>
- Chakansin, C., Yostaworakul, J., Warin, C., Kulthong, K., & Boonrungsiman, S. (2022). Resazurin rapid screening for antibacterial activities of organic and inorganic nanoparticles: Potential, limitations and precautions. *Analytical Biochemistry*, 637, 114449. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2021.114449>
- Chakraborty, N., Banerjee, J., Chakraborty, P., Banerjee, A., Chanda, S., Ray, K., Acharya, K., & Sarkar, J. (2022). Green synthesis of copper/copper oxide nanoparticles and their applications: a review. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 15(1), 187–215. <https://doi.org/10.1080/17518253.2022.2025916>

- Chung, E., Ren, G., Johnston, I., Matharu, R. K., Ciric, L., Walecka, A., & Cheong, Y. K. (2023). Applied Methods to Assess the Antimicrobial Activity of Metallic-Based Nanoparticles. *Bioengineering*, 10(11), 1259. <https://doi.org/10.3390/bioengineering10111259>
- Comisión Nacional del Agua (CONAGUA), & Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). (2018). Atlas del agua en México 2018. <https://agua.org.mx/biblioteca/atlas-de-agua-en-mexico/>
- Costa, E., Barbosa, J., Nascimento, T., & Macedo, R. (2002). Thermal characterization of the quercetin and rutin flavonoids. *Thermochimica Acta*, 392–393, 79–84. [https://doi.org/10.1016/s0040-6031\(02\)00087-4](https://doi.org/10.1016/s0040-6031(02)00087-4)
- Costa, P., Gomes, A. T. P. C., Braz, M., Pereira, C., & Almeida, A. (2021). Application of the resazurin cell viability assay to monitor *Escherichia Coli* and *Salmonella Typhimurium* inactivation mediated by phages. *Antibiotics*, 10(8), 974. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10080974>
- Dashtizadeh, Z., Jookar Kashi, F., & Ashrafi, M. (2021). Phytosynthesis of copper nanoparticles using *Prunus mahaleb* L. and its biological activity. *Materials Today Communications*, 27, 102456. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2021.102456>
- Dejene, F. B., Ali, A. G., Swart, H. C., Botha, R. J., Roro, K., Coetsee, L., & Biggs, M. M. (2011). Optical properties of ZnO nanoparticles synthesized by varying the sodium hydroxide to zinc acetate molar ratios using a Sol-Gel process. *Central European Journal of Physics*, 9(5), 1321–1326. <https://doi.org/10.2478/s11534-011-0050-3>
- Dikshit, P. K., Kumar, J., Das, A. K., Sadhu, S., Sharma, S., Singh, S., Gupta, P. K., & Kim, B. S. (2021). Green synthesis of metallic nanoparticles: Applications and limitations. *Catalysts*, 11(8), 902. <https://doi.org/10.3390/catal11080902>
- ElGamal, R., Song, C., Rayan, A. M., Liu, C., Al-Rejaie, S., & ElMasry, G. (2023). Thermal Degradation of Bioactive Compounds during Drying Process of Horticultural and Agronomic Products: A Comprehensive Overview. *Agronomy*, 13(6), 1580. <https://doi.org/10.3390/agronomy13061580>
- Faraldos, M., & Goberna, C. (2011). *Técnicas de análisis y caracterización de materiales* (2a ed.). CSIC.
- Ferreira Maillard, A. P. V., Espeche, J. C., Maturana, P., Cutro, A. C., & Hollmann, A. (2021). Zeta potential beyond materials science: Applications to bacterial systems and to the development of novel antimicrobials. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1863(6), 183597. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2021.183597>

- Ferreira Maillard, A. P. V., Gonçalves, S., Santos, N. C., López de Mishima, B. A., Dalmasso, P. R., & Hollmann, A. (2019). Studies on interaction of green silver nanoparticles with whole bacteria by surface characterization techniques. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1861(6), 1086–1092. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.03.011>
- Franco, D., Calabrese, G., Guglielmino, S. P. P., & Conoci, S. (2022). Metal-Based Nanoparticles: Antibacterial Mechanisms and Biomedical Application. *Microorganisms*, 10(9), 1778. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091778>
- Gabrielson, J., Hart, M., Jarelöv, A., Kühn, I., Mckenzie, D., & Möllby, R. (2002). Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. *Journal of Microbiological Methods*, 50(1), 63–73. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(02\)00011-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-7012(02)00011-8)
- Gomes, S. V. F., Portugal, L. A., dos Anjos, J. P., de Jesus, O. N., de Oliveira, E. J., David, J. P., & David, J. M. (2017). Accelerated solvent extraction of phenolic compounds exploiting a Box-Behnken design and quantification of five flavonoids by HPLC-DAD in *Passiflora* species. *Microchemical Journal*, 132, 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.12.021>
- Gumustas, M., Sengel-Turk, C. T., Gumustas, A., Ozkan, S. A., & Uslu, B. (2017). Effect of Polymer-Based Nanoparticles on the Assay of Antimicrobial Drug Delivery Systems. En *Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics* (pp. 67–108). <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-52725-5.00005-8>
- Gurgur, E., Oluyamo, S. S., Adetuyi, A. O., Omotunde, O. I., & Okoronkwo, A. E. (2020). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles and zinc oxide–silver, zinc oxide–copper nanocomposites using *Bridelia ferruginea* as biotemplate. *SN Applied Sciences*, 2(5). <https://doi.org/10.1007/s42452-020-2269-3>
- Haines, P. J. (1995). Thermal Methods of Analysis. En *Thermal Methods of Analysis* (1a ed.). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-011-1324-3>
- Hossain, T. J. (2024). Methods for screening and evaluation of antimicrobial activity: A review of protocols, advantages, and limitations. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 14(2), 97–115. <https://doi.org/10.1556/1886.2024.00035>
- Huang, H., Liu, J., Liu, H., Evrendilek, F., & Buyukada, M. (2020). Pyrolysis of water hyacinth biomass parts: Bioenergy, gas emissions, and by-products using TG-FTIR and Py-GC/MS analyses. *Energy Conversion and Management*, 207. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2020.112552>
- Ibrahim, N. A., Nada, A. A., Hassabo, A. G., Eid, B. M., Noor El-Deen, A. M., & Abou-Zeid, N. Y. (2017). Effect of different capping agents on physicochemical and antimicrobial properties of

