

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Óptica
con orientación en Optoelectrónica**

**Síntesis de nanopartículas de cobre por el método de ALSL, y
su uso potencial en inhibición de *E. coli***

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Estefanía Zárate Ochoa

Ensenada, Baja California, México

2022

Tesis defendida por

Estefanía Zárate Ochoa

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Santiago Camacho López
Codirector de tesis

Dra. Paulina Segovia Olvera
Codirectora de tesis

Miembros del comité

Dra. Karina Garay Palmett

Dr. Jacob Licea Rodríguez

Dr. Luis Felipe Devia Cruz

Dra. Carolina Álvarez Delgado



Dra. Karina Garay Palmett
Coordinadora del Posgrado en Óptica

Dr. Pedro Negrete Regagnon
Director de Estudios de Posgrado

Estefanía Zárate Ochoa © 2022

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Estefanía Zárate Ochoa** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Óptica con orientación en Optoelectrónica.

Síntesis de nanopartículas de cobre por el método de ALSL, y su uso potencial en inhibición de *E. coli*

Resumen aprobado por:

Dr. Santiago Camacho López

Codirector de tesis

Dra. Paulina Segovia Olvera

Codirectora de tesis

La aparición de nuevas enfermedades infecciosas y su rápido desarrollo respecto a la resistencia de los fármacos existentes ha sido motivo de alarmante preocupación, por lo que se han explorado otras alternativas para erradicar esta problemática. Con el avance de la nanotecnología, las nanopartículas han llamado la atención debido a sus usos en distintas aplicaciones, especialmente en el campo de la biomedicina. Se ha demostrado que las nanopartículas de cobre tienen un gran potencial en inactivación bacteriana debido a su amplio espectro inhibitorio contra bacterias, virus y hongos. En este trabajo se presenta un estudio sobre la síntesis de nanopartículas (NPs) por ablación láser de sólidos en líquidos (ALSL), partiendo de un blanco de cobre. Los experimentos se llevaron a cabo considerando dos medios: acetona y agua. Se caracterizaron las propiedades estructurales, de composición química y la respuesta óptica de las nanopartículas obtenidas en ambos líquidos. Además, el efecto de la formación de una coraza de óxido de cobre en la respuesta óptica de las nanopartículas es analizado de manera teórica utilizando el Método de Elementos Finitos y llevando a cabo simulaciones mediante el software COMSOL. Nuestros resultados muestran la formación de nanopartículas de Cu, CuO y Cu₂O para condiciones específicas de irradiación láser; asimismo, los ensayos de inactivación bacteriana nos indican que dichos óxidos inhiben el crecimiento de la bacteria *E. coli*.

Palabras clave: ablación laser, síntesis de nanopartículas, cobre, núcleo-coraza, óxidos, e.coli.

Abstract of the thesis presented by **Estefanía Zárate Ochoa** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Optics with orientation in Optoelectronics.

Copper nanoparticles synthesized by LASL, and its potential use in *E. coli* inhibition

Abstract approved by:

Dr. Santiago Camacho López
Thesis Co-director

Dra. Paulina Segovia Olvera
Thesis Co-director

The appearance of new infectious diseases and their rapid development with respect to the resistance of existing drugs has been a matter of alarming concern, for which other alternatives have been explored to eradicate this problem. With the advancement of nanotechnology, nanoparticles have drawn attention due to their uses in different applications, especially in the field of biomedicine. Copper nanoparticles have been shown to have great potential in bacterial inactivation due to their broad inhibitory spectrum against bacteria, viruses and fungi. In this work, a study on the synthesis of nanoparticles (NPs) by laser ablation of solids in liquids (LASL) is presented. We used a copper target and the experiments were carried out considering two liquid media: acetone and water. The structural, chemical composition and optical features of the obtained nanoparticles were characterized. Furthermore, the effect of the formation of a copper oxide shell on the optical response of the nanoparticles is theoretically analyzed using the Finite Element Method and running simulations in COMSOL. Our results show the formation of nanoparticles of Cu, CuO and Cu₂O for specific laser irradiation conditions. In addition to this, bacterial inactivation tests indicate that these oxides inhibit the growth of the *E. coli* bacteria.

