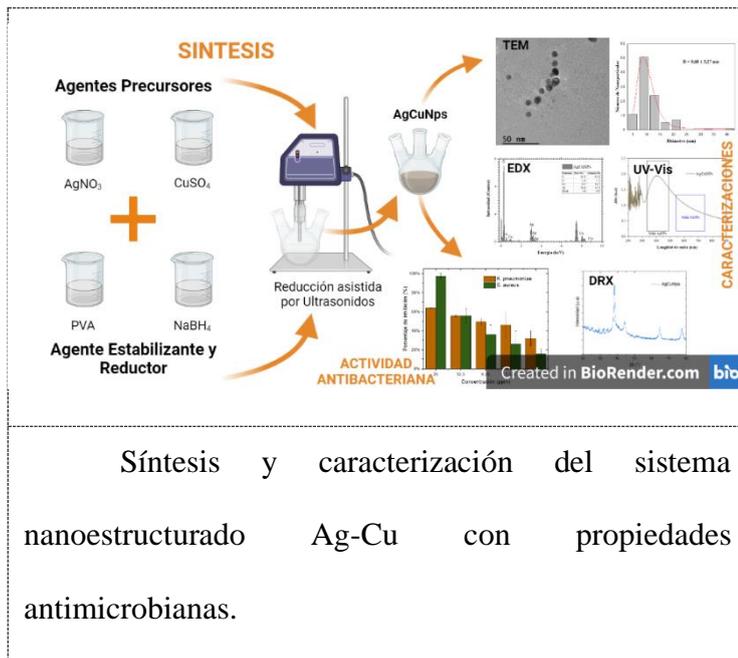


**Síntesis del Sistema Nanoestructurado de Ag-Cu con Propiedades  
 Microbicidas** *Synthesis of Ag-Cu Nanostructured System with Microbicidal  
 Properties*

**Graphical Abstract (GA)**



## Síntesis del Sistema Nanoestructurado de Ag-Cu con Propiedades Microbicidas

### *Synthesis of Ag-Cu Nanostructured System with Microbicidal Properties*

*Cristian Camilo Ramirez Fosca\**

*\* Programa de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Antonio Nariño.*

*Dirigido por: Bact. MEd Angélica Murillo, Dr. Sci. Q. Javier Rincón.*

#### **Resumen**

La creciente ocurrencia de infecciones causadas por patógenos multirresistentes es uno de los problemas de salud más relevantes a nivel mundial, ya que ha hecho saltar las alarmas y generado interés en la comprensión, detección y prevención de la Resistencia a los Antimicrobianos (RAM) a nivel mundial en la búsqueda del desarrollo de medidas adecuadas de higiene y prevención, así como la producción de nuevos agentes antimicrobianos con mayor eficiencia y uso adecuado. Por lo tanto, se han desarrollado nuevas estrategias antimicrobianas, especialmente la investigación que utiliza la nanotecnología para producir agentes microbicidas mediante la aplicación de nanopartículas de metales preciosos y semipreciosos con amplia efectividad, baja toxicidad y actividad antibacteriana, antifúngica y antiviral. La presente investigación desarrolló un sistema nanoestructurado de Ag-Cu en un medio acuoso asistido por irradiación ultrasónica, con un tamaño de partícula promedio de 9,68 nm y una actividad antimicrobiana más significativa que el 95% en la inhibición del crecimiento bacteriano de las cepas modelo Gram-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y en la Gram-negativa *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 1705) una inhibición inferior al 70% cuando se utiliza una concentración de 25 ppm del sistema nanoestructurado producido. El material producido se caracterizó por técnicas analíticas como UV-VIS, DRX, TEM, EDX y SAED.

**Palabras Clave:** Nanopartículas de plata, Nanopartículas de cobre, Ultrasonidos,

## Síntesis del Sistema Nanoestructurado de Ag-Cu con Propiedades Microbicidas

### *Synthesis of Ag-Cu Nanostructured System with Microbicidal Properties*

Antimicrobiano.

#### **Abstract**

The growing occurrence of infections caused by multidrug-resistant pathogens is one of the most relevant health problems worldwide, as it has set off alarms and generated interest in the understanding, detection, and prevention of Antimicrobial Resistance (AMR) worldwide in the search for the development of adequate hygiene and prevention measures, as well as the production of new antimicrobial agents with greater efficiency and their proper use. Therefore, new antimicrobial strategies have been developed, especially research that uses nanotechnology to produce microbicidal agents by applying precious and semiprecious metal nanoparticles with broad effectiveness, low toxicity, and antibacterial, antifungal, and antiviral activity. The present research developed a nanostructured system of Ag-Cu in an aqueous medium assisted by ultrasonic irradiation, with an average particle size of 9.68 nm and an antimicrobial activity more significant than 95% in the inhibition of bacterial growth of the model strains Gram-positive *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and in the Gram-negative *Klebsiella pneumoniae* an inhibition less than 70% when using a concentration of 25 ppm of the nanostructured system produced. The material produced was characterized by analytical techniques such as UV-VIS, DRX, TEM, EDX, and SAED.

**Keywords:** Silver Nanoparticles, Copper Nanoparticles, Ultrasounds, Antimicrobial.

## 1. Introducción.

En el año 2015 la Organización Mundial de la Salud promovió la creación del primer sistema mundial que recopila datos globales oficiales sobre la resistencia a los agentes antimicrobianos denominada GLASS por su sigla en inglés *Global Antimicrobial Resistance and use Surveillance System* (World Health Organization (WHO), 2020). Esta iniciativa nace por la creciente preocupación en torno a las infecciones virales y bacterianas y su resistencia ante los agentes antimicrobianos existentes, lo que representa una de las principales causas de enfermedades y muerte a nivel mundial (Choudhury et al., 2022) por ello en el transcurso de los últimos años se han establecido diferentes mecanismos antimicrobianos para mitigar las infecciones producidas por estos microorganismos (Sharmin et al., 2021).

Sin embargo, la implementación de nuevos agentes antimicrobianos promueve poco a poco la resistencia antimicrobiana (RAM), que es definida por la OMS como un proceso evolutivo normal de los microorganismos, el cual es acelerado por la presión selectiva ejercida por el mal uso generalizado de los distintos antifúngicos, antivirales y antibióticos comúnmente utilizados, permitiendo que éstos patógenos puedan prosperar y producir infecciones mortales, las cuales desencadenarían una emergencia sanitaria global con un mayor impacto en el bienestar humano de las siguientes generaciones (Colson et al., 2021), estimándose así que la RAM puede llegar a generar para el año 2050 aproximadamente 10 millones de muertes anuales en el mundo (O'Neill, 2019).

Con la aparición de la pandemia por la COVID-19 se ha evidenciado a nivel mundial un aumento significativo de infecciones causadas por agentes patógenos multirresistentes (Lai et al., 2021), como consecuencia del empleo inapropiado y excesivo de agentes antimicrobianos en pacientes infectados con el Síndrome Respiratorio Agudo Severo Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), a lo que se suma la prescripción excesiva de antibióticos para contrarrestar la Sintomatología causada por el virus, lo cual ha facilitado la aparición de bacterias resistentes (Martínez Mora, 2021), dando como resultado complicaciones en pacientes con infecciones bacterianas secundarias (Fu et al., 2020). Por

todo esto, las alertas son claras, demandando la comprensión, detección y prevención de RAM como parte de la respuesta a la pandemia mundial por COVID-19 (Organización Panamericana de la Salud, 2022) y al aumento inminente de infecciones por microorganismos multirresistentes (Choudhury et al., 2022).

En Colombia el tema de la resistencia antimicrobiana no es un caso marginal, y ha venido afectando la salud de los colombianos por microorganismos infecciosos y multirresistentes los últimos 20 años, perjudicando así a las regiones de mayor desarrollo económico del país como Santander, Antioquia, Valle del Cauca y Cundinamarca, puesto que son territorios donde se han presentado mayores casos de infecciones por microorganismos multirresistentes (Toro-Alzate, 2021), causados por *Pseudomonas aeruginosa* (Chávez et al., 2020), *Staphylococcus epidermidis* (Castro-Orozco et al., 2019), *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* (Cruz-Vargas et al., 2023; Robledo et al., 2022), entre otros patógenos de importancia clínica.

Lo que significa un motivo importante de preocupación puesto que para el año 2020 la principal causa de muerte en la ciudad de Bogotá con más de 12.000 defunciones fueron las enfermedades infecciosas y parasitarias, las cuales doblaron la segunda causa de muerte, producida por enfermedades isquémicas del corazón con tan solo 5.988 defunciones (SALUD DATA, 2021).

Por ello, la necesidad de combatir y hacerle frente a la RAM es uno de los planes de acción mundial impuestos ante esta crisis de infecciones por patógenos multirresistentes ((OMS), 2016), lo que ha significado para científicos en todo el mundo el reforzar la base científica a través de la investigación, la búsqueda de medidas eficaces de saneamiento, higiene, prevención, uso adecuado de los antimicrobianos y por último el desarrollo de nuevos antimicrobianos eficientes (Lai et al., 2021). Al requerirse nuevas estrategias antimicrobianas, se han desarrollado investigaciones encaminadas al uso de la nanotecnología como una alternativa a la producción de posibles agentes microbicidas (Sharmin et al., 2021), ya que los nanomateriales han demostrado un amplio espectro de actividad antimicrobiana tanto para bacterias Gram positivas como para Gram negativas, al igual

que para hongos, virus, parásitos y protozoos (Spireescu et al., 2021). Debido a esta actividad, se han elaborado partículas nanométricas orgánicas (polímeros, micelas, liposomas) que son utilizadas para la administración eficaz de fármacos y el mejoramiento de la actividad antibacteriana, antifúngica y antiviral de antimicrobianos comunes (Yetisgin et al., 2020).

Aunque el empleo de nanopartículas orgánicas es importante en el tratamiento de varias condiciones severas de salud (Mba & Nweze, 2021), no es suficiente para contrarrestar los efectos a largo plazo de la resistencia a los antimicrobianos, puesto que están diseñados particularmente para la administración de agentes antimicrobianos (Sánchez et al., 2020), y estos agentes suministrados son los mismos a los que poco a poco los microorganismos han logrado desarrollar resistencia, lo que traduce en una opción poco favorable a largo plazo (Ghosh et al., 2019). Por ende, la implementación de nanopartículas inorgánicas como lo son las metálicas es una de las opciones más prometedoras, debido a que estas exhiben diversas actividades contra un espectro amplio de patógenos que poseen resistencia a múltiples fármacos (Mba & Nweze, 2021; Sharmin et al., 2021).

Esta propiedad intrínseca de las nanopartículas metálicas y principalmente las de Cu, Zn, Ag, Au, Ti, Ni, Fe y sus óxidos correspondientes (Atacan et al., 2021), se origina debido a que conservan una gran reactividad por la interacción que poseen con proteínas, lípidos, carbohidratos, y demás biomoléculas que le permiten obtener una extraordinaria actividad antimicrobiana (Kung et al., 2017), esto se debe a su tamaño (1 – 100 nm), morfología, carga superficial y gran relación entre el área superficial y el volumen, lo cual intensifica las propiedades y características que las nanopartículas pueden exhibir en el material a granel (Sharmin et al., 2021; Wan Mat Khalir et al., 2020) . Diversos estudios han determinado que la actividad antimicrobiana de estas nanopartículas se debe a que son tóxicas incluso en bajas concentraciones y tienen un gran potencial para eliminar o disminuir las bacterias resistentes a los antibióticos, mediante la interrupción de síntesis de la membrana celular, la degradación de componentes celulares claves como el ADN y las proteínas por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Makvandi et al., 2020). El efecto de los metales es distinguible entre las bacterias y los mamíferos, debido a la desviación de los sistemas de transporte de metales y

metaloproteínas lo que permite el empleo de algunas nanopartículas como agentes antimicrobianos a largo plazo, sin efectos perjudiciales para los seres humanos (Godoy-Gallardo et al., 2021).