- ZnO nanoparticles. *Chemical Papers*, 71(7), 1365–1375. <https://doi.org/10.1007/s11696-017-0132-9>
- Irfan, M. I., Amjad, F., Abbas, A., Ur Rehman, M. F., Kanwal, F., Saeed, M., Ullah, S., & Lu, C. (2022). Novel Carboxylic Acid-Capped Silver Nanoparticles as Antimicrobial and Colorimetric Sensing Agents. *Molecules*, 27(11). <https://doi.org/10.3390/molecules27113363>
- Jaithon, T., Ruangtong, J., T-Thienprasert, J., & T-Thienprasert, N. P. (2022). Effects of Waste-Derived ZnO Nanoparticles against Growth of Plant Pathogenic Bacteria and Epidermoid Carcinoma Cells. *Crystals*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/cryst12060779>
- Javed, R., Zia, M., Naz, S., Aisida, S. O., Ain, N. ul, & Ao, Q. (2020). Role of capping agents in the application of nanoparticles in biomedicine and environmental remediation: recent trends and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00704-4>
- Jayanetti, M., Thambiliyagodage, C., Liyanaarachchi, H., Ekanayake, G., Mendis, A., & Usgodaarachchi, L. (2024). In vitro influence of PEG functionalized ZnO–CuO nanocomposites on bacterial growth. *Scientific Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-52014-6>
- Jayanthi, P., Lalitha, P., & Shubashini, K. S. (2011). Phytochemical investigation of the extracts of *Eichhornia crassipes* and its solvent fractionates. *Journal of Pharmacy Research*, 4(5), 1405–1406.
- Kalaivani, M., & Ravi, S. (2023). Green Synthesis of ZnO NPs and CdO-ZnO Nanocomposites using aqueous Extract of Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) Characterization, Structural and Nano-fertilizer using Application. *Indian Journal Of Science And Technology*, 16(25), 1918–1926. <https://doi.org/10.17485/IJST/v16i25.180>
- Karthik, K. V., Raghu, A. V., Reddy, K. R., Ravishankar, R., Sangeeta, M., Shetti, N. P., & Reddy, C. V. (2022). Green synthesis of Cu-doped ZnO nanoparticles and its application for the photocatalytic degradation of hazardous organic pollutants. *Chemosphere*, 287. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132081>
- Kaur, M., Kumar, V., Singh, J., Datt, J., & Sharma, R. (2022). Effect of Cu-N co-doping on the dielectric properties of ZnO nanoparticles. *Materials Technology*, 37(13), 2644–2658. <https://doi.org/10.1080/10667857.2022.2055909>
- Khalid, A., Ahmad, P., Khan, A., Muhammad, S., Khandaker, M. U., Alam, M. M., Asim, M., Din, I. U., Chaudhary, R. G., Kumar, D., Sharma, R., Faruque, M. R. I., & Emran, T. Bin. (2022). Effect of Cu Doping on ZnO Nanoparticles as a Photocatalyst for the Removal of Organic