Keywords: laser ablation, nanoparticles synthesis, copper, core-shell, oxides, e.coli.

Dedicatoria

A mi familia,
por su amor y apoyo incondicional.

A mi abuelo,
quien siempre creyó en mí.

Agradecimientos

Primeramente, al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por abrirme sus puertas y darme la oportunidad de cumplir una meta más en mi formación académica, profesional y personal.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por su apoyo económico durante la realización de mis estudios de maestría, bajo el número de becario 902486, y al proyecto FORDECyT-PRONACES 246648 por el apoyo parcial a la investigación que se reporta en la presente tesis.

Agradezco infinitamente a mis directores de tesis, Dr. Santiago Camacho y Dra. Paulina Segovia, por aceptarme en el grupo de investigación de Procesamiento de Materiales con Pulsos Ultracortos, por su apoyo, palabras de aliento, paciencia y confianza depositada en mí.

A mi grupo de investigación, los que permanecen en él y los que han continuado su camino. En especial a la Dra. Mariela Flores, quien estuvo a mi lado a lo largo de este proyecto; no habría podido sin su ayuda.

Al Dr. Nahum Hernández, Dr. Rubén Cadena, Dr. Marcos Plata, Dra. Catalina Ramírez, Dra. Gabriela Guzmán, Dra. Ernestina Castro y M.I Fabián Alonso, por ayudarme con toda la amabilidad del mundo en la caracterización de las muestras que forman parte de este trabajo.

A mi comité de tesis, Dra. Karina Garay, Dr. Jacob Licea, Dr. Luis Felipe Devia y Dra. Carolina Álvarez, por aceptar ser parte de mi proyecto de maestría y por sus críticas constructivas a lo largo del mismo; lo valoro muchísimo.

Gracias de nuevo a la Dra. Karina Garay, por ser una excelente coordinadora de posgrado y siempre buscar apoyos económicos para el bienestar de los alumnos.

A mis compañeros de generación por ser un gran soporte durante el año de materias. A mis compañeros ópticos por hacer de mi estadía en CICESE una de las mejores etapas de mi vida.

A todas mis amistades, por sus risas y enseñanzas.

A Ernesto, por ser mi fortaleza y motivarme a seguir adelante.

A mis padres, mis hermanas, mi abuela y tíos. Son quienes están detrás de mi educación y valores, quienes me dieron las bases de ser como soy y las personas en quien más confío. Su amor incondicional me acompaña a donde vaya.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	x
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Justificación	5
1.3 Objetivos	5
1.3.1 Objetivo general	5
1.3.2. Objetivos específicos.....	6
Capítulo 2. Marco teórico.....	7
2.1 Ablación láser	7
2.2 Procesamiento de materiales con pulsos láser ultracortos	9
2.3 Ablación láser de sólidos en líquidos para la formación de nanopartículas	10
2.4 Parámetros de irradiación láser	13
2.4.1 Longitud de onda del pulso	14
2.4.2 Fluencia del pulso.....	14
2.4.3 Duración del pulso.....	14
2.4.4 Frecuencia de repetición.....	15
2.4.5 Número de pulsos	15
2.5 Efectos plasmónicos en las nanopartículas metálicas	15
2.6 Efectos de oxidación en las propiedades ópticas de NPs de Cu.....	18
2.7 Características del cobre	19
2.7.1 Óxido cuproso (Cu ₂ O).....	20
2.7.2 Óxido cúprico (CuO)	21
2.8 Nanopartículas con actividad antimicrobiana.....	22
2.8.1 <i>Escherichia coli</i>	23