Aunque el uso de nanopartículas se considera actualmente como la próxima generación de antibióticos (Mba & Nweze, 2021), existen limitaciones potenciales para las mismas, entre sus desventajas, se encuentra el bajo rendimiento y estabilidad de la síntesis (Dikshit et al., 2021), la falta de especificidad en la acción antimicrobiana, la generación de mutagénesis y genotoxicidad (Shkodenko et al., 2020). Pero en general, la poca implementación y la falta de estudios son las principales limitaciones de algunas nanopartículas metálicas (Guo et al., 2020). En el caso de las nanopartículas de Plata y Cobre, estas se han convertido en dos de los materiales más estudiados debido a su efectividad, baja toxicidad y actividades tanto bactericidas, antifúngicas así como antivirales, lo cual permite aplicarlos como agentes desinfectantes (Bisht et al., 2022; Kung et al., 2017; Salleh et al., 2020). Por una parte, las nanopartículas de Cu poseen actividad antimicrobiana debido a la capacidad de alternar entre los estados de oxidación  $\text{Cu}^{+1}$  y  $\text{Cu}^{+2}$  lo que produce en gran medida la perturbación de la membrana celular e interrupción de las funciones enzimáticas bacterianas (Mba & Nweze, 2021; Nisar et al., 2019). En cambio, la actividad de las nanopartículas de Plata está asociada principalmente a la liberación rápida de iones  $\text{Ag}^{+}$  y la generación de ROS dentro de la célula bacteriana (Guo et al., 2020; Nisar et al., 2019; Shkodenko et al., 2020). Estas cualidades antimicrobianas exhibidas por cada uno de los materiales descritos se ven complementadas y potencializadas al establecer métodos de síntesis que conduzcan a nuevas nanopartículas bimetalicas, que desarrollen sinergia entre sus componentes incrementando así sus propiedades individuales características (Arora et al., 2020) y generando formas distintas, como agregados de contacto, aleaciones o estructuras *core-shell* (Núcleo-corteza) (G. Sharma et al., 2019).

Para lograr la obtención de estas nanoestructuras complejas se han implementado métodos físicos, que se basan en un enfoque *top-down* (de arriba hacia abajo) a partir del metal a granel, mismo que es fraccionado en partículas más finas de escala nanométrica. Aunque a rasgos generales es una técnica simplista, la misma posee la desventaja de generar diversos tamaños de nanopartículas con

una dispersión amplia y poco enfocada, por lo cual no es la más adecuada para obtener nanopartículas de base bimetálica (Balachandran et al., 2022). Por otro lado, el enfoque *bottom-up* (de abajo hacia arriba) se basa en métodos químicos, en los cuales se utiliza el autoensamblaje molecular a partir de sales metálicas inorgánicas solubles, del cual se obtienen estructuras con tamaños, morfologías y cristalinidad controlable al ajustar parámetros del proceso de síntesis como la temperatura, tiempo, concentración o el empleo de tensoactivantes que estabilizan las dispersiones coloidales, en su mayoría polímeros, que generaran nanopartículas mono dispersas (Loza et al., 2020). Teniendo en cuenta lo anterior, dentro de las metodologías para la síntesis química de partículas nanoestructuradas se encuentra la descomposición térmica o pirolisis, reducción electroquímica o el procesamiento hidrotermal/solvotermal (Arora et al., 2020), técnicas que se caracterizan por alcanzar altas temperaturas y presiones, mismas que afectan la producción de nanopartículas, además de tener tiempos de síntesis mayores a 10 horas (Kumar & Gangawane, 2022).

Como alternativa al empleo de las opciones descritas, se encuentra la implementación del método de reducción química asistida por ultrasonidos, alternativa novedosa para la síntesis de nanopartículas, puesto que, durante la cavitación sónica, se producen micro burbujas, cuya implosión posterior en el seno del disolvente, generan puntos locales con temperaturas extremadamente altas (teóricamente superiores a 3.000 °C) lo que conduce reacciones químicas que de otro modo serían inviables por rutas de síntesis tradicionales (Kumar & Gangawane, 2022). Al implementar el método sonoquímico, se llegan a producir nanomateriales de un tamaño mucho más pequeño de una forma cómoda, rápida y económica obteniendo nanopartículas en tiempos inferiores a los reportados por otros autores (Yazdani-Darki et al., 2021).

Con relación a esto, el presente trabajo de investigación sintetizó a través de una vía húmeda asistida por cavitación ultrasónica, un sistema nanoestructurado de plata-cobre estabilizado con alcohol polivinílico (PVA), composite nanoestructurado que fue caracterizando química y morfológicamente, al cual se le evaluó su acción como agente microbicida, siendo implementado

como modelos biológicos bacterianos las cepas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 1705).

## 2. Materiales y Métodos.

### 2.1. Materiales/Reactivos

Se utilizó Nitrato de Plata  $\text{AgNO}_3$  N° CAS 7761-88-8, alcohol polivinílico PVA (masa molecular entre 30.000 - 70.000 g/mol) con N° CAS 9002-89-5, ambos de la empresa comercial Merck. Borohidruro de Sodio  $\text{NaBH}_4$  con N° CAS 16940-66-2 adquirido de PanReac AppliChem, Sulfato de cobre (II)  $\text{CuSO}_4$  con No. CAS 7758-98-7 de Sigma Aldrich e Hipoclorito de Sodio 7% ( $\text{NaClO}$ ) lote 191911 de marca ChemiLab. Todos los productos químicos utilizados fueron de grado analítico y se emplearon sin purificación adicional. Las disoluciones y suspensiones fueron preparadas en agua ultrapura desionizada Tipo I con una resistividad de 18,2  $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$  para la dilución de los productos químicos durante todo el estudio.

### 2.2. Síntesis.

En la síntesis de nanopartículas por vía húmeda asistida por irradiación ultrasónica (Fig. 1), se implementó un sonicador UP400St al 60% de la amplitud (A) máxima (100  $\mu\text{m}$ ) y pulsación del ciclo (C) del 90% con una punta de 22 mm de diámetro (Sonotrodo H22L2D) que posee una potencia acústica de 85  $\text{W}/\text{cm}^2$ .



*Figura 1.* Fotografía del montaje para la síntesis de nanopartículas por vía húmeda asistida por irradiación ultrasónica.

### **2.2.1. Nanopartículas de Plata (AgNPs).**

Para la síntesis de AgNPs (Fig. 2) se prepara una disolución de 100 mL de  $\text{AgNO}_3$  (0,93 mM), la cual es adicionada gota a gota a un flujo de 20 mL/min con ayuda de una bomba peristáltica BT101F durante 5 minutos a una disolución de 100 mL constituida por  $\text{NaBH}_4$  (1,85 mM) mezclado con PVA (1,85 mM). Cada disolución fue homogenizada durante 3 min a 20 kHz con un equipo Elmasonic S30H antes de iniciar la síntesis asistida por cavitación ultrasónica, empleando un sonicador UP400St.

### **2.2.2. Nanopartículas de Cobre (CuNPs).**

La síntesis de CuNPs (Fig. 2) se llevó a cabo a partir de una disolución de 100 mL de  $\text{CuSO}_4$  (1,57 mM) la cual es adicionada gota a gota con un flujo de 20 mL/min con ayuda de una bomba peristáltica BT101F durante 5 minutos a una disolución de 100 mL constituida de  $\text{NaBH}_4$  (3,15 mM) mezclado con PVA (3,15 mM). Cada disolución fue homogenizada durante 3 min a 20 kHz con un

equipo Elmasonic S30H antes de iniciar la síntesis asistida por cavitación ultrasónica, empleando un sonicador UP400St.

### 2.2.3. Sistema Nanoestructurado Ag-Cu (AgCuNPs).

Para la síntesis de Ag-CuNPs (Fig. 2) se prepara una disolución de 100 mL de  $\text{AgNO}_3$  (0,580 mM) mezclada con  $\text{CuSO}_4$  (0,580 mM) la cual es adicionada gota a gota con un flujo de 20 mL/min con ayuda de una bomba peristáltica BT101F durante 5 minutos a una disolución de 100 mL constituida de  $\text{NaBH}_4$  (2,34 mM) mezclado con PVA (2,34 mM). Cada disolución fue homogenizada durante 3 min a 20 kHz con un equipo Elmasonic S30H antes de iniciar la síntesis asistida por cavitación ultrasónica, empleando un sonicador UP400St.

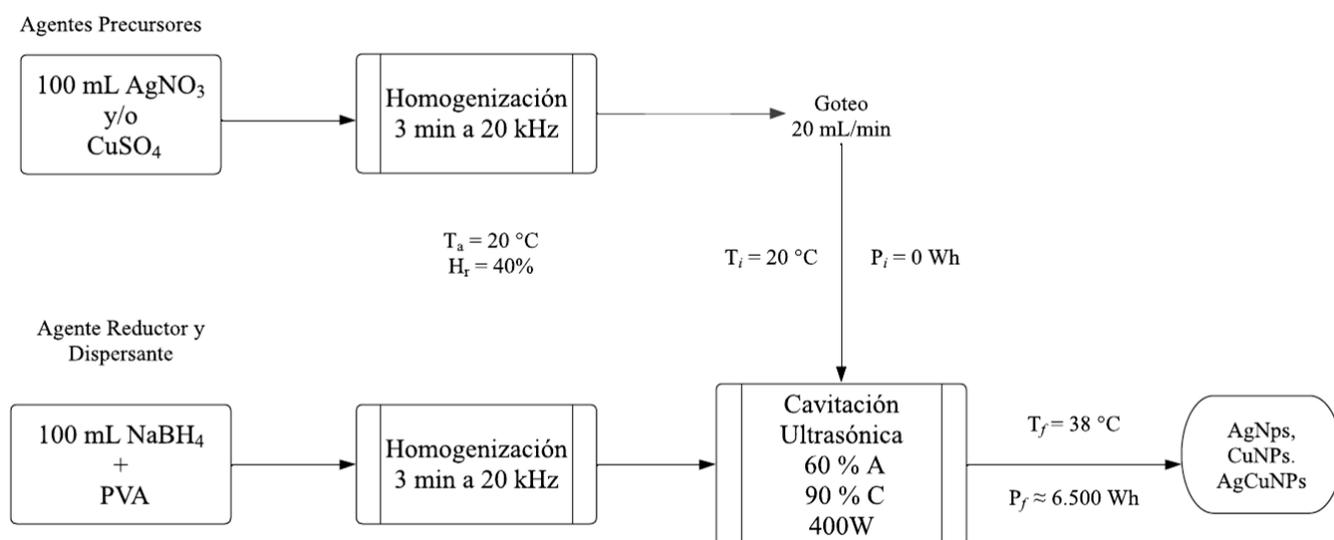


Figura 2. Diagrama de flujo para síntesis de AgNPs, CuNPs y AgCuNPs. Temperatura Ambiente ( $T_a$ ), Humedad Relativa ( $H_r$ ), Temperatura Inicial ( $T_i$ ), Potencia Final ( $P_i$ ), Temperatura Final ( $T_f$ ) y Potencia Final ( $P_f$ )

## 2.3. Caracterización

### 2.3.1. Espectrofotometría UV-Visible.

Una vez producidas las Nanopartículas, se observó su espectro UV-VIS con ayuda del espectrofotómetro Spectroquant® Prove 600. Obteniendo un barrido espectral completo en el rango de 200 a 900 nm con un Tamaño de paso de 1 nm.

### 2.3.2. Difracción de Rayos X (DRX)

La cristalinidad de los compuestos fue estudiada mediante la técnica de Difracción de Rayos X (DRX) empleando un equipo Malvern-PANalytical Modelo Empyrean 2012, con fuente de Cu ( $\lambda=1.541 \text{ \AA}$ ) a 45 kV y 40 mA y detector Pixel 3D; además con configuración de plataforma: Spinner girando a 4 rpm y Goniómetro: Omega/2 theta. El paso fue de  $0,05^\circ$  y un tiempo por paso de 50 s.

### 2.3.3. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

Las nanopartículas sintetizadas fueron analizadas en un Microscopio Electrónico de Transmisión Tecnai F20 Super Twin TMP de FEI operado a 200 kV para obtener imágenes a 145kx sobre una rejilla TEM para AgNPs de C/Cu de encaje, para CuNPs y AgCuNPs de C/Ni de encaje.