- Wastewater. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/9459886>
- Khan, M. M., Harunsani, M. H., Tan, A. L., Hojamberdiev, M., Poi, Y. A., & Ahmad, N. (2020). Antibacterial Studies of ZnO and Cu-Doped ZnO Nanoparticles Synthesized Using Aqueous Leaf Extract of *Stachytarpheta jamaicensis*. *BioNanoScience*, 10(4), 1037–1048. <https://doi.org/10.1007/s12668-020-00775-5>
- Khatir, N. M., & Zak, A. K. (2024). Antibacterial activity and structural properties of gelatin-based sol-gel synthesized Cu-doped ZnO nanoparticles; promising material for biomedical applications. *Heliyon*, 10(17), e37022. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e37022>
- Kiranmayee, M., Rajesh, N., Vidya Vani, M., Khadri, H., Mohammed, A., Chinni, S. V., Ramachawolran, G., Riazunnisa, K., & Moussa, A. Y. (2023). Green synthesis of *Piper nigrum* copper-based nanoparticles: in silico study and ADMET analysis to assess their antioxidant, antibacterial, and cytotoxic effects. *Frontiers in Chemistry*, 11. <https://doi.org/10.3389/fchem.2023.1218588>
- Lalitha, P., Sripathi, S. K., & Jayanthi, P. (2012). Secondary metabolites of *Eichhornia crassipes* (Waterhyacinth): A review (1949 to 2011). *Natural Product Communications*, 7(9), 1249–1256. <https://doi.org/10.1177/1934578x1200700939>
- Latos-Brozio, M., Masek, A., & Piotrowska, M. (2023). Effect of enzymatic polymerization on the thermal stability of flavonoids. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 148(12), 5357–5374. <https://doi.org/10.1007/s10973-023-12089-1>
- Lemecho, B. A., Sabir, F. K., Andoshe, D. M., Gultom, N. S., Kuo, D. H., Chen, X., Mulugeta, E., Desissa, T. D., & Zelekew, O. A. (2022). Biogenic Synthesis of Cu-Doped ZnO Photocatalyst for the Removal of Organic Dye. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/8081494>
- Lin, Z., Han, D., & Li, S. (2012). Study on thermal decomposition of copper(II) acetate monohydrate in air. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 107(2), 471–475. <https://doi.org/10.1007/s10973-011-1454-4>
- López González, R., Gutiérrez, M. H., García, R. L., Gómez Cornelio, S. A., Lobato, C., Gómez-Rivera, A., Quintana Owen, P., & Alvarez Lemus, M. A. (2024). ZnO nanomaterials with enhanced antimicrobial activity obtained by *Eichhornia crassipes* aqueous extract-mediated synthesis. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 99(12). <https://doi.org/10.1002/jctb.7601>
- Maleki, A., Seifi, M., & Marzban, N. (2021). Evaluation of Sonocatalytic and Photocatalytic Processes Efficiency for Degradation of Humic Compounds Using Synthesized Transition-

- Metal-Doped ZnO Nanoparticles in Aqueous Solution. *Journal of Chemistry*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/9938579>
- Mammari, N., Lamouroux, E., Boudier, A., & Duval, R. E. (2022). Current Knowledge on the Oxidative-Stress-Mediated Antimicrobial Properties of Metal-Based Nanoparticles. *Microorganisms*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020437>
- Mistry, B. D. (2009). *A Handbook of spectroscopic data chemistry (UV, IR, PMR, ¹³CNMR and mass spectroscopy)*. Oxford Book Co.
- Mogana, R., Adhikari, A., Tzar, M. N., Ramliza, R., & Wiart, C. (2020). Antibacterial activities of the extracts, fractions and isolated compounds from *Canarium patentinervium* Miq. against bacterial clinical isolates. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12906-020-2837-5>
- Moharram, A. H., Mansour, S. A., Hussein, M. A., & Rashad, M. (2014). Direct precipitation and characterization of ZnO nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/716210>
- Molole, G. J., Gure, A., & Abdissa, N. (2022). Determination of total phenolic content and antioxidant activity of *Commiphora mollis* (Oliv.) Engl. resin. *BMC Chemistry*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s13065-022-00841-x>
- Morales-Mendoza, J. E., Herrera-Pérez, G., Fuentes-Cobas, L., Hermida-Montero, L. A., Pariona, N., & Paraguay-Delgado, F. (2023). Synthesis, structural and optical properties of Cu doped ZnO and CuO–ZnO composite nanoparticles. *Nano-Structures and Nano-Objects*, 34. <https://doi.org/10.1016/j.nanoso.2023.100967>
- Morozov, I. V., Znamenkov, K. O., Korenev, Y. M., & Shlyakhtin, O. A. (2003). Thermal decomposition of $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ at reduced pressures. *Thermochimica Acta*, 403(2), 173–179. [https://doi.org/10.1016/S0040-6031\(03\)00057-1](https://doi.org/10.1016/S0040-6031(03)00057-1)
- Moulder, J. F., Stickle, W. F., Sobol, P. E., & Bomben, K. D. (1992). *Handbook of x-ray photoelectron spectroscopy: a reference book of standard spectra for identification and interpretation of XPS data* (J. Chastain, Ed.). Perkin-Elmer Corporation.
- Mourdikoudis, S., Pallares, R. M., & Thanh, N. T. K. (2018). Characterization techniques for nanoparticles: Comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. *En Nanoscale* (Vol. 10, Número 27, pp. 12871–12934). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c8nr02278j>
- Moussa, S. H., Tayel, A. A., Al-Hassan, A. A., & Farouk, A. (2013). Tetrazolium/Formazan Test as an Efficient Method to Determine Fungal Chitosan Antimicrobial Activity. *Journal of Mycology*, 2013, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2013/753692>