Capítulo 3. Metodología	25
3.1 Arreglo experimental	25
3.1.1 Sistema de Plano Equivalente de Blanco	26
3.1.2 Caracterización del haz láser	27
3.2 Fluencia umbral de ablación del cobre	29
3.3 Parámetros de irradiación.....	32
3.4 Simulaciones en COMSOL para nanopartículas	33
3.4.1 Modelado	34
3.5 Caracterización de las nanopartículas.....	36
3.5.1 Espectroscopía UV-VIS-IR	37
3.5.2 Espectroscopia Raman	39
3.5.3 Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	40
3.5.4 Medición del potencial zeta	42
3.5.5 Determinación de la concentración de nanopartículas	44
3.6 Ensayos de inhibición con <i>E. coli</i>	46
Capítulo 4. Resultados y Discusión	47
4.1 Fluencia umbral de ablación del cobre	47
4.2 Resultados de espectroscopía UV-VIS-IR	48
4.3 Cálculo de la sección transversal de absorción	51
4.4 Resultados del estudio del efecto de oxidación en NPs de Cu.....	53
4.5 Resultados de caracterización TEM/HRTEM	55
4.6 Resultados de caracterización Raman.....	59
4.7 Análisis del potencial zeta	61
4.8 Resultados de la concentración de NPs de Cu	62
4.9 Resultados de los ensayos de inhibición con <i>E. coli</i>	63
Capítulo 5. Conclusiones	65
5.1. Trabajo a futuro.....	65
Literatura citada	67

Lista de figuras

	Página
Figura 1. Diagrama de aplicaciones para los efectos antibacteriales de las nanopartículas.	2
Figura 2. Ilustración del mecanismo antibacteriano de las NPs de Cu en una bacteria.	3
Figura 3. Comparación de ablación con pulsos cortos.....	9
Figura 4. Esquema de las etapas de la ALSL.....	10
Figura 5. Evolución del proceso de ablación para la obtención de NPs..	13
Figura 6. Ilustración de un plasmón de superficie localizado	16
Figura 7. Estructura cristalina del cobre.	19
Figura 8. Estructura cristalina del óxido cuproso y su forma en polvo.	21
Figura 9. Estructura cristalina del óxido cúprico y su forma en polvo.	21
Figura 10. Efectos antibacteriales de las nanopartículas metálicas.....	23
Figura 11. Imagen SEM de bacterias de Escherichia coli.	24
Figura 12. Arreglo Experimental.	25
Figura 13. Perfiles de intensidad del haz láser.....	27
Figura 14. Matriz de ablación en cobre.....	29
Figura 15. Diámetros al cuadrado para (a) diámetros en “x”, y (b) diámetros en “y”	30
Figura 16. Fluencia umbral de ablación dependiente del número de pulsos.....	32
Figura 17. Diagrama de la nanopartícula en la simulación.	33
Figura 18. Diagrama de configuración del espectrómetro UV-VIS-IR StellarNet.....	38
Figura 19. Esquema básico de un espectrómetro Raman.....	39
Figura 20. Diagrama básico de un microscopio electrónico de transmisión.	41
Figura 21. Representación gráfica de NPs en un coloide.....	42
Figura 22. Diagrama del modelo de Doble Capa.....	43
Figura 23. Gráfico de una celda capilar.....	44
Figura 24. Imagen de un picnómetro con volumen de 50 ml.	45
Figura 25. Matriz de ablación en cobre.....	47