## 2.4. Actividad Antimicrobiana

### 2.4.1. Pruebas de susceptibilidad bacteriana Kirby Bauer

El experimento consiste en probar las nanopartículas sintetizadas contra las cepas bacterianas potencialmente patógenas para los seres humanos, como lo es la cepa Gram positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y Gram negativa *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 1705). La bacteria fue incubada Por 18 a 24 horas a  $37^\circ\text{C}$  en placas de agar nutritivo y luego, las colonias aisladas se utilizaron para preparar inóculos en suspensión equivalentes al estándar de turbidez McFarland N° 5 ( $1,5 \times 10^8$  UFC).

Para la prueba se emplearon discos de papel filtro de 6 mm, de los cuales se sumergieron 10 unidades en 5 ml de cada una de las disoluciones de AgNPs, CuNPs y Ag-CuNPs por separado. Una vez impregnados, fueron secados a  $100^\circ\text{C}$  para así obtener discos con la carga de nanopartículas deseada. La siembra del cultivo bacteriano se realizó de forma masiva con un hisopo embebido del inóculo bacteriano en un agar Müller Hinton (MHA). Se procedió a colocar de manera equidistante cada disco cargado por duplicado en el cultivo y por último fue llevado a incubación durante 24 horas a una temperatura de  $37^\circ\text{C}$ .

#### **2.4.2. Método de Microdilución en caldo.**

La actividad antimicrobiana se determinó utilizando el método estándar de microdilución en caldo en la cepa Gram positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y Gram negativa *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 1705). El ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos con un volumen final para cada pocillo de 100  $\mu\text{L}$ . Se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de nanopartículas a 50 ppm ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y se diluyó en factor 1:2 utilizando Caldo Müller Hinton (MHB), adicionando 50  $\mu\text{L}$  de inóculo bacteriano ajustado a  $1,0 \times 10^6$  UFC. Se realizaron controles de esterilidad, crecimiento y muerte con el antimicrobiano Hipoclorito de Sodio ( $\text{NaClO}$  7%). Finalmente, se incubó a 37 °C durante 18 horas con agitación constante a 100 rpm. La placa de 96 pocillos fue leída a una longitud de onda de 620 nm en un lector de placa FC Multiskan TM.

#### **2.5. Análisis estadístico**

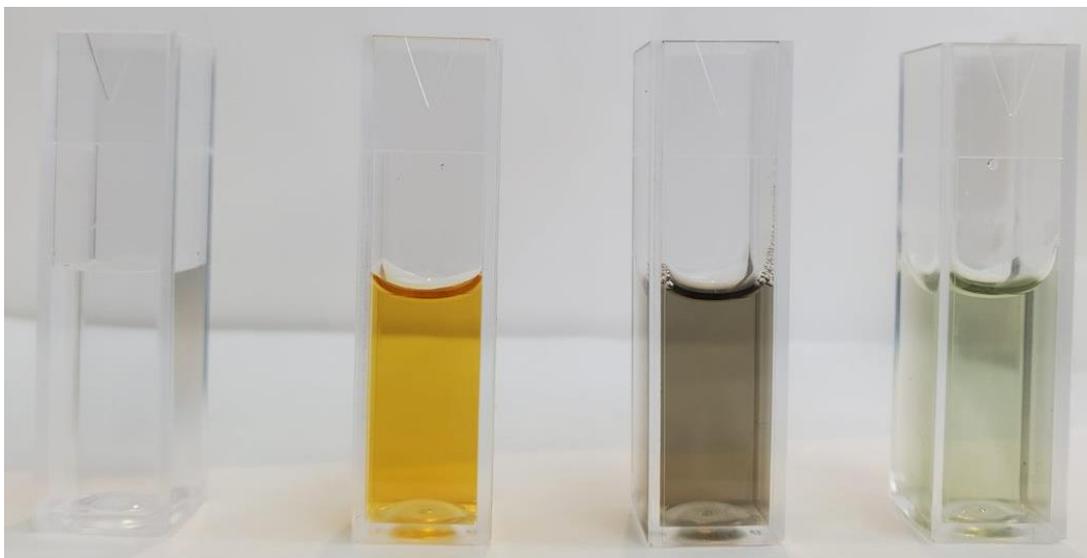
El procesamiento digital de imagen TEM se realizó mediante el software ImageJ, donde se obtuvieron los diámetros de 100 nanopartículas y se elaboró una distribución de tamaños con el uso del software de gráficos y análisis de datos OriginPro mediante un ajuste LogNormal, para obtener el tamaño medio y dispersión estándar de las nanopartículas. Además, la medición del diámetro de zona de inhibición para las pruebas Kirby bauer fueron determinados mediante análisis de imagen por ImageJ.

### **3. Resultados y Discusión.**

#### **3.1. Síntesis de AgNPs, CuNPs y AgCuNPs**

A medida que transcurre la adición controlada del agente precursor a la disolución del agente reductor con estabilizante, se observa un cambio de color que se intensifica al final del proceso. Las disoluciones empleadas al inicio de la síntesis no poseen un color característico siendo estas translúcidas y su cambio de color depende de la naturaleza de las nanopartículas obtenidas, es decir,

al finalizar la síntesis como se observa en la Fig. 3, las AgNPs poseen un color amarillo naranja oscuro (Alhajj et al., 2023; John et al., 2022), CuNPs se visualiza como verde esmeralda (Alhajj et al., 2023; Markin & Markina, 2019) y para AgCuNPs un marrón grisáceo (Ahmad et al., 2022), estos colores son coincidentes con los reportados en la literatura. Este fenómeno es catalogado por diversos autores como un factor cualitativo determinante para indicar la formación de estructuras nanométricas, del cual dependiendo de su intensidad, tonalidad y coloración de la muestra será característico del tamaño, concentración, morfología y composición de las nanopartículas resultantes (John et al., 2022).



*Figura 3.* Fotografía del color característicos de la disolución de  $\text{AgNO}_3$  y  $\text{CuNO}_4$  (a), color producto de la síntesis de suspensiones de AgNPs (b), CuNps (c) y AgCuNPs (d).

Para comprobar analíticamente la obtención de nanopartículas por síntesis de vía húmeda asistida por irradiación ultrasónica se realizan las siguientes caracterizaciones.

## 3.2. Caracterización

### 3.2.1. Espectrofotometría UV-Visible.

El espectro UV-Vis representa las señales de Resonancia de Plasmon Superficial (SPR) que exhiben nanopartículas de Plata y Cobre, del cual la posición del pico máximo de señal dependerá

del tamaño, forma y estado de agregación de la partícula (Sobi et al., 2022). En la Fig. 4 se observan los espectros de las partículas sintetizadas, donde se evidencia el rango característico de SRP para AgNPs (Recuadro Negro) que se encuentra entre los 380 y 430 nm (Bhiradi & Hiremath, 2022), mientras que las CuNPs (Recuadro Azul) exhiben esta señal en el rango de 570 a 675 nm (Markin & Markina, 2019). El pico característico de las AgNPs sintetizadas se encuentra en  $\lambda = 395$  nm, señal que hace referencia a la presencia de nanopartículas esféricas y ovaladas (Sobi et al., 2022). Las CuNPs poseen señal máxima en  $\lambda = 585$ , lo que concuerda con los rangos dispuestos en la literatura para nanopartículas esféricas de cobre dispersadas con PVA (Li et al., 2018), al igual para AgCuNPs se exhibe la señal de AgNPs ligeramente desplazada en  $\lambda = 398$  nm y ampliada a tal punto de sobreponerse con la señal de CuNPs formando un ensanchamiento de esta por la mezcla de ambos metales en las partículas, estableciendo así la formación de nanopartículas bimetálicas (Li et al., 2018).

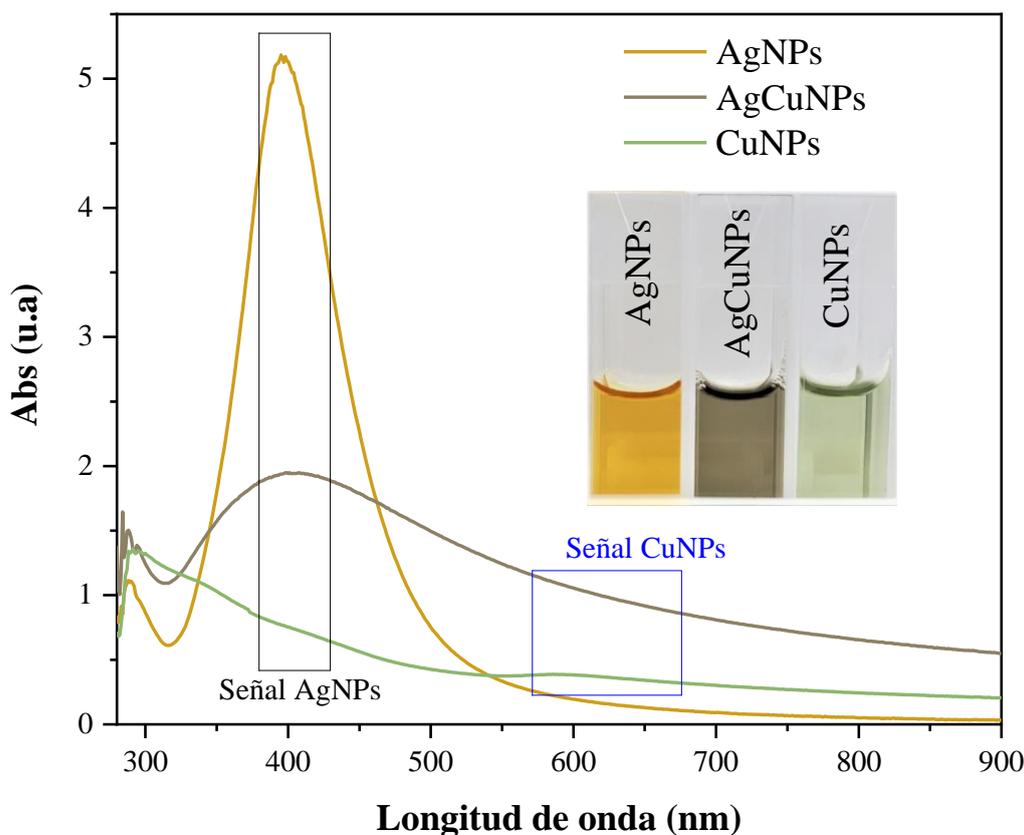


Figura 4. Espectro UV-Vis del producto de la síntesis de AgNPs, CuNps y AgCuNPs.

### 3.2.2. Difracción de Rayos X (DRX).

Se utilizó el análisis de difracción de rayos X para estudiar las nanopartículas sintetizadas en polvo en cuanto a composición, tamaño y estructura cristalina. La Fig. 5 establece las señales de difracción para AgNPs, CuNPs y AgCuNPs además de los patrones de difracción de las tarjetas cristalográficas para Ag, Cu y AgCu. Para la muestra de Ag monometálica (AgNPs), los picos de difracción obtenidos tienen los valores de  $2\theta$  en  $38,11^\circ$ ,  $44,28^\circ$ ,  $64,43^\circ$  y  $77,37^\circ$  que coinciden respectivamente con los planos de red (111), (200), (220) y (311) del patrón de difracción para Ag metálico (COD 901-1607) característicos de una estructura cristalina cubica centrada en las caras (FCC) (Oliveira et al., 2022). Además, el espectro posee un pico adicional en  $29,40^\circ$  que hace referencia a la señal más aguda de la tarjeta COD 900-7562 correspondiente a Nitrato (NaNO<sub>3</sub>) el cual es un producto de la reducción entre AgNO<sub>3</sub> y NaBH<sub>4</sub> (Badiah et al., 2019).

Al realizar la indexación de los picos para la muestra de CuNPs se encontró que estas reflexiones del patrón DRX hacen referencia a la formación de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Tarjeta cristalográfica COD 101-0523) en lugar de Cu metálico (Tarjeta cristalográfica COD 410-5040) y aunque este sulfato es un subproducto de la formación de Cu por reducción del CuSO<sub>4</sub> con el NaBH<sub>4</sub> (Markin & Markina, 2019), no se evidencian directamente picos característicos de Cu ni sus óxidos correspondientes, lo que significa que el Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> predominó en la muestra fomentando así un apantallamiento de la señal de Cu en el DRX al distribuirse el mismo por toda la matriz salina de gran tamaño del sulfato de sodio (Wong-Pinto et al., 2021), adicionalmente por la presencia de esta sal en la muestra analizada puede intuirse la formación de Cu ya que es un producto de la síntesis por reducción química.