- Mu, J., & Perimutter, D. D. (1981). Thermal Decomposition of Inorganic Sulfates and Their Hydrates. *Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development*, 20, 640–646. <https://doi.org/10.1021/i200015a010>
- Nakamoto, K. (2009). *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds* (6a ed.). John Wiley & Sons.
- Nan, J., Chu, Y., Guo, R., & Chen, P. (2024). Research on the antibacterial properties of nanoscale zinc oxide particles comprehensive review. *Frontiers in Materials*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmats.2024.1449614>
- Nan, R., Liu, S., Zhai, M., Zhu, M., Sun, X., Chen, Y., Pang, Q., & Zhang, J. (2023). Facile Synthesis of Cu-Doped ZnO Nanoparticles for the Enhanced Photocatalytic Disinfection of Bacteria and Fungi. *Molecules*, 28(20). <https://doi.org/10.3390/molecules28207232>
- Nandasana, M., Imboon, T., Layek, R., Dey, A., Pandya, P., Parihar, V. S., Tawre, M. S., Sutar, S., Kumbhakar, P., Pardesi, K., Thongmee, S., & Ghosh, S. (2024). Green synthesis of silver and copper-doped zinc oxide nanoflowers using *Leucophyllum frutescens* leaf extract for photodegradation of methylene blue dye and antibacterial applications. *Environmental Science: Advances*. <https://doi.org/10.1039/d4va00295d>
- NCCLS. (1999). Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents: approved guideline. National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- Ojha, A. (2020). Nanomaterials for removal of waterborne pathogens. En *Waterborne Pathogens: Detection and Treatment* (pp. 385–432). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818783-8.00019-0>
- Oliveira, R. N., Mancini, M. C., de Oliveira, F. C. S., Passos, T. M., Quilty, B., Thiré, R. M. da S. M., & McGuinness, G. B. (2016). FTIR analysis and quantification of phenols and flavonoids of five commercially available plants extracts used in wound healing. *Journal Matéria*, 21(3), 767–779. <https://doi.org/10.1590/S1517-707620160003.0072>
- Ozdal, M., & Gurkok, S. (2022). Recent advances in nanoparticles as antibacterial agent. *ADMET and DMPK*, 10(2), 115–129. <https://doi.org/10.5599/admet.1172>
- Pal, G., Rai, P., & Pandey, A. (2019). Green synthesis of nanoparticles: A greener approach for a cleaner future. En *Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles* (pp. 1–26). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-102579-6.00001-0>
- Palaiogiannis, D., Chatzimitakos, T., Athanasiadis, V., Bozinou, E., Makris, D. P., & Lalas, S. I. (2023). Successive Solvent Extraction of Polyphenols and Flavonoids from *Cistus creticus* L. Leaves. *Oxygen*, 3(3), 274–286. <https://doi.org/10.3390/oxygen3030018>

- Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S., & Vyvyan, J. R. (2009). Introduction to spectroscopy (4a ed.). Brooks/Cole, Cengage Learning.
- Petiti, J., Revel, L., & Divieto, C. (2024). Standard Operating Procedure to Optimize Resazurin-Based Viability Assays. *Biosensors*, 14(4), 156. <https://doi.org/10.3390/bios14040156>
- Pulit-Prociak, J., & Banach, M. (2016). Effect of process parameters on the size and shape of nano- and micrometric zinc oxide. *Acta Chimica Slovenica*, 63(2), 317–322. <https://doi.org/10.17344/acsi.2016.2245>
- Raha, S., & Ahmaruzzaman, M. (2022). ZnO nanostructured materials and their potential applications: progress, challenges and perspectives. *Nanoscale Advances*, 4(8), 1868–1925. <https://doi.org/10.1039/d1na00880c>
- Rahman, A., Tan, A. L., Harunsani, M. H., Ahmad, N., Hojamberdiev, M., & Khan, M. M. (2021). Visible light induced antibacterial and antioxidant studies of ZnO and Cu-doped ZnO fabricated using aqueous leaf extract of *Ziziphus mauritiana* Lam. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(4). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105481>
- Rajesh, K. M., Ajitha, B., Reddy, Y. A. K., Suneetha, Y., & Reddy, P. S. (2018). Assisted green synthesis of copper nanoparticles using *Syzygium aromaticum* bud extract: Physical, optical and antimicrobial properties. *Optik*, 154, 593–600. <https://doi.org/10.1016/j.ijleo.2017.10.074>
- Rampersad, S. N. (2012). Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors*, 12(9), 12347–12360. <https://doi.org/10.3390/s120912347>
- Rashid, M. H., Sujoy, S. I., Rahman, M. S., & Haque, M. J. (2024). Aloe vera assisted green synthesis of Ag and Cu co-doped ZnO nanoparticles and a comprehensive analysis of their structural, morphological, optical, electrical and antibacterial properties. *Heliyon*, 10(3). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e25438>
- Remanan, M. K., & Zhu, F. (2024). Encapsulation of chrysin and rutin using self-assembled nanoparticles of debranched quinoa, maize, and waxy maize starches. *Carbohydrate Polymers*, 337. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2024.122118>
- Rodríguez-Lara, J. W., Cervantes-Ortiz, F., Arámbula-Villa, G., Mariscal-Amaro, L. A., Aguirre-Mancilla, C. L., & Andrio-Enríquez, E. (2022). Water hyacinth (*Eichhornia crassipes*): A review. *Agronomia Mesoamericana*, 33(1). <https://doi.org/10.15517/am.v33i1.44201>
- Roy, K., Ghosh, C. K., & Sarkar, C. K. (2019). Rapid detection of hazardous H₂O₂ by biogenic copper nanoparticles synthesized using *Eichhornia crassipes* extract. *Microsystem Technologies*, 25(5), 1699–1703. <https://doi.org/10.1007/s00542-017-3480-z>