Figura 26. Fluencia umbral de ablación del cobre dependiente del número de pulsos	48
Figura 27. Soluciones coloidales de CuNPs en agua destilada	49
Figura 28. Soluciones coloidales de CuNPs en acetona	49
Figura 29. Espectros UV-VIS de los coloides sintetizados en agua.	50
Figura 30. Espectros UV-VIS de los coloides sintetizados en acetona.	51
Figura 31. Sección transversal de absorción de una nanopartícula tipo núcleo-coraza Cu@CuO	52
Figura 32. Simulación en agua destilada de una nanopartícula núcleo-coraza con un núcleo de cobre y una capa de óxido cúprico	54
Figura 33. Simulación en agua destilada de una nanopartícula núcleo-coraza con un núcleo de cobre y una capa de óxido cuproso	55
Figura 34. Micrografías HRTEM de NPs de Cu sintetizadas en agua y en acetona	56
Figura 35. Nanopartículas tipo núcleo-coraza sintetizadas en agua y acetona	57
Figura 36. Micrografías HRTEM.....	58
Figura 37. Espectros Raman de nanopartículas de CuO y Cu ₂ O en agua y acetona.	59
Figura 38. Absorbancia para los distintos coloides que contienen <i>E. coli</i> y para el control.	63

Lista de tablas

	Página
Tabla 1. Propiedades térmicas, físicas y ópticas del cobre.....	20
Tabla 2. Constantes ópticas del cobre y sus óxidos.....	22
Tabla 3. Parámetros de irradiación para la síntesis de NPs de Cu en agua.....	32
Tabla 4. Parámetros de irradiación para la síntesis de NPs de Cu en acetona.....	33
Tabla 5. Parámetros definidos para la simulación de una nanopartícula núcleo-coraza.....	34
Tabla 6. Variables definidas para la simulación de una nanopartícula núcleo-coraza.....	36
Tabla 7. Posición de las bandas Raman identificadas en las NPs sintetizadas en agua y acetona.....	60
Tabla 8. Volúmenes de muestra tomados para la disolución del coloide para llevar a cabo el análisis de potencial zeta.....	61
Tabla 9. Tamaño promedio de las NPs y su respectivo potencial zeta.....	62
Tabla 10. Datos obtenidos para los distintos medios líquidos.....	62
Tabla 11. Valores de absorbancia para cada una de las muestras.....	64

Capítulo 1. Introducción

1.1 Antecedentes

El cobre, cuyo símbolo es Cu en la tabla periódica, es el elemento químico de número atómico 29; es uno de los metales que puede tenerse en estado más puro y es moderadamente duro, soporta esfuerzos sin deformarse y es resistente al desgaste. Su utilidad se debe a su abundancia, así como a la combinación de sus propiedades químicas, físicas, mecánicas y eléctricas, las cuales dependen en gran medida de las condiciones físicas, la temperatura y tamaño del grano del metal.

Para el ser humano, el cobre tiene relevancia ya que se encuentra en una gran cantidad de alimentos habituales, y contribuye a la formación de eritrocitos y mantenimiento de vasos sanguíneos, nervios, sistema inmune y huesos (Collins y Klevay, 2011), por lo que es un oligoelemento esencial para la vida humana. En este contexto, las nanopartículas de cobre (NPs de Cu) han sido ampliamente estudiadas para aplicaciones relacionadas con la salud.

Las NPs de Cu poseen características únicas que incluyen actividad catalítica, de biosensado (biodetección), antifúngica y antibacteriana que no se observa en el cobre en bulto (Dhas *et al.*, 1998). Por lo tanto, es importante estudiar distintos métodos de síntesis de NPs de Cu y llevar a cabo una caracterización amplia de dichas NPs.

La actividad antimicrobiana de las NPs de Cu es inducida por la estrecha interacción entre las membranas microbianas y los iones metálicos liberados en solución (Ramya Devi *et al.*, 2012). A medida que las NPs se oxidan lentamente en la solución, se liberan iones cúpricos y pueden crear radicales libres de hidroxilos tóxicos cuando la membrana lipídica está cerca. La consecuencia es que los radicales libres provocan la degradación oxidativa de los lípidos en las membranas, lo cual resulta en el daño celular.

Como resultado, las moléculas intracelulares salen de las células a través de las membranas destruidas y, en consecuencia, las células ya no pueden llevar a cabo procesos bioquímicos fundamentales (Wei *et al.*, 2010). Al final, todas estas alteraciones dentro de la célula provocadas por los radicales libres conducen a la muerte celular.