El difractograma para las nanopartículas bimetálicas (AgCuNPs) exhiben señales de difracción en los valores  $2\theta$  en  $38,11^\circ$ ,  $44,23^\circ$ ,  $64,46^\circ$  y  $77,34^\circ$  los cuales son coincidentes con los índices de Miller (111), (200), (220) y (311) del patrón de difracción Ag<sub>97</sub>Cu<sub>3</sub> (COD 150-9854) que hace referencia a una estructura cristalina FCC. Adicionalmente, debido a la presencia de señales para una única fase cristalina, se confirma la formación de una aleación entre Ag-Cu (Thakore et al., 2019) y al no mostrar ninguna reflexión de Cu en el difractograma de AgCuNPs demuestra la incorporación homogénea de átomos de Cu en el marco de red cristalina de Ag (D. Sharma et al., 2021).

Adicionalmente, aunque prevalecen átomos de Ag en la composición cristalográfica perteneciente a  $\text{Ag}_{97}\text{Cu}_3$ , estos resultados concuerdan a los patrones obtenidos por otros investigadores cuando la relación molar de Ag y Cu es 1:1 (Dou et al., 2019; Shang et al., 2018; Thakore et al., 2019).

Adicionalmente a lo expuesto con las señales establecidas de AgNPs y AgCuNPs se determinó el tamaño promedio y desviación estándar del cristalito haciendo uso de la ecuación de Scherrer con cada una de las reflexiones características de Ag y AgCu, obteniendo así un tamaño de  $12,95 \pm 2,78$  nm para AgNPs y  $13,30 \pm 3,07$  nm para AgCuNPs. Cabe mencionar nuevamente que las señales características de Cu no fueron observadas en el patrón de difracción para CuNPs, por ende, no fue posible determinar el tamaño del cristalito para las mismas, pero se estableció que el tamaño del cristalito para  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  es en promedio de  $23.41 \pm 1,86$  nm.

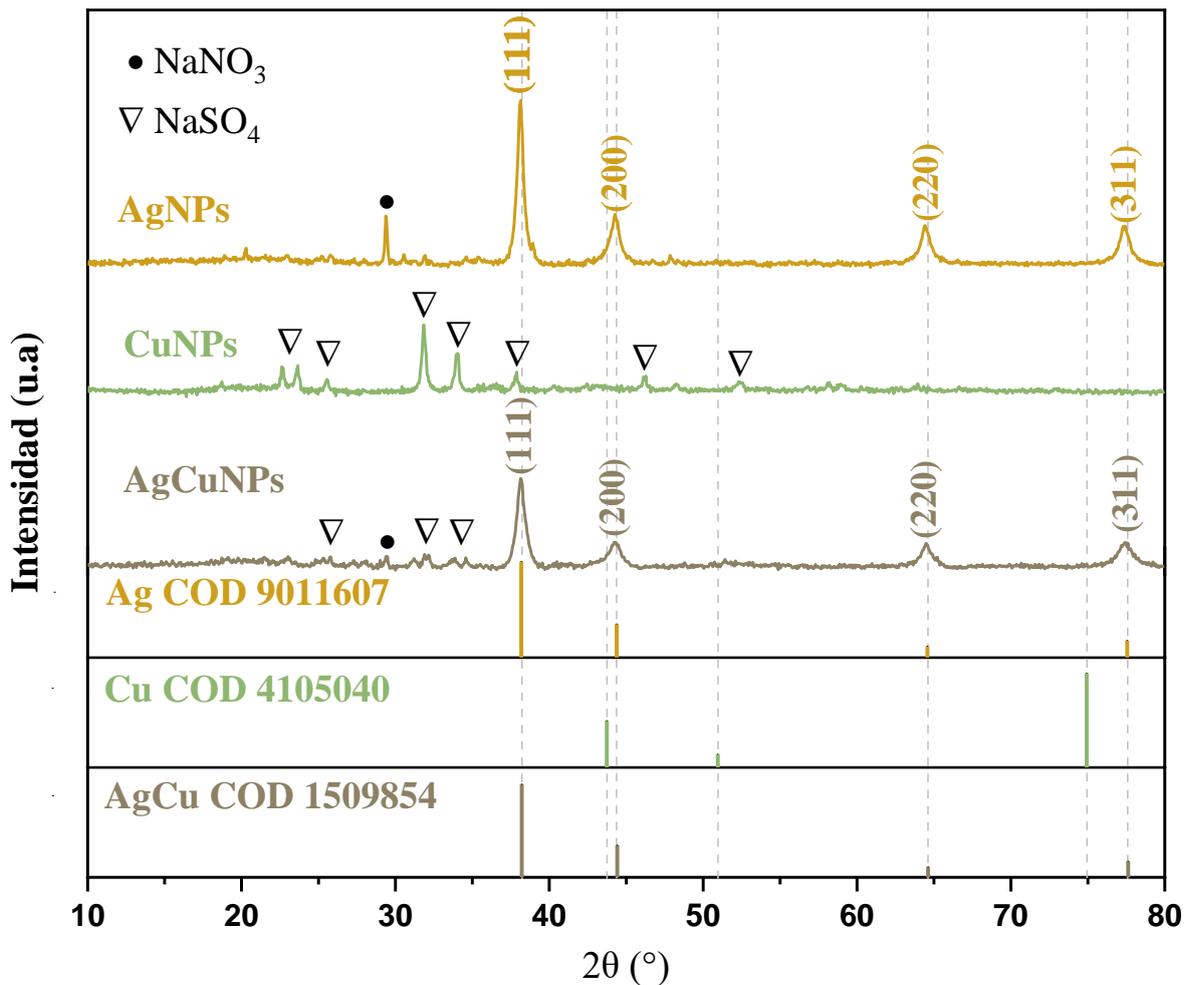
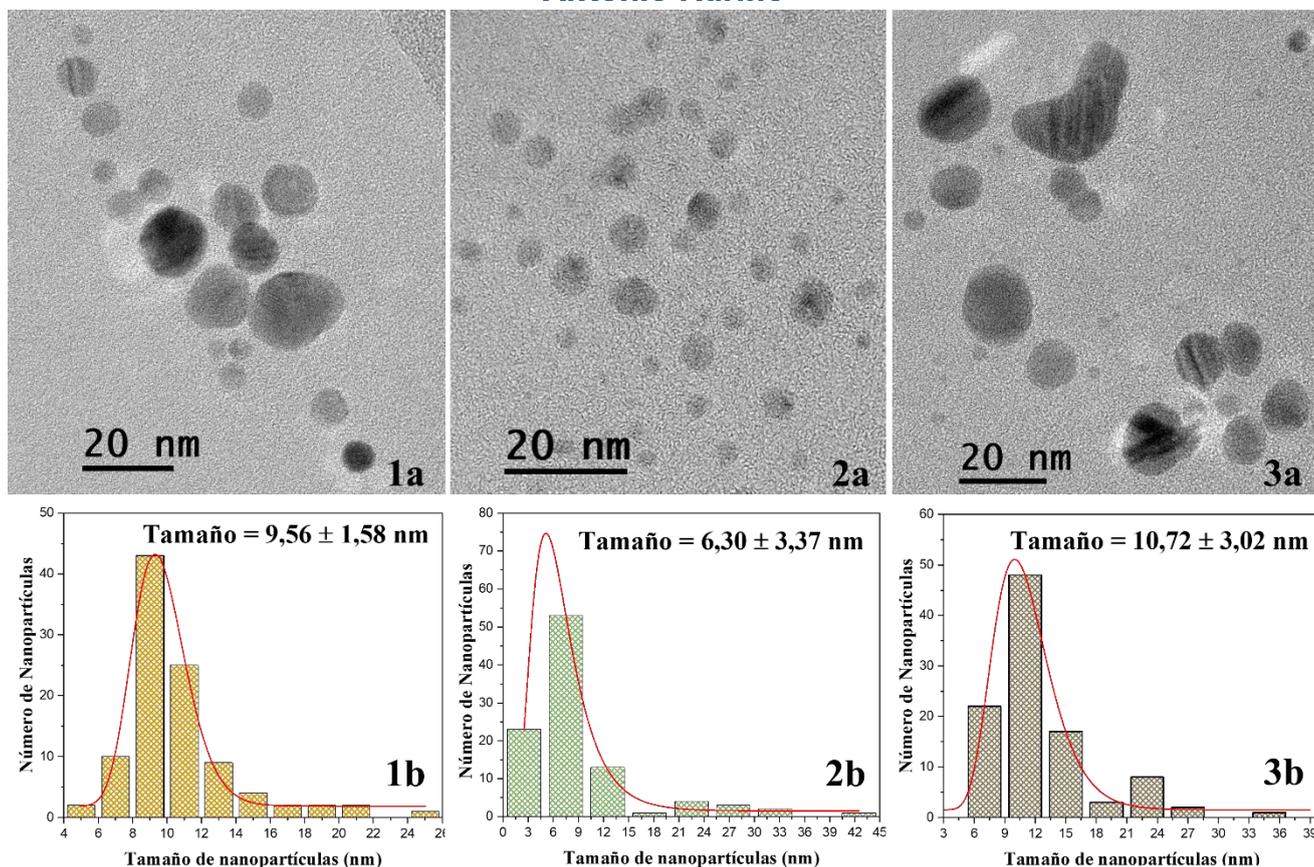


Figura 5. Espectro XRD de AgNPs, CuNPs, AgCuNPs y tarjetas de difracción para Ag (COD 9011607), Cu (COD 4105040) y AgCu (COD 1509854).

### 3.2.3. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

Se estableció el tamaño y morfología de las nanopartículas sintetizadas mediante el análisis de imagen de la Fig. 6 donde se pueden observar las micrografías (fila superior) pertenecientes a las nanopartículas obtenidas junto con su distribución de tamaños y ajuste LogNormal respectivo (fila inferior). Para AgNPs (Fig. 6.1a) se evidencian partículas dispersas y sin agregaciones, de morfología esférica y cuasi esférica con tamaño promedio de  $9,56 \pm 1,58$  nm. En el caso de CuNPs (Fig. 6.2a), se evidencia una morfología esférica y semiesférica, con un tamaño de partícula de  $6,63 \pm 3$  nm, mientras que las AgCuNPs (Fig. 6.3a) tienen un tamaño de partícula promedio de  $10,72 \pm 3,02$  nm de morfología esférica y pseudoesférica sin la formación de agregados nanoparticulados. Los tamaños antes mencionados concuerdan con los obtenidos por DRX ya que poseen gran similitud para AgNPs y AgCuNPs, además de encontrarse dentro de la desviación estándar de estos contribuyendo a una confirmación del tamaño nanométrico que poseen nuestras nanopartículas sintetizadas. En el caso de las CuNPs el tamaño obtenido por TEM evidencia el pequeño diámetro de las nanopartículas sintetizadas por lo cual justificaría la no presencia de picos en el patrón de difracción de DRX puesto que a tamaños aproximados de 5 nm ocurre un ensanchamiento de las reflexiones que pueden llegar a ser imperceptibles al compararse con señales de mayor altura y nitidez pertenecientes al  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  con tamaños superiores a 20 nm (Wong-Pinto et al., 2021).



*Figura 6.* Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) de AgNPs (1a), CuNPs (2a) y AgCuNPs (3a). Distribución de tamaño de nanopartícula para AgNPs (1b), CuNPs (2b) y AgCuNPs (3c).

Estas micrografías demuestran la formación de nanopartículas con morfología mayoritariamente esférica y con tamaños inferiores a 50 nm, esto gracias a la implementación de un método de reducción química asistida por cavitación ultrasónica, lo que permite la obtención de partículas con mejor distribución de tamaños y morfologías (Chatel, 2019), lo que a su vez se entiende como un método fácil y eficiente tanto en la disminución del tiempo de síntesis como en la formación de nanopartículas metálicas de Ag, Cu y sistemas nanoestructurados bimetálicos (Ag-Cu), al ser comparado con otros métodos de síntesis encontrados en la literatura (He et al., 2018; D. Sharma et al., 2021; Zhu et al., 2021).