- Sánchez-López, E., Gomes, D., Esteruelas, G., Bonilla, L., Lopez-Machado, A. L., Galindo, R., Cano, A., Espina, M., Ettcheto, M., Camins, A., Silva, A. M., Durazzo, A., Santini, A., Garcia, M. L., & Souto, E. B. (2020). Metal-based nanoparticles as antimicrobial agents: An overview. *Nanomaterials*, 10(2), 292. <https://doi.org/10.3390/nano10020292>
- Sanità, G., Carrese, B., & Lamberti, A. (2020). Nanoparticle Surface Functionalization: How to Improve Biocompatibility and Cellular Internalization. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.587012>
- Sardela, M., Soares, J., Haasch, R., Baker, J., & Guo Wen, J. (2014). *Practical Materials Characterization* (M. Sardela, Ed.). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9281-8>
- Sathishkumar, G., Rajkuberan, C., Manikandan, K., Prabukumar, S., DanielJohn, J., & Sivaramakrishnan, S. (2017). Facile biosynthesis of antimicrobial zinc oxide (ZnO) nanoflakes using leaf extract of *Couroupita guianensis* Aubl. *Materials Letters*, 188, 383–386. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2016.11.100>
- Shahid, S., Zaman, S., Khan, S. A., Shahid, S., Jabin, S., Zaman, S., & Sarwar, M. N. (2018). Synthesis and characterization of un-doped and copperdoped zinc oxide nanoparticles for their optical and antibacterial studies. Article in *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 13(1), 285–297. <https://www.researchgate.net/publication/323664319>
- Sirelkhatim, A., Mahmud, S., Seeni, A., Kaus, N. H. M., Ann, L. C., Bakhori, S. K. M., Hasan, H., & Mohamad, D. (2015). Review on zinc oxide nanoparticles: Antibacterial activity and toxicity mechanism. *Nano-Micro Letters*, 7(3), 219–242. <https://doi.org/10.1007/s40820-015-0040-x>
- Socrates, G. (2001). *Infrared and Raman characteristic group frequencies* (3a ed.). John Wiley & Sons.
- Sonthongphithak, P., Muangnapoh, C., Ratanatawanate, C., E-Kobon, T., Piyasaengthong, A., Hongsachart, P., Sriuttha, M., Sengkhampan, N., Dhanapal, A. C. T. A., & Wittayanarakul, K. (2024). Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles using water hyacinth extracts: Characterization, evaluation of antimicrobial and dye removal. *Journal of Metals, Materials and Minerals*, 34(2). <https://doi.org/10.55713/jmmm.v34i2.1979>
- Stevie, F. A., & Donley, C. L. (2020). Introduction to x-ray photoelectron spectroscopy. *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*, 38(6). <https://doi.org/10.1116/6.0000412>
- Sun, B., Wu, F., Zhang, Q., Chu, X., Wang, Z., Huang, X., Li, J., Yao, C., Zhou, N., & Shen, J. (2021). Insight into the effect of particle size distribution differences on the antibacterial activity of carbon dots. *Journal of Colloid and Interface Science*, 584, 505–519. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.10.015>

- Tharayil, J. M., Chinnaiyan, P., & Sathasivan, A. (2024). Rubia-inspired biogenic synthesis of Cu–ZnO nanocomposites: Dual-modelling of visible light photocatalytic degradation and antibacterial assessment. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 9. <https://doi.org/10.1016/j.crgsc.2024.100435>
- Thatikayala, D., & Min, B. (2021). Ginkgo leaves extract-assisted synthesis of ZnO/CuO nanocrystals for efficient UV-induced photodegradation of organic dyes and antibacterial activity. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 32(13), 17154–17169. <https://doi.org/10.1007/s10854-021-06169-x>
- Thermo Fisher Scientific. (2021a, mayo 3). Zinc X-ray photoelectron spectra, zinc electron configuration, and other elemental information. <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/materials-science/learning-center/periodic-table/transition-metal/zinc.html>
- Thermo Fisher Scientific. (2021b, mayo 17). Carbon. Carbon X-ray photoelectron spectra, carbon electron configuration, and other elemental information. <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/materials-science/learning-center/periodic-table/non-metal/carbon.html>
- Titus, D., James Jebaseelan Samuel, E., & Roopan, S. M. (2019). Nanoparticle characterization techniques. En *Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles* (pp. 303–319). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102579-6.00012-5>
- Torres-López, J. L., Lázaro-Mass, S., De la Rosa-García, S., Alvarez-Lemus, M. A., Gómez-Rivera, A., López-González, R., Lobato-García, C. E., Morales-Mendoza, G., & Gómez-Cornelio, S. (2025). Medicinal Plants Extract for the Bio-Assisted Synthesis of Ag/AgCl Nanoparticles with Antibacterial Activity. *Journal of Cluster Science*, 36(1). <https://doi.org/10.1007/s10876-024-02722-w>
- Vanathi, P., Rajiv, P., Narendhran, S., Rajeshwari, S., Rahman, P. K. S. M., & Venckatesh, R. (2014). Biosynthesis and characterization of phyto mediated zinc oxide nanoparticles: A green chemistry approach. *Materials Letters*, 134, 13–15. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2014.07.029>
- Vasquez, R. P. (1998). Cu₂O by XPS. *Surface Science Spectra*, 5(4), 257–261. <https://doi.org/10.1116/1.1247881>
- Veiga, A., Toledo, M. da G. T., Rossa, L. S., Mengarda, M., Stofella, N. C. F., Oliveira, L. J., Gonçalves, A. G., & Murakami, F. S. (2019). Colorimetric microdilution assay: Validation of a standard method for determination of MIC, IC50%, and IC90% of antimicrobial compounds.