Un fenómeno que ha causado preocupación en relación al combate de infecciones es que en los últimos años ha aumentado la resistencia bacteriana a bactericidas y antibióticos (Rajawat y Qureshi, 2012).

Por otro lado, muchos agentes antimicrobianos orgánicos son tóxicos para los seres humanos y otros animales, además, pueden ser la causa de diferentes reacciones alérgicas, por lo que en la actualidad no hay suficientes tratamientos antibacterianos en desarrollo para combatir la resistencia antibacteriana (Hossain *et al.*, 2015).

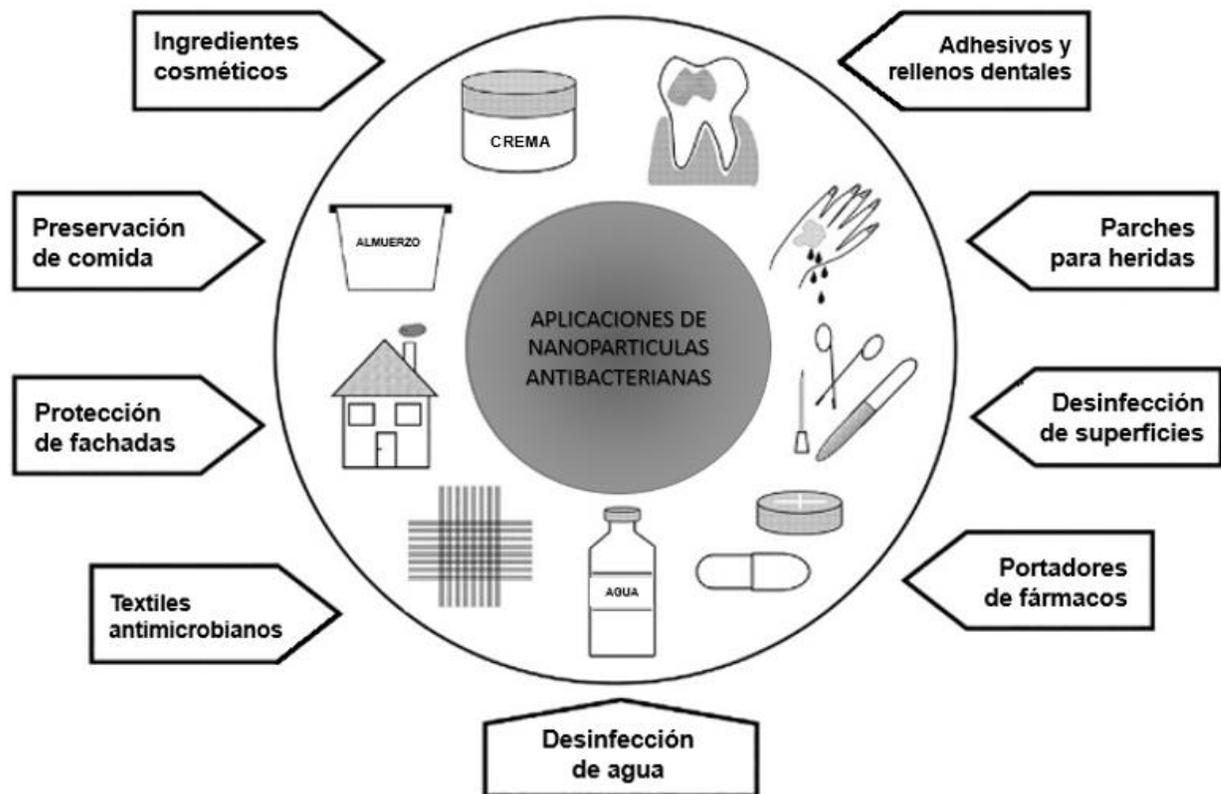


Figura 1. Diagrama de aplicaciones para los efectos antibacteriales de las nanopartículas. Imagen tomada y adaptada de la referencia (Farrokhi *et al.*, 2019).