### 3.2.3.1. Espectroscopía de Rayos X (EDX)

La conformación química para AgNPs, CuNPs y AgCuNPs (Fig. 7) se realizó mediante Espectroscopía de Rayos X (EDX) donde se determinó la presencia de los metales de interés tales como

Ag y Cu, además de elementos como el oxígeno y carbono provenientes de la presencia de PVA en cada una de las muestras. En el espectro EDX para AgNPs (Fig. 7a) se observa la presencia de Ag, C y O cuyos elementos demuestran que las nanopartículas sintetizadas si establecen una composición metálica de plata y en la superficie se encuentran polímeros del dispersante PVA, adicional a ello, se evidencian picos de Cu y Si, que son característicos del soporte de cobre empleado para la medición de las muestras.

En el caso de CuNPs (Fig. 7b) el espectro hace referencia a la presencia de Cu, O, Na y S, elementos que son propios de la síntesis de nanopartículas de cobre implementada, al igual que la posible presencia de óxidos de cobre pertenecientes a la oxidación de la muestra a causa de la exposición al oxígeno atmosférico a través del tiempo, el Na y S se deben a la presencia de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  en la muestra como ya se ha establecido en el patrón de DRX, además, las señales provenientes de Ni hacen referencia a la composición de la rejilla utilizada en este caso. Sumado a esto, otras señales observables en el espectro EDX pueden deberse a contaminación cruzada por un mal manejo y limpieza de los implementos del laboratorio que son utilizados en síntesis de otros nanomateriales de poco interés en este trabajo, además, puede deberse también a una mala lectura por parte de los operarios del EDX ya que estas muestras fueron medidas con celeridad y quizás el haz no fue focalizado en la mejor distribución espacial que permitiese un mejor análisis elemental de las nanopartículas producidas.

Para el espectro de AgCuNPs se pueden evidenciar la presencia de elementos químicos como Ag, Cu, C y O, lo que demuestra la formación del sistema nanoestructurado Ag-Cu por la presencia de estos dos elementos en la muestra, señales de C y O provenientes del polímero PVA y picos de Ni por el soporte implementado para la determinación química de la muestra.

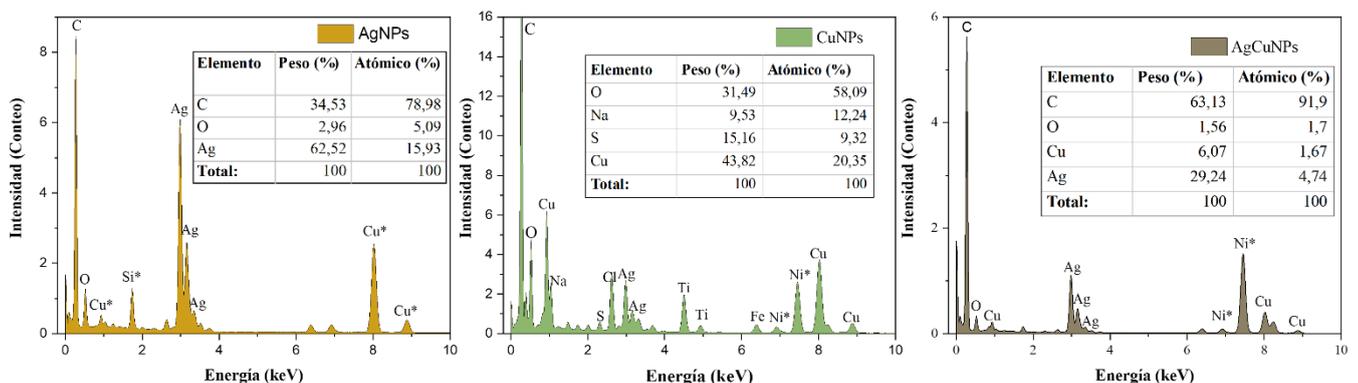


Figura 7. Espectroscopia de rayos X (EDX) de AgNPs, CuNps y AgCuNPs. Los elementos marcados con asterisco (\*) son pertenecientes a la rejilla utilizada para la medición.

### 3.2.3.2. Microscopía electrónica de Trasmisión de alta resolución (HR-TEM)

La naturaleza cristalina y composición de las nanopartículas sintetizadas se confirmó mediante HR-TEM (Fig 8), además haciendo uso de la Transformada Rápida de Fourier (FFT) se obtuvo un patrón de difracción en donde se evidencian los planos cristalográficos y con ayuda de la Transformada Rápida Inversa de Fourier se determinó la distancia interplanar presente en las partículas analizadas.

En el caso de AgNPs al analizar el patrón de difracción por la FFT perteneciente a la nanopartícula (Fig 8.1c) se establecieron los planos cristalográficos (111), (020), (220) y (311) que fueron indexados a la estructura de plata metálica FCC (COD 901-1607), además, se evidencio una distancia de red de 0,236 nm (Fig 8.1d) que corresponde al plano (111) de Ag, lo cual confirma la estructura y cristalinidad que se obtuvo mediante DRX.

La composición y cristalinidad de CuNPs se estableció mediante la FFT (Fig 8. 2c) donde se logró determinar e indexar los planos cristalográficos (111), (020), (022) y (222) pertenecientes a una estructura FCC de óxido de cobre (I) (COD 1000-0063), al igual, con la IFFT se evidencia la distancia de red con un valor de 0,245 nm (Fig 8. 2d) perteneciente al índice (111) de  $\text{Cu}_2\text{O}$ , lo cual determina la composición de las nanopartículas de CuNPs y afirma una oxidación de estas, esto principalmente a la exposición con el oxígeno atmosférico lo que además hace alusión a la rápida oxidación de la superficie de las CuNPs sintetizadas (Markin & Markina, 2019).

La nanoaleación de AgCu es confirmada por la presencia de planos cristalográficos (111) de Ag y Cu (COD 901-1607 y 410-5040) obtenidos mediante la FFT que también revela una relación epitaxial entre los cristalitos de Ag y Cu en orientación paralela (Qaseem et al., 2016), los cuales a su vez mediante IFFT se evidencio que las regiones tenían diferentes composiciones químicas, estas estaban separadas por límites de cristal gemelo (Dou et al., 2019) y poseen una distancia de red cristalina de 0,206 y 0,236 nm perteneciente al índice (111) para Cu y Ag respectivamente. Cabe resaltar que no se presenta ningún tipo de señal característico de  $\text{Cu}_2\text{O}$  debido al efecto de protección que le brinda la plata

al cobre por encontrarse en una aleación lo que ralentiza el proceso de oxidación (Mallikarjuna et al., 2020).

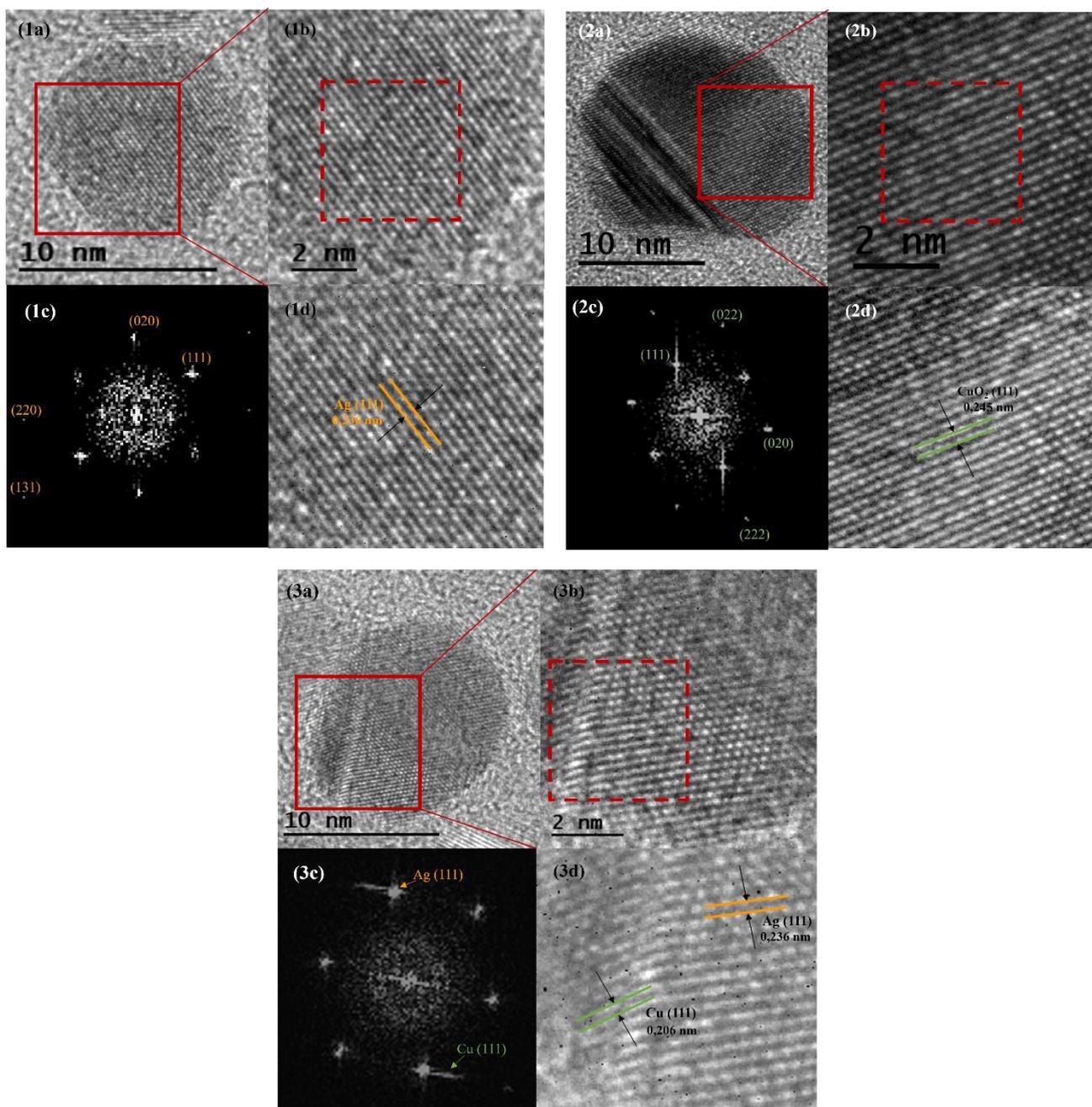


Figura 8. Imagen de HR-TEM de AgNPs (1), CuNPs (2) y AgCuNPs (3). Micrografía de nanopartícula (a), Zoom área de interés (b), FFT (c) y IFFT (d).

### 3.3. Actividad Antimicrobiana

#### 3.3.1. Pruebas de susceptibilidad bacteriana Kirby Bauer

Se analizó la actividad antimicrobiana de manera cualitativa de las nanopartículas sintetizadas

contra las bacterias *S. aureus* y *K. pneumoniae* al medir la zona de inhibición de crecimiento bacteriano (Fig 9) generada por la acción de las AgNPs, CuNPs y AgCuNPs. El diámetro de inhibición con mayor tamaño se observó en *S. aureus* con la implementación de AgCuNPs (10,4 y 10,1 mm) para un promedio de 10,35 mm, mientras que al implementar las nanopartículas monometálicas no se observó la presencia de un halo de inhibición significativo, haciendo referencia únicamente al tamaño característico del disco utilizado (6 mm), lo que indicaría que el empleo de nanopartículas bimetálicas exhibe un mayor efecto al potenciar su acción antimicrobiana por sinérgia entre los metales ensayados que al ser utilizadas individualmente. En la cepa Gram negativa *K. pneumoniae* se evidencia un halo de inhibición pequeño para AgNPs con un tamaño de 7,4 y 7,5 mm respecto a los diámetros obtenidos para el sistema nanoestructurado en aleación (8,2 y 8,1 mm) lo que se observa como un aumento en la propiedad inhibitoria con respecto al uso individual, puesto que las CuNPs a simple vista no generaron una zona de inhibición que pudiese ser medida.

Teniendo en consideración lo descrito anteriormente, se evidencia un mejoría sustancial de la capacidad inhibitoria que posee el sistema nanoestructurado Ag-Cu como consecuencia de la sinergia que exhiben las nanopartículas de Ag y Cu en un escenario bimetálico (Fan et al., 2021), y aunque se evidencia una zona inhibitoria de crecimiento por parte de las partículas en aleación, este diámetro es muy pequeño comparado con los obtenidos por antibióticos (Balasubramanian et al., 2021; Fatini Ghazali et al., 2019), debido a una baja difusión de las nanopartículas en medios semisólidos como lo pueden ser el agar MH, ya que estas partículas no se movilizan lejos de los discos para interactuar físicamente con las células bacterianas (Qaseem et al., 2016).