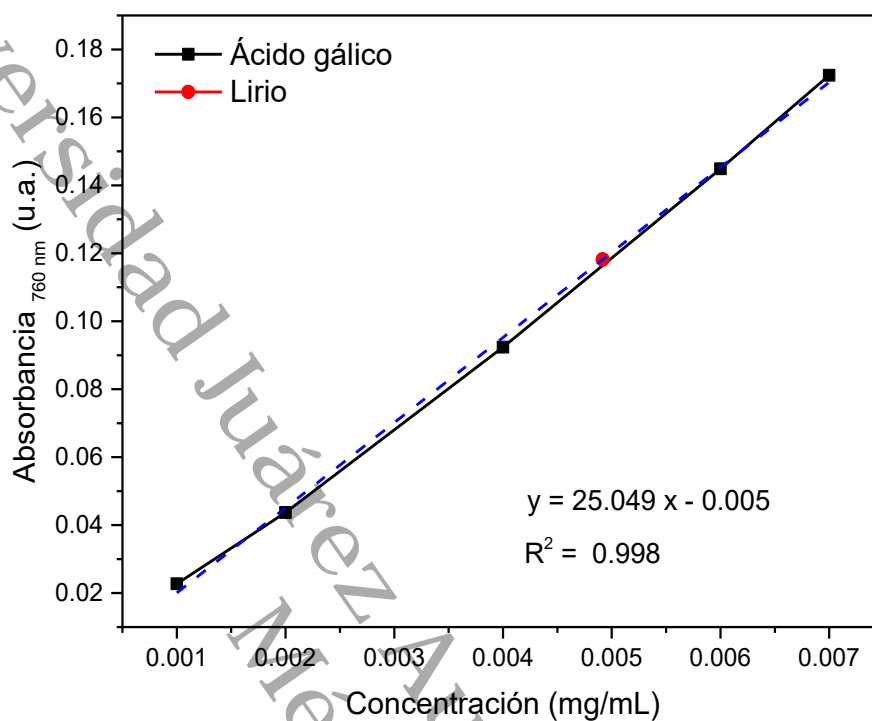
- Journal of Microbiological Methods, 162, 50–61.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.05.003>
- Velázquez-Hernández, M., Schabes-Retchkiman, P., Illescas, J., Macedo, M. G., González-Juárez, J. C., & Martínez-Gallegos, S. (2019). Ag, Zn and Cu nanoparticles synthesized from *Eichhornia crassipes* leaf extracts and their application in phenol photocatalytic degradation. *MRS Advances*, 4(59–60), 3251–3258. <https://doi.org/10.1557/adv.2019.411>
- Villagrán, Z., Anaya-Esparza, L. M., Velázquez-Carriles, C. A., Silva-Jara, J. M., Ruvalcaba-Gómez, J. M., Aurora-Vigo, E. F., Rodríguez-Lafitte, E., Rodríguez-Barajas, N., Balderas-León, I., & Martínez-Esquivias, F. (2024). Plant-Based Extracts as Reducing, Capping, and Stabilizing Agents for the Green Synthesis of Inorganic Nanoparticles. *Resources*, 13(6). <https://doi.org/10.3390/resources13060070>
- Vo, N. T. T., You, S. J., Pham, M. T., & Pham, V. Van. (2023). A green synthesis approach of p-n CuO/ZnO junctions for multifunctional photocatalysis towards the degradation of contaminants. *Environmental Technology and Innovation*, 32. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2023.103285>
- Volf, I., Ignat, I., Neamtu, M., & Popa, V. I. (2014). Thermal stability, antioxidant activity, and photo-oxidation of natural polyphenols. *Chemical Papers*, 68(1), 121–129. <https://doi.org/10.2478/s11696-013-0417-6>
- Wang, L., Hu, C., & Shao, L. (2017). The antimicrobial activity of nanoparticles: Present situation and prospects for the future. *En International Journal of Nanomedicine* (Vol. 12, pp. 1227–1249). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/IJN.S121956>
- Widjaja, E., Chong, H. H., & Tjahjono, M. (2010). Use of thermo-Raman spectroscopy and chemometric analysis to identify dehydration steps of hydrated inorganic samples - Application to copper sulfate pentahydrate. *Journal of Raman Spectroscopy*, 41(2), 181–186. <https://doi.org/10.1002/jrs.2420>
- Wongsa, P., Phatikulrungsun, P., & Prathumthong, S. (2022). FT-IR characteristics, phenolic profiles and inhibitory potential against digestive enzymes of 25 herbal infusions. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10669-z>
- Yadeta Gemachu, L., & Lealem Birhanu, A. (2024). Green synthesis of ZnO, CuO and NiO nanoparticles using Neem leaf extract and comparing their photocatalytic activity under solar irradiation. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 17(1). <https://doi.org/10.1080/17518253.2023.2293841>

- Yang, L. H., Takeuchi, M., Chen, Y., & Ng, N. L. (2021). Characterization of thermal decomposition of oxygenated organic compounds in FIGAERO-CIMS. *Aerosol Science and Technology*, 55(12), 1321–1342. <https://doi.org/10.1080/02786826.2021.1945529>
- Yousefinia, A., Khodadadi, M., & Mortazavi-Derazkola, S. (2023). An efficient biosynthesis of novel ZnO/CuO nanocomposites using berberis vulgaris extract (ZnO/CuO@BVENCs) for enhanced photocatalytic degradation of pollution, antibacterial and antifungal activity. *Environmental Technology and Innovation*, 32. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2023.103340>
- Youssef, I., Sall, S., Dintzer, T., Labidi, S., & Petit, C. (2019). Forward Looking Analysis Approach to Assess Copper Acetate Thermal Decomposition Reaction Mechanism. *American Journal of Analytical Chemistry*, 10(05), 153–170. <https://doi.org/10.4236/ajac.2019.105014>