Con la introducción de la nanotecnología, las nanopartículas metálicas han ganado una mayor relevancia y presencia como agentes antimicrobianos debido a su amplio espectro inhibitorio contra bacterias, hongos y virus (Rai y Shegokar, 2017). Esta propiedad brinda la posibilidad de utilizar nanopartículas metálicas en diferentes aplicaciones (Figura 1).

Aunque el mecanismo antibacteriano no está claro, existen algunas hipótesis sobre los mecanismos de inhibición, tal como se muestra en la Figura 2 (Makvandi *et al.*, 2019) y se describe a continuación:

- 1) Las NPs se acumulan en la superficie de la célula bacteriana debido a la atracción electrostática entre las NPs y la pared celular.
- 2) La interacción con la membrana bacteriana disminuye el potencial electroquímico transmembrana de las bacterias, alterando su integridad.
- 3) Los poros creados en la superficie celular provocan la fuga de componentes intracelulares y la penetración de las NPs en la célula.
- 4) Las NPs liberan iones metálicos y desencadenan la formación de especies reactivas de oxígeno (o ROS, por sus siglas en inglés), dañando el ADN, las proteínas y los lípidos, llevando a la muerte de la célula.

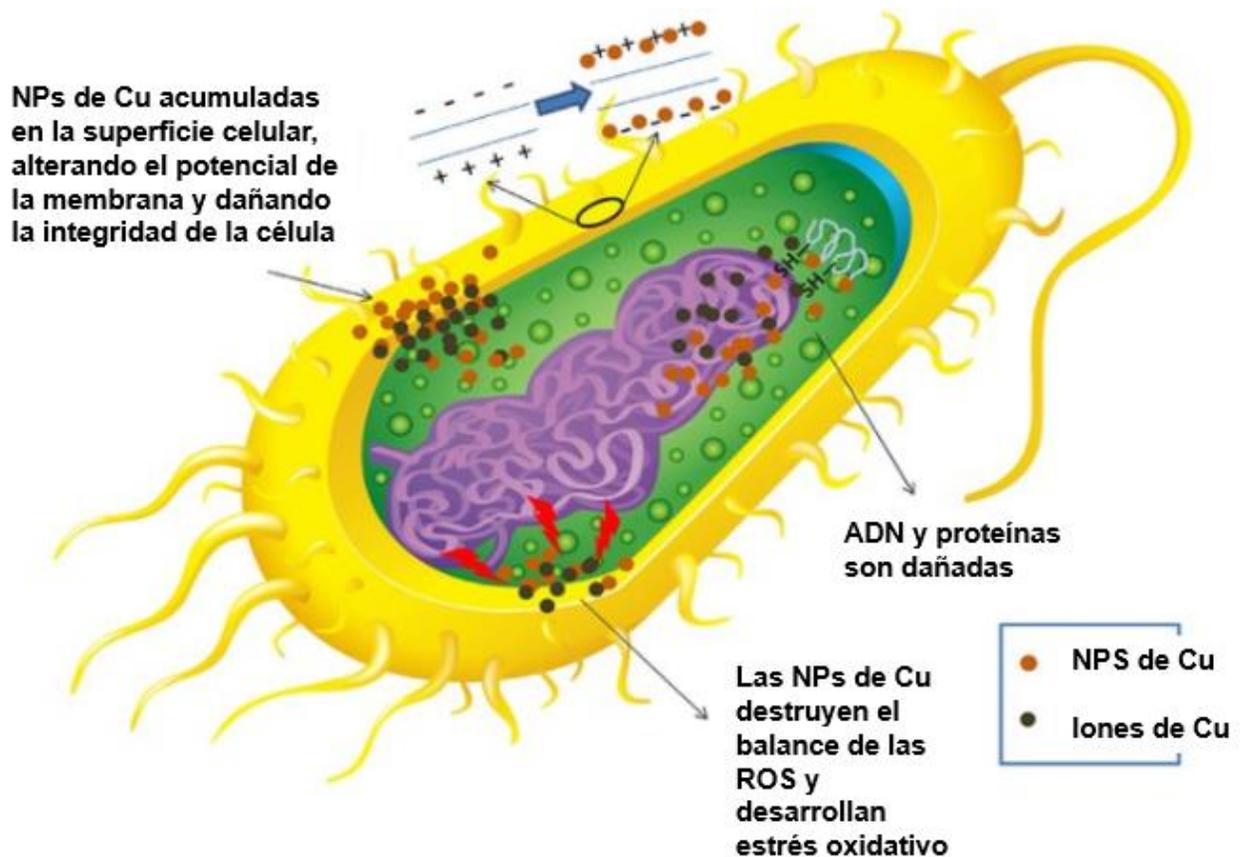


Figura 2. Ilustración del mecanismo antibacteriano de las NPs de Cu en una bacteria. Tomada y adaptada de la referencia (Makvandi *et al.*, 2019).

Antes del desarrollo de antibióticos y otros quimioterápicos, la plata y el cobre se usaban para tratar infecciones microbianas. Desafortunadamente, los compuestos de cobre pueden ser tóxicos para algunos organismos y pueden causar riesgos ambientales. Sin embargo, el cobre en forma de nanopartículas puede ser el sustituto para evitar estas consecuencias (Ingle *et al.*, 2014). Se ha demostrado que las NPs de Cu son eficaces contra diversos patógenos bacterianos, aunque su eficacia antibacteriana es inferior a la de Ag o ZnO.