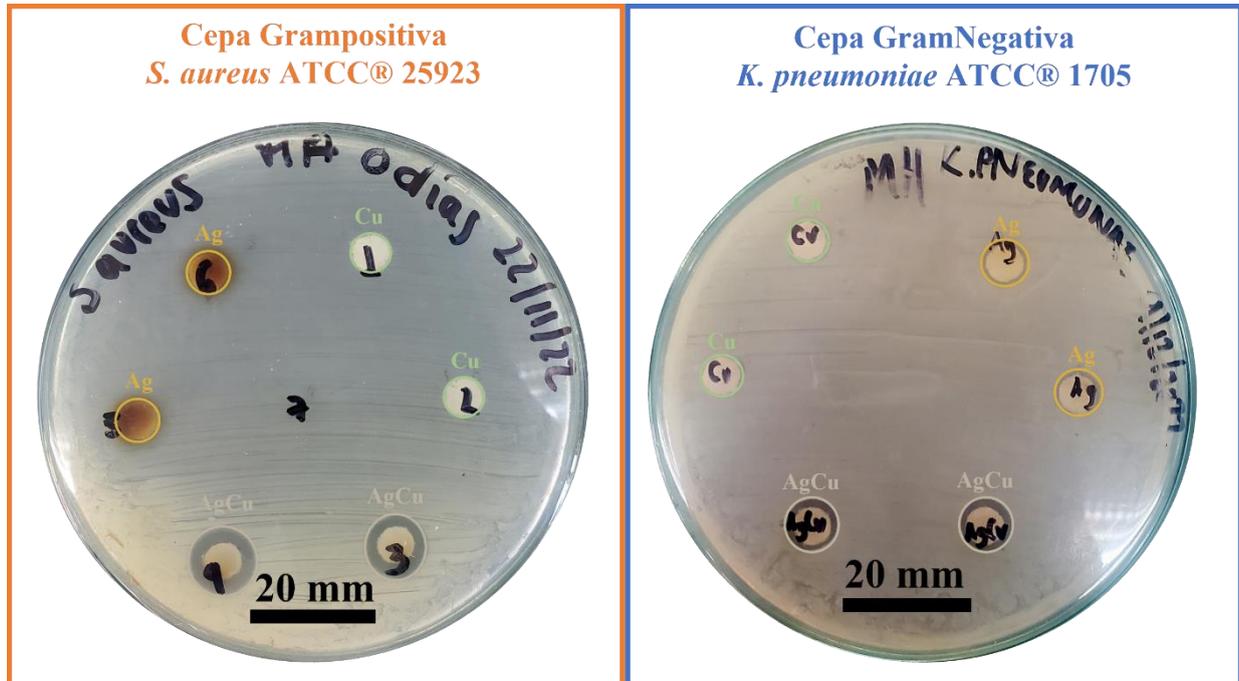


Figura 9. Halos de inhibición de las AgNPs, CuNPs y AgCuNPs frente a las cepas bacterianas *S. aureus* y *K. pneumoniae*.

### 3.3.2. Microdilución en caldo

La actividad antimicrobiana que exhiben las nanopartículas sintetizadas se estableció de manera cuantitativa a través del desarrollo de gráficas de actividad antimicrobiana en porcentaje de inhibición, con los resultados obtenidos por el método de microdilución en caldo. Se partió de una concentración inicial de 25 ppm de los estímulos probados (AgNps, CuNps y AgCuNPs), generando como resultado la Fig. 10 y 11 en donde se evidencia la inhibición del crecimiento bacteriano en porcentaje (Eje Y) y la concentración empleada del antimicrobiano en ppm (Eje X).

La Fig. 10, demuestra la eficiencia de las nanopartículas para inhibir el crecimiento de la bacteria *S. aureus*, donde se observa que los antimicrobianos implementados afectaron el crecimiento normal del microorganismo estudiado a concentraciones tan bajas como 1,562 ppm de las partículas sintetizadas, pero al emplearse concentraciones superiores a 12,5 ppm se evidencia una inhibición del crecimiento bacteriano superior al 50% y esta capacidad inhibitoria es superior al 80% al implementar una cantidad de 25 ppm de CuNPs y AgNPs, mientras que al estar en contacto las bacterias con una suspensión del sistema nanoestructurado Ag-Cu a la misma concentración, se evidencia una inhibición superior al 95% del crecimiento bacteriano, lo que demuestra la sinergia existente por la presencia de

Ag y Cu en las nanopartículas sintetizadas, mejorando las propiedades microbicidas que exhiben individualmente las AgNPs y CuNPs, corroborando los resultados obtenidos en el ensayo Kirby Bauer.

De manera adicional, con la determinación de la actividad microbicida de las nanopartículas obtenidas, se logró comparar la eficiencia que poseen las AgCuNPs con respecto a un antimicrobiano de uso comercial como lo es el NaClO, en donde al ser probados a partir de una concentración de 3,5 % (35.000 ppm) se pudo evaluar que se produce el mismo efecto inhibitorio en una concentración de 4.375 ppm del hipoclorito de sodio que al ser implementada una concentración de 25 ppm de las AgCuNPs sintetizadas, lo que reduda en una concentración 175 veces menor que la de la sustancia antimicrobiano de uso comercial.

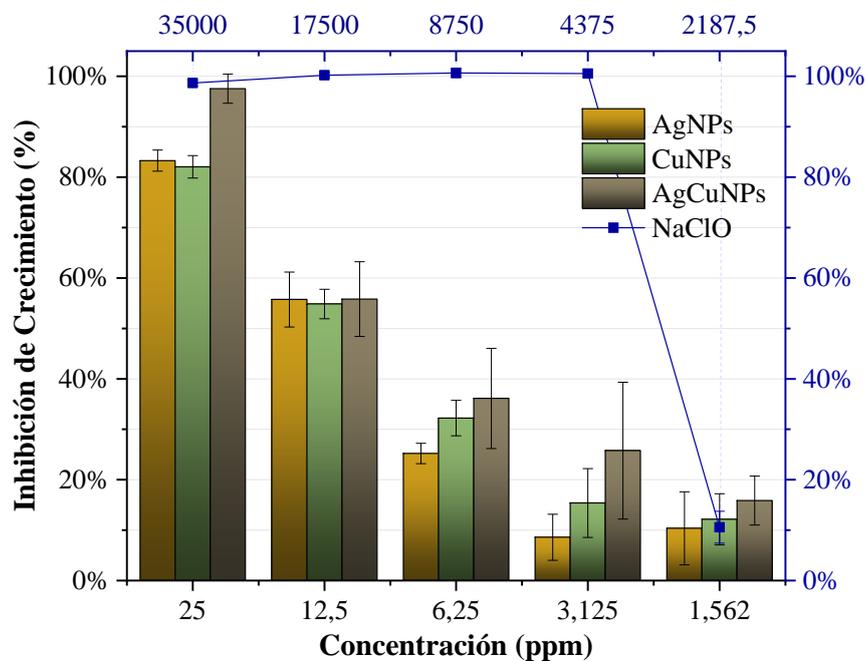


Figura 10. Actividad antimicrobiana de las AgNPs, CuNps, AgCuNPs y NaClO en porcentaje de inhibición de crecimiento de la cepa bacteriana Grampositiva *S. aureus*.

En la Fig. 11 se observa un efecto inhibitorio inferior al 50% del crecimiento normal de *K. pneumoniae* para las nanopartículas de Ag y Cu monometálicas testeadas en la máxima concentración (25 ppm), lo que indicaría que, para la bacteria Gram negativa probada, el efecto inhibitorio observado es menor. Así mismo se puede observar que esta actividad antimicrobiana es mucho menor que la obtenida para la cepa Gram positiva, y estableciendo para este caso las nanopartículas de Ag, poseen una mejor actividad antimicrobiana que las CuNPs al ser comparadas a 6,25; 3,125 y 1,562 ppm, pero

a concentraciones superiores poseen una diferencia poco significativa entre ambas. En contraste, se evidencia que las AgCuNps poseen una inhibición superior al 50% para esta cepa Gram negativa en concentraciones superiores de 6,25 ppm, llegando a inhibir hasta un 65% a una concentración de 25 ppm lo cual es un buen resultado si este es comparado con el mismo porcentaje de inhibición logrado por el antimicrobiano de uso comercial NaClO a 8.750 ppm, lo que significa que al implementar AgCuNPs se hace uso de 350 veces menos concentración que con el hipoclorito de sodio.

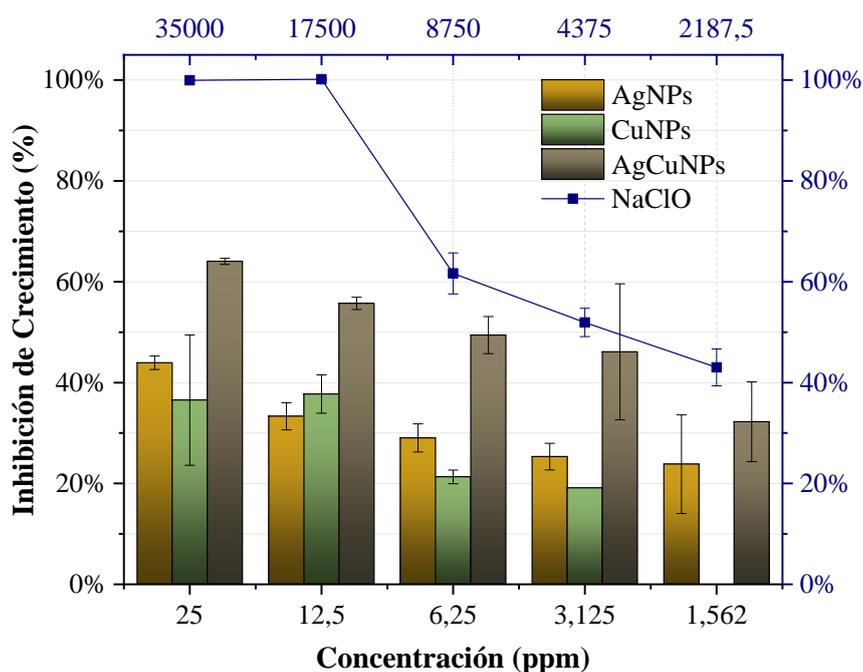


Figura 11. Actividad antimicrobiana de las AgNPs, CuNps, AgCuNPs y NaClO en porcentaje de inhibición de crecimiento de la cepa bacteriana Gramnegativa *K. pneumoniae*.

Las gráficas obtenidas permiten establecer de manera cuantitativa los porcentajes de inhibición del crecimiento de las bacterias en comparación del control de crecimiento, además en correlación con los datos obtenidos por Kirby Bauer, al hacer uso del método de microdilución en caldo, fue posible evidenciar las propiedades microbicidas intrínsecas de cada uno de los materiales sintetizados por la metodología propuesta, ya que el principal mecanismo de acción antimicrobiano de las nanopartículas metálicas es la liberación de iones al encontrarse en suspensiones acuosas (Kourmouli et al., 2018). Por otra parte, el sistema nanoestructurado Ag-Cu mostró una mayor actividad de inhibición para los microorganismos probados en comparación con las AgNPs y CuNPs, esto debido a la liberación de iones de plata y cobre de forma simultánea, los cuales pueden adherirse a la pared celular bacteriana

cargada negativamente y alterarla (Chaerun et al., 2022), ocasionado la desnaturalización de las proteínas, internacionalización de las partículas y producción de ROS que procederá a reacciones en cadena que terminaran con la muerte celular (Makvandi et al., 2020). Estos mecanismos se dan gracias al tamaño, estado de agregación, carga superficial, y la química de la superficie de la nanopartícula, lo cual puede influir en la capacidad para interactuar con las células y además ingresar a ellas (Thakore et al., 2019).