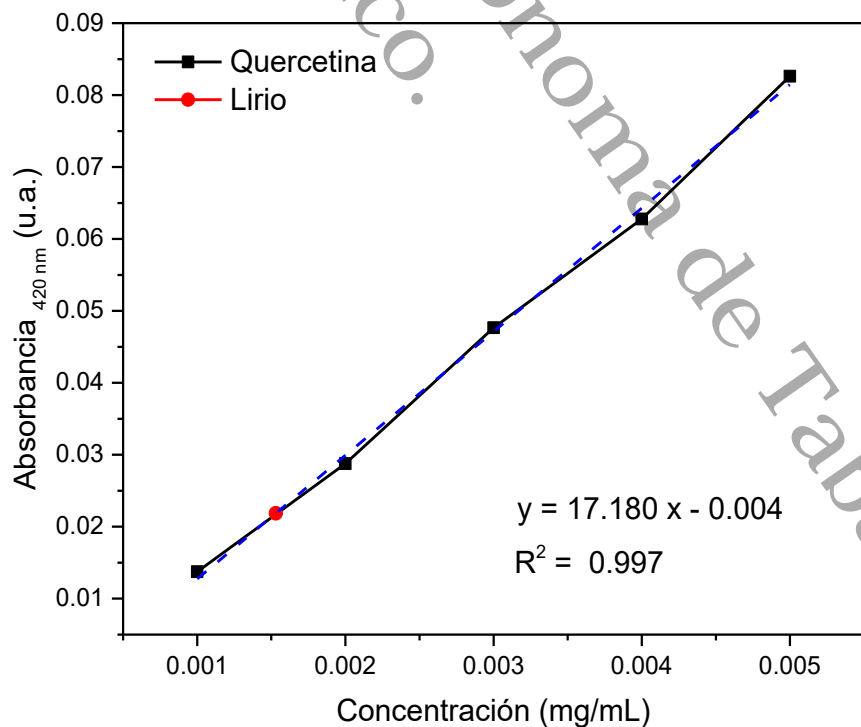
Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

Capítulo 7. Anexos

Anexo 1: Curva de calibración del ácido gálico



Anexo 2: Curva de calibración de la quercetina



Anexo 3: MIC, MBC y modo de acción de ZnO y Cu-ZnO frente a *S. aureus*

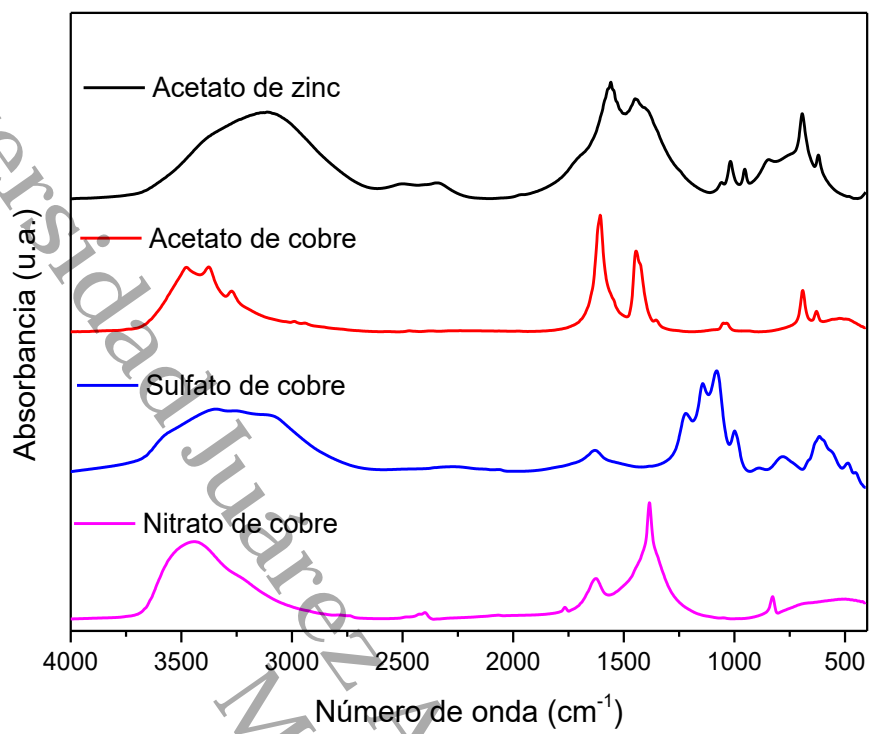
Muestra	MIC, resazurina (mg/mL)	MIC, TTC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	Modo de acción	
				Resazurina	TTC
Cu-ZnO-A-0.5	2.5	2.5	10	Bactericida	Bactericida
Cu-ZnO-A-1	2.5	2.5	10	Bactericida	Bactericida
Cu-ZnO-A-3	2.5	1.25	2.5	Bactericida	Bactericida
Cu-ZnO-S-0.5	2.5	2.5	2.5	Bactericida	Bactericida
Cu-ZnO-S-1	2.5	2.5	10	Bactericida	Bactericida
Cu-ZnO-S-3	2.5	2.5	5	Bactericida	Bactericida
Cu-ZnO-N-0.5	1.25	2.5	5	Bactericida	Bactericida
Cu-ZnO-N-1	2.5	5	10	Bactericida	Bactericida
Cu-ZnO-N-3	2.5	2.5	10	Bactericida	Bactericida
ZnO	2.5	5	10	Bactericida	Bactericida
Extracto de lirio	10	10	10	Bactericida	Bactericida
Control +	0.62	1.25	1.25	Bactericida	Bactericida