Sin embargo, existen reportes en la literatura donde se demuestra la eficacia de las NPs de Cu contra bacterias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* (Cubillo *et al.*, 2006), *Bacillus subtilis* (Ruparelia *et al.*, 2008), *Micrococcus luteus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Bacillus megaterium* (Tejeda *et al.*, 2009; Raffi *et al.*, 2010; Theivasanthi y Alagar, 2011).

Por otro lado, Ramyadevi *et al.* (2012) observaron que *Pseudomonas aeruginosa* era resistente a las NPs de Cu. Se ha observado, por ejemplo, que la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de óxido de cobre (CuO) varía mucho dependiendo de la especie bacteriana a tratar. Adicionalmente, se han estudiado diversas aplicaciones para las NPs de Cu en otros ámbitos; Ananth *et al.* (2015) enfatizaron en la importancia de las NPs de Cu como agente esterilizador en el agua, eliminación de arsénico en el tratamiento del agua y terapia antitumoral. Ingle *et al.* (2014) también observaron que las NPs de Cu tienen una capacidad específica como vehículo de fármacos y una capacidad de fotoluminiscencia eficiente y, por lo tanto, son materiales útiles en la administración de fármacos contra el cáncer.

La actividad antimicrobiana de las NPs de Cu puede ser aprovechada en el envasado de alimentos. Longano *et al.* (2012) desarrollaron compuestos de NPs de Cu embebidos en ácido poliláctico (PLA) combinando las propiedades antibacterianas de las nanopartículas con la biodegradabilidad de la matriz polimérica. Los autores concluyeron que los nanocompuestos propuestos son nanomateriales extremadamente atractivos ya que poseen una buena actividad antibacteriana frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

Conte *et al.* (2013) propusieron películas de PLA incrustadas con nanopartículas de cobre (utilizadas para envasar queso fior di latte), y los resultados mostraron que las pruebas *in vivo* e *in vitro* presentaban un excelente potencial para las películas de PLA-cobre para aplicaciones de contacto con alimentos, así como en aplicaciones activas en tecnologías de envasado.