#### 4. Conclusiones

En este estudio, se realizó la síntesis de nanopartículas de plata, cobre y un sistema nanoestructurado de plata-cobre estabilizados con PVA a través de una ruta húmeda asistida por irradiación ultrasónica, que en un tiempo corto (5 min.) obtuvo mejores resultados que otras metodologías previamente establecidas en la literatura. Las nanopartículas se caracterizaron mediante las técnicas analíticas UV-VIS, DRX, TEM, EDX, SAED y HR-TEM, evidenciando la obtención de AgNPs cuasi esféricas con tamaño de partícula promedio de  $9,56 \pm 1,58$  nm, con estructura cristalina FCC perteneciente a plata metálica. De igual forma CuNPs con un tamaño promedio de  $6,30 \pm 3,37$  nm, de estructura cristalina FCC perteneciente a  $\text{Cu}_2\text{O}$  con una morfología mayoritariamente esférica así como el sistema nanoestructurado AgCuNPs con un tamaño de partícula de  $10,72 \pm 3,02$  nm, con morfología esferoidal que cristalizó en una estructura FCC correspondiente a una aleación  $\text{Ag}_{97}\text{Cu}_3$ , confirmada vía HR-TEM al exhibir una distancia interplanar de 0,206 y 0,236 nm característica para los planos de reflexión (111) de Ag y (111) de Cu presentes en una misma nanopartícula.

Sumado a esto, se estableció la actividad antimicrobiana de las nanopartículas en la cepa bacteriana Gram positiva *Staphylococcus aureus*, obteniéndose un efecto inhibitorio en el crecimiento bacteriano del 80% para AgNPs y CuNPs a una concentración de tan sólo 25 ppm, mientras se evidenció una inhibición superior al 95% con la implementación del sistema nanoestructurado AgCu a la misma concentración. De igual forma, se confirma el efecto bactericida de AgCuNPs (25 ppm) en *S. aureus*,

comparándose al obtener el mismo resultado que implementar un antimicrobiano de uso comercial como el NaClO al 3,5 %.

Para finalizar, se demostró y confirmó la sinergia existente en el aumento de la capacidad inhibitoria de las AgCuNPs en comparación al uso de AgNPs y CuNPs en la cepa bacteriana Gram negativa *Klebsiella pneumoniae*, estableciendo que las nanopartículas sintetizadas tienen mayor actividad sobre la cepa Gram positiva respecto de la Gram negativa ensayadas y empleadas como modelo.

## 5. Perspectivas a futuro

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en esta investigación se puede afirmar que las nanopartículas sintetizadas son prometedoras para un futuro uso como agente microbicida, pero para confirmar aún más esta propiedad estudiada es necesario el realizar ensayos en microorganismos tales como hongos y virus, lo cual ampliaría el espectro antimicrobiano ya demostrado de las nanopartículas. Además, teniendo en cuenta lo anterior es necesario realizar ensayos de citotoxicidad en células animales y vegetales para evidenciar biocompatibilidad con los mismos y así evaluar la especificidad de las partículas para afectar a organismos poco desarrollados y principalmente patógenos.

Gracias a los resultados obtenidos en UV-Vis se puede intuir que las nanopartículas poseen actividades ópticas de gran interés, por lo cual se propone evaluar esta propiedad en las partículas obtenidas, al igual que las propiedades catalíticas y foto catalíticas de las mismas, gracias a que resultados obtenidos por investigaciones en estos temas concuerdan con los presentados en este proyecto.

Por último, se propone adelantar métodos de síntesis ecológicos a través de la implementación de rutas verdes, enfatizando el empleo de especies vegetales (o partes de estas) o microorganismos que sirvan como agentes reductores y/o estabilizantes, mitigando el empleo de reactivos químicos nocivos para el ambiente que puedan llegar a ser perjudiciales para la salud humana.

## 6. Agradecimientos

A la Universidad Antonio Nariño por los recursos brindados a través de los proyectos N° 2019-204 y 2022-205 con los cuales se culminó con éxito esta investigación. Al Semillero Nanomat por su acogimiento fraternal que impulso mi pasión investigativa y profesional. A mis directores de trabajo de grado los investigadores Javier Rincón y Angélica Murillo, quienes fueron mis consejeros, guías y maestros para afrontar todas las dudas e inquietudes que surgieron en el camino investigativo. Agradecer Infinitamente al pilar fundamental de la física en esta investigación, quien siempre apoyo, cuestiono y nunca dudo del potencial de este trabajo, el científico entusiasta y motivador Daniel Llamosa. Agradecer a mis compañeros de carrera y semillero Brayan Betín y Jose Montero con quienes surgieron hermosos momentos de investigación. También agradecerles a todos aquellos profesores que en su momento aportaron un granito de arena en mi vida investigativa y académica. Por ultimo y no menos importante agradecerle a mi familia y pareja por su apoyo incondicional, por instaurar en mí las ganas de cumplir mis sueños y luchar por ellos. Gracias a todos.

## 7. Referencias

- (OMS), O. mundial de la salud. (2016). *PLAN DE ACCIÓN MUNDIAL SOBRE LA RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS*.
- Ahmad, M., Nawaz, T., Assiri, M. A., Hussain, R., Hussain, I., Imran, M., Ali, S., & Wu, Z. (2022). Fabrication of Bimetallic Cu-Ag Nanoparticle-Decorated Poly(cyclotriphosphazene-co-4,4'-sulfonyldiphenol) and Its Enhanced Catalytic Activity for the Reduction of 4-Nitrophenol. *ACS Omega*, 7(8), 7096–7102. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c06786>
- Alhadj, M., Safwan Abd Aziz, M., Salim, A. A., Sharma, S., Kamaruddin, W. H. A., & Ghoshal, S. K. (2023). Customization of structure, morphology and optical characteristics of silver and copper nanoparticles: Role of laser fluence tuning. *Applied Surface Science*, 614, 156176. <https://doi.org/10.1016/J.APSUSC.2022.156176>

- Arora, N., Thangavelu, K., & Karanikolos, G. N. (2020). Bimetallic Nanoparticles for Antimicrobial Applications. In *Frontiers in Chemistry* (Vol. 8, p. 412). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00412>
- Atacan, K., Güy, N., Ozmen, M., & Özacar, M. (2021). Fabrication of silver doped different metal oxide nanoparticles and evaluation of their antibacterial and catalytic applications. *Applied Surface Science Advances*, 6. <https://doi.org/10.1016/j.apsadv.2021.100156>
- Badiah, H. I., Seede, F., Supriyanto, G., & Zaidan, A. H. (2019). Synthesis of Silver Nanoparticles and the Development in Analysis Method. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 217(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/217/1/012005>
- Balachandran, A., Sreenilayam, S. P., Madanan, K., Thomas, S., & Brabazon, D. (2022). Nanoparticle production via laser ablation synthesis in solution method and printed electronic application - A brief review. *Results in Engineering*, 16, 100646. <https://doi.org/10.1016/J.RINENG.2022.100646>
- Balasubramanian, B., Benit, N., Agastian, P., Almaary, K. S., Dawoud, T. M., Elbadawi, Y. B., Mubarak, A., Alfadul, M. S., & Aljowaie, R. M. (2021). Carbapenemases producing *Klebsiella pneumoniae* from the pus of hospitalized patients: In-vitro antibiotic properties of *Streptomyces* against multidrug resistant infectious bacteria. *Journal of Infection and Public Health*, 14(7), 892–897. <https://doi.org/10.1016/J.JIPH.2021.05.006>
- Bhiradi, I., & Hiremath, S. S. (2022). Energy storage and photosensitivity of in-situ formed silver-copper (Ag-Cu) heterogeneous nanoparticles generated using multi-tool micro electro discharge machining process. *Journal of Alloys and Compounds*, 897, 162950. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2021.162950>
- Bisht, N., Dwivedi, N., Kumar, P., Venkatesh, M., Yadav, A. K., Mishra, D., Solanki, P., Verma, N. K., Lakshminarayanan, R., Ramakrishna, S., Mondal, D. P., Srivastava, A. K., & Dhand, C. (2022). Recent advances in copper and copper-derived materials for antimicrobial resistance and infection control. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 24, 100408. <https://doi.org/10.1016/J.COBME.2022.100408>

- Castro-Orozco, R., Consuegra-Mayor, C., Mejía-Chávez, G., Hernández-Escolar, J., & Alvis-Guzmán, N. (2019). Antimicrobial resistance trends in methicillin-resistant and methicillin-susceptible staphylococcus aureus and staphylococcus epidermidis isolates obtained from patients admitted to intensive care units. 2010-2015. *Revista Facultad de Medicina*, 67(3), 221–228. <https://doi.org/10.15446/revfacmed.v67n3.65741>
- Chaerun, S. K., Prabowo, B. A., & Winarko, R. (2022). Bionanotechnology: The formation of copper nanoparticles assisted by biological agents and their applications as antimicrobial and antiviral agents. In *Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management* (Vol. 18, p. 100703). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2022.100703>
- Chatel, G. (2019). Sonochemistry in nanocatalysis: The use of ultrasound from the catalyst synthesis to the catalytic reaction. In *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* (Vol. 15, pp. 1–6). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2018.07.004>
- Chávez, M., Cabezas, A. F., Ferauds, M., & Caicedo, L. D. (2020). Antimicrobial resistance patterns and genotypic diversity between clinical and water systems isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Cali, Colombia. *Tropical Biomedicine*, 37(3), 650–662.
- Choudhury, S., Medina-Lara, A., & Smith, R. (2022). Antimicrobial resistance and the COVID-19 pandemic. In *Bulletin of the World Health Organization* (Vol. 100, Issue 5, pp. 295-295A). World Health Organization. <https://doi.org/10.2471/BLT.21.287752>
- Colson, A. R., Morton, A., Årdal, C., Chalkidou, K., Davies, S. C., Garrison, L. P., Jit, M., Laxminarayan, R., Megiddo, I., Morel, C., Nonvignon, J., Outterson, K., Rex, J. H., Sarker, A. R., Sculpher, M., Woods, B., & Xiao, Y. (2021). Antimicrobial Resistance: Is Health Technology Assessment Part of the Solution or Part of the Problem? *Value in Health*, 24(12), 1828–1834. <https://doi.org/10.1016/J.JVAL.2021.06.002>
- Cruz-Vargas, S. A., García-Muñoz, L., Cuervo-Maldonado, S. I., Álvarez-Moreno, C. A., Saavedra-Trujillo, C. H., Álvarez-Rodríguez, J. C., Arango-Gutiérrez, A., Gómez-Rincón, J. C., García-Guzman, K., Leal, A. L., Garzón-Herazo, J., Martínez-Vernaza, S., Guevara, F. O., Jiménez-

- Cetina, L. P., Mora, L. M., Saavedra, S. Y., & Cortés, J. A. (2023). Molecular and Clinical Data of Antimicrobial Resistance in Microorganisms Producing Bacteremia in a Multicentric Cohort of Patients with Cancer in a Latin American Country. *Microorganisms* 2023, Vol. 11, Page 359, 11(2), 359. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS11020359>
- 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* 2021, Vol. 11, Page 902, 11(8), 902. <https://doi.org/10.3390/CATAL11080902>
- Dou, Q., Li, Y., Wong, K. W., & Ng, K. M. (2019). Facile synthesis of nearly monodisperse AgCu alloy nanoparticles with synergistic effect against oxidation and electromigration. *Journal of Materials Research*, 34(12), 2095–2104. <https://doi.org/10.1557/JMR.2019.71/FIGURES/9>
- Fan, X., Yahia, L., & Sacher, E. (2021). Antimicrobial properties of the Ag, Cu nanoparticle system. In *Biology* (Vol. 10, Issue 2, pp. 1–37). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/biology10020137>
- Fatini Ghazali, N., Zarith Sofea, P., Azima Mazlan, N., Azman, S., Zarith Sofea Yusri, P., Mohd Idi, H., Ismail, M., & Sekar, M. (2019). Synergistic antibacterial activity of mangiferin with antibiotics against *Staphylococcus aureus*. *Drug Invention Today* |, 12. <https://www.researchgate.net/publication/337312597>
- Fu, Y., Yang, Q., Xu, M., Kong, H., Chen, H., Fu, Y., Yao, Y., Zhou, H., & Zhou, J. (2020). Secondary bacterial infections in critical ill patients with coronavirus disease 2019. In *Open Forum Infectious Diseases* (Vol. 7, Issue 6). Oxford Academic. <https://doi.org/10.1093/OFID/OFAA220>
- Ghosh, C., Sarkar, P., Issa, R., & Haldar, J. (2019). Alternatives to Conventional Antibiotics in the Era of Antimicrobial Resistance. *Trends in Microbiology*, 27(4), 323–338. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2018.12.010>
- Godoy-Gallardo, M., Eckhard, U., Delgado, L. M., de Roo Puente, Y. J. D., Hoyos-Nogués, M., Gil, F. J., & Perez, R. A. (2021). Antibacterial approaches in tissue engineering using metal ions and nanoparticles: From mechanisms to applications. In *Bioactive Materials* (Vol. 6, Issue 12, pp.