Anexo 4: MIC, MBC y modo de acción de ZnO y Cu-ZnO frente a *E. coli*

Muestra	MIC, resazurina (mg/mL)	MIC, TTC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	Modo de acción	
				Resazurina	TTC
Cu-ZnO-A-0.5	5	> 10	> 10	ND	ND
Cu-ZnO-A-1	2.5	> 10	> 10	ND	ND
Cu-ZnO-A-3	2.5	10	> 10	ND	ND
Cu-ZnO-S-0.5	5	10	> 10	ND	ND
Cu-ZnO-S-1	2.5	5	5	Bactericida	Bactericida
Cu-ZnO-S-3	5	10	> 10	ND	ND
Cu-ZnO-N-0.5	5	10	5	Bactericida	Bactericida
Cu-ZnO-N-1	5	10	> 10	ND	ND
Cu-ZnO-N-3	5	10	> 10	ND	ND
ZnO	> 10	> 10	> 10	ND	ND
Extracto de lirio	> 10	> 10	> 10	ND	ND
Control +	2.5	2.5	2.5	Bactericida	Bactericida

Nota: ND: No determinado

Anexo 5: Espectro FTIR de los precursores de zinc y cobre



Anexo 6: Alojamiento de la Tesis en el Repositorio Institucional

Alojamiento de la Tesis en el Repositorio Institucional	
Título de Tesis:	Efecto antimicrobiano de nanomateriales de Cu-ZnO obtenidos por síntesis asistida por extracto de lirio acuático
Autora de la Tesis:	Mirian Hernández Gutiérrez
ORCID:	0009-0007-0057-9402
Resumen de la Tesis:	<p>Con el objetivo de incrementar la actividad antimicrobiana de nanopartículas de ZnO, se sintetizaron y caracterizaron nanopartículas de ZnO modificadas con 0.5, 1 y 3 %m de cobre mediante síntesis bioasistida con extracto acuoso de <i>Eichhornia crassipes</i>. Adicionalmente, se evaluó el efecto del precursor de la sal de cobre comparando acetato, sulfato y nitrato de cobre.</p> <p>Para determinar el efecto del cobre y del extracto en las propiedades del ZnO, los nanomateriales se caracterizaron, mediante las espectroscopías infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y fotoelectrónica de electrones (XPS), análisis termogravimétrico (TGA), difracción de rayos-X (DRX) y dispersión de luz dinámica (DLS) y electroforética (ELS) así como también se determinó su actividad antimicrobiana frente a <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i>. Los nanomateriales de Cu-ZnO mostraron menores concentraciones mínimas inhibitorias que las nanopartículas de ZnO, siendo <i>S. aureus</i> más susceptible que <i>E. coli</i>, con valores de concentración mínima inhibitoria entre 1.25 y 2.5 mg/mL, con efecto bactericida, para los materiales Cu-ZnO-A-3, Cu-ZnO-S-1 y Cu-ZnO-N-0.5.</p> <p>El extracto de lirio acuático se caracterizó, identificándose polifenoles y flavonoides, los cuales tras ser calcinados a 500°C son parcialmente degradados mostrando bandas en el espectro infrarrojo alrededor de 1457 y 1416 cm^{-1} asociadas principalmente a C-O-H, C-H y R-CH=CH₂. Estos resultados confirman las observaciones hechas por FTIR y XPS de los materiales Cu-ZnO, ya que se detectaron rastros de especies carbonáceas en los nanomateriales calcinados, lo cual permite asumir una funcionalización <i>in situ</i> durante la síntesis. La presencia de cobre con</p>

	<p>estado de oxidación +2 se confirmó para todos los materiales obteniéndose porcentajes atómicos en superficie de entre 0.47 y 2.03%. El análisis por DRX reveló la fase wurtzita hexagonal del ZnO, mientras que la dispersión de luz evidenció la carga superficial negativa de los nanomateriales variando entre -19.2 y -9.7 mV. Las partículas con mayor bioactividad, Cu-ZnO-A-3, Cu-ZnO-S-1 y Cu-ZnO-N-0.5, exhibieron morfologías predominantemente triangulares con tamaños promedio de 143.95, 153.86 y 152.41 nm, respectivamente.</p> <p>En conjunto, la incorporación de Cu²⁺ en el ZnO, y los fitocompuestos del extracto de lirio, favorecieron el incremento de la actividad antimicrobiana del ZnO, especialmente frente a <i>S. aureus</i>.</p>
Palabras claves de la Tesis:	Cu-ZnO, <i>Eichhornia crassipes</i> , actividad antimicrobiana
Referencias citadas:	Las referencias citadas están enlistadas en las páginas 83-95.