1.2 Justificación

Es bien sabido que existe una amplia gama de NPs de distintos materiales, las cuales son usadas en el área biomédica ya sea como agentes terapéuticos, marcadores o sensores; es por esta razón que se propone probar las NPs de Cu sintetizadas por ablación láser de sólidos en líquidos (ALSL) en la inhibición del crecimiento de la bacteria *E. coli*.

Las propiedades físicas del líquido de ablación son importantes en las propiedades finales de las nanopartículas obtenidas. El uso de diferentes líquidos, por ejemplo, materiales reactivos, como entorno de ablación, potencia a la producción de óxidos o materiales nanoestructurados recubiertos (Tilaki *et al.*, 2007). En este trabajo se utiliza agua, ya que es un medio base para muchas reacciones químicas, y acetona, la cual es útil para fabricar materiales basados en nanocompuestos.

Además, es importante señalar que el desarrollo de este proyecto es de gran interés para el grupo de investigación de Procesamiento de Materiales con Pulsos Ultracortos, del Departamento de Óptica del CICESE, ya que este grupo cuenta con una amplia experiencia en la síntesis de NPs por el método de ALSL, como se muestra en distintas publicaciones sobre la síntesis de NPs de diversos materiales como molibdeno, manganeso, carbono, entre otros (Camacho-López *et al.*, 2014; Enríquez-Sánchez *et al.*, 2020; Reyes-Contreras *et al.*, 2015; Zamora-Romero *et al.*, 2019; Zamora-Romero *et al.*, 2020).

El método de ablación láser de sólidos en líquidos es un método conceptualmente sencillo (síntesis de un solo paso), limpio (no produce residuos tóxicos) y fácil de implementar; lo anterior resulta atractivo en el ámbito de la producción de nanopartículas ya que usualmente estas se obtienen por métodos químicos o físicos muy elaborados e involucrando reactivos que representan cierto riesgo de contaminación o toxicidad.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

El objetivo general es lograr la formación de nanopartículas por medio de la técnica ALSL considerando distintos medios líquidos (agua y acetona), partiendo de un blanco de cobre, para su posterior

caracterización morfológica, estructural, estequiométrica y óptica, además de implementar ensayos de inhibición en *E. coli*.

1.3.2. Objetivos específicos

- Determinar si existe una dependencia entre las características físicas de las nanopartículas, la fluencia por pulso y el número de pulsos láser utilizados en la síntesis.
- Estudiar la influencia de distintos medios líquidos en la obtención de NPs.
- Establecer bajo qué parámetros de irradiación láser y condiciones del medio líquido, es posible producir de manera controlada nanopartículas de cobre.
- Determinar las propiedades morfológicas, estructurales y de composición química de las NPs obtenidas, así como sus propiedades ópticas, usando las técnicas de microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés), espectroscopia micro-Raman y espectroscopia ultravioleta-visible.
- Determinar si es posible la formación de nanopartículas con coraza o huecas.
- Estudiar teóricamente las propiedades ópticas de las NPs a partir del cálculo numérico de la sección transversal de absorción, esparcimiento y extinción.
- Realizar ensayos de inhibición de la bacteria *E. coli* al ser expuestas a las nanopartículas obtenidas.

Capítulo 2. Marco teórico

En este capítulo se presentan los fundamentos para la síntesis de NPs por la técnica ALSL, además de una descripción detallada de los parámetros y conceptos básicos del procesamiento de materiales utilizando pulsos ultracortos; se mencionan las diferencias básicas entre pulsos cortos (ns) y pulsos ultracortos (ps-fs) en el contexto del procesamiento de materiales y los mecanismos físicos involucrados en la interacción luz-materia, para la síntesis de NPs.

2.1 Ablación láser

En años recientes, la síntesis de nanomateriales por la técnica ALSL ha ganado interés por su versatilidad, bajo costo y facilidad de ejecución (Amendola y Meneghetti, 2013). Algunas de sus ventajas