4470–4490). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.04.033>

- Guo, Z., Chen, Y., Wang, Y., Jiang, H., & Wang, X. (2020). Advances and challenges in metallic nanomaterial synthesis and antibacterial applications. *Journal of Materials Chemistry B*, 8(22), 4764–4777. <https://doi.org/10.1039/D0TB00099J>
- He, L., Liu, C., Tang, J., Zhou, Y., Yang, H., Liu, R., & Hu, J. (2018). Self-catalytic stabilized Ag-Cu nanoparticles with tailored SERS response for plasmonic photocatalysis. *Applied Surface Science*, 434, 265–272. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.10.155>
- John, J., Abraham, R., Jayakrishnan, R., & Thomas, V. (2022). Resonant energy transfer between plasmonic silver and biomolecule for colour tuning and white light emission. *JCIS Open*, 8, 100065. <https://doi.org/10.1016/j.jciso.2022.100065>
- Kourmouli, A., Valenti, M., van Rijn, E., Beaumont, H. J. E., Kalantzi, O. I., Schmidt-Ott, A., & Biskos, G. (2018). Can disc diffusion susceptibility tests assess the antimicrobial activity of engineered nanoparticles? *Journal of Nanoparticle Research*, 20(3), 1–6. <https://doi.org/10.1007/S11051-018-4152-3/FIGURES/4>
- Kumar, A., & Gangawane, K. M. (2022). Synthesis and effect on the surface morphology & magnetic properties of ferrimagnetic nanoparticles by different wet chemical synthesis methods. *Powder Technology*, 410, 117867. <https://doi.org/10.1016/J.POWTEC.2022.117867>
- Kung, M. L., Tai, M. H., Lin, P. Y., Wu, D. C., Wu, W. J., Yeh, B. W., Hung, H. S., Kuo, C. H., Chen, Y. W., Hsieh, S. L., & Hsieh, S. (2017). Silver decorated copper oxide (Ag@CuO) nanocomposite enhances ROS-mediated bacterial architecture collapse. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 155, 399–407. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.04.041>
- Lai, C. C., Chen, S. Y., Ko, W. C., & Hsueh, P. R. (2021). Increased antimicrobial resistance during the COVID-19 pandemic. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 57(4), 106324. <https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2021.106324>
- Li, S., Wei, T., Tang, M., Chai, F., Qu, F., & Wang, C. (2018). Facile synthesis of bimetallic Ag-Cu nanoparticles for colorimetric detection of mercury ion and catalysis. *Sensors and Actuators, B:*

*Chemical*, 255, 1471–1481. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.08.159>

Loza, K., Heggen, M., Epple, M., Loza, K., Epple, M., & Heggen, M. (2020). Synthesis, Structure, Properties, and Applications of Bimetallic Nanoparticles of Noble Metals. *Advanced Functional Materials*, 30(21), 1909260. <https://doi.org/10.1002/ADFM.201909260>

Makvandi, P., Wang, C. yu, Zare, E. N., Borzacchiello, A., Niu, L. na, & Tay, F. R. (2020). Metal-Based Nanomaterials in Biomedical Applications: Antimicrobial Activity and Cytotoxicity Aspects. *Advanced Functional Materials*, 30(22), 1910021. <https://doi.org/10.1002/adfm.201910021>

Mallikarjuna, K., Al-Mohaimed, A. M., Al-Farrzj, D. A., Reddy, L. V., Reddy, M. R. V., & Mohammed, A. (2020). Facile synthesis, characterization, anti-microbial and anti-oxidant properties of alkylamine functionalized dumb-bell shaped copper-silver nanostructures. *Crystals*, 10(11), 966. <https://doi.org/10.3390/cryst10110966>

Markin, A. V., & Markina, N. E. (2019). Experimenting with Plasmonic Copper Nanoparticles to Demonstrate Color Changes and Reactivity at the Nanoscale. *Journal of Chemical Education*, 96(7), 1438–1442. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.8b01050>

Martínez Mora, M. F. (2021). Preocupante aumento de la resistencia antimicrobiana asociada al COVID-19. *Memorias Del Instituto de Investigaciones En Ciencias de La Salud*, 19(3), 3–5. <https://doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2021.019.03.03>

Mba, I. E., & Nweze, E. I. (2021). Nanoparticles as therapeutic options for treating multidrug-resistant bacteria: research progress, challenges, and prospects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(6), 1–30. <https://doi.org/10.1007/S11274-021-03070-X/TABLES/5>

Nisar, P., Ali, N., Rahman, L., Ali, M., & Shinwari, Z. K. (2019). Antimicrobial activities of biologically synthesized metal nanoparticles: an insight into the mechanism of action. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 24(7), 929–941. <https://doi.org/10.1007/S00775-019-01717-7/FIGURES/4>

O'Neill, J. (2019). Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations: the review on antimicrobial resistance; 2016 [Available from: <https://amr-review.org>. *Publications*.

*Html*, 1–35. [https://amr-review.org/sites/default/files/160518\\_Final paper\\_with cover.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final paper_with cover.pdf)

Oliveira, A. E. F., Pereira, A. C., de Resende, M. A. C., & Ferreira, L. F. (2022). Synthesis of a silver nanoparticle ink for fabrication of reference electrodes. *Talanta Open*, 5, 100085. <https://doi.org/10.1016/j.talo.2022.100085>

Organización Panamericana de la Salud. (2022). *La resistencia a los antimicrobianos, acelerada por la pandemia de COVID-19. Síntesis de política, noviembre del 2021* (pp. 1–16). <https://iris.paho.org/handle/10665.2/55928>

Qaseem, A., Chen, F., & Zhang, N. (2016). Ag–Cu Nanoalloy Electrocatalysts for Oxygen Reduction in Alkaline Media for Advanced Energy Conversion and Storage. In *Advanced Catalytic Materials - Photocatalysis and Other Current Trends*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/62050>

Robledo, J., Maldonado, N., Robledo, C., Naranjo, L. C., Galeano, V. H., & Pino, J. J. (2022). Changes in Antimicrobial Resistance and Etiology of Blood Culture Isolates: Results of a Decade (2010–2019) of Surveillance in a Northern Region of Colombia. *Infection and Drug Resistance*, 15, 6067–6079. <https://doi.org/10.2147/IDR.S375206>

Salleh, A., Naomi, R., Utami, N. D., Mohammad, A. W., Mahmoudi, E., Mustafa, N., & Fauzi, M. B. (2020). The Potential of Silver Nanoparticles for Antiviral and Antibacterial Applications: A Mechanism of Action. *Nanomaterials* 2020, Vol. 10, Page 1566, 10(8), 1566. <https://doi.org/10.3390/NANO10081566>

SALUD DATA. (2021). *Infografía / Demografía y Salud en Bogotá | SALUDATA*. <https://saludata.saludcapital.gov.co/osb/index.php/2021/08/11/infografia-demografia-y-salud-en-bogota/>

Sánchez, A., Mejía, S. P., & Orozco, J. (2020). Recent advances in polymeric nanoparticle-encapsulated drugs against intracellular infections. In *Molecules* (Vol. 25, Issue 16, p. 3760). Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <https://doi.org/10.3390/molecules25163760>

Shang, S., Kunwar, A., Wang, Y., Qi, X., Ma, H., & Wang, Y. (2018). Synthesis of Cu@Ag core–shell nanoparticles for characterization of thermal stability and electric resistivity. *Applied Physics A:*

*Materials Science and Processing*, 124(7), 1–8. <https://doi.org/10.1007/S00339-018-1887-8/FIGURES/8>

Sharma, D., Ledwani, L., Kumar, N., Mehrotra, T., Pervaiz, N., & Kumar, R. (2021). An Investigation of Physicochemical and Biological Properties of Rheum emodi-Mediated Bimetallic Ag–Cu Nanoparticles. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 46(1), 275–285. <https://doi.org/10.1007/S13369-020-04641-0/TABLES/3>

Sharma, G., Kumar, A., Sharma, S., Naushad, M., Prakash Dwivedi, R., ALothman, Z. A., & Mola, G. T. (2019). Novel development of nanoparticles to bimetallic nanoparticles and their composites: A review. *Journal of King Saud University - Science*, 31(2), 257–269. <https://doi.org/10.1016/J.JKSUS.2017.06.012>

Sharmin, S., Rahaman, M. M., Sarkar, C., Atolani, O., Islam, M. T., & Adeyemi, O. S. (2021). Nanoparticles as antimicrobial and antiviral agents: A literature-based perspective study. *Heliyon*, 7(3), e06456. <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2021.E06456>

Shkodenko, L., Kassirov, I., & Koshel, E. (2020). Metal Oxide Nanoparticles Against Bacterial Biofilms: Perspectives and Limitations. *Microorganisms 2020*, Vol. 8, Page 1545, 8(10), 1545. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8101545>

Sobi, M. A., Usha, D., Umadevi, M., Bindhu, M. R., Sureshkumar, S., Al-Dosary, M. A., Alodaini, H. A., & Hatamleh, A. A. (2022). Size dependent antimicrobial activity of Boerhaavia diffusa leaf mediated silver nanoparticles. *Journal of King Saud University - Science*, 34(5), 102096. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.102096>

Spirescu, V. A., Chircov, C., Grumezescu, A. M., & Andronesu, E. (2021). Polymeric Nanoparticles for Antimicrobial Therapies: An up-to-date Overview. *Polymers 2021*, Vol. 13, Page 724, 13(5), 724. <https://doi.org/10.3390/POLYM13050724>

Thakore, S. I., Nagar, P. S., Jadeja, R. N., Thounaojam, M., Devkar, R. V., & Rathore, P. S. (2019). Sapota fruit latex mediated synthesis of Ag, Cu mono and bimetallic nanoparticles and their in vitro toxicity studies. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(5), 694–700.

<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.12.042>

- Toro-Alzate, L. F. (2021). Antimicrobial resistance in Colombia under the scope of One Health approach. *Tropical Medicine and International Health*, 26(SUPPL 1), 120–121. <http://dx.doi.org/10.1111/tmi.13632>
- Wan Mat Khalir, W. K. A., Shameli, K., Jazayeri, S. D., Othman, N. A., Che Jusoh, N. W., & Hassan, N. M. (2020). Biosynthesized Silver Nanoparticles by Aqueous Stem Extract of *Entada spiralis* and Screening of Their Biomedical Activity. *Frontiers in Chemistry*, 8, 620. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00620>
- Wong-Pinto, L. S., Mercado, A., Chong, G., Salazar, P., & Ordóñez, J. I. (2021). Biosynthesis of copper nanoparticles from copper tailings ore – An approach to the ‘Bionanominig.’ *Journal of Cleaner Production*, 315, 128107. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.128107>
- World Health Organization (WHO). (2020). *GLASS Report: Early Implementation 2020*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240005587>
- Yazdani-Darki, S., Eslami-Kalantari, M., & Zare, H. (2021). Study of double-using ultrasonic effects on the structure of PbO nanorods fabricated by the sonochemical method. *Ultrasonics Sonochemistry*, 79, 105797. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2021.105797>
- Yetisgin, A. A., Cetinel, S., Zuvun, M., Kosar, A., & Kutlu, O. (2020). Therapeutic Nanoparticles and Their Targeted Delivery Applications. *Molecules*, 25(9). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25092193>
- Zhu, Y., Zhou, F., Hu, J., Yang, L., Yang, D. Q., & Sacher, E. (2021). A facile route to prepare colorless Ag-Cu nanoparticle dispersions with elevated antibacterial effects. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 626, 127116. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFA.2021.127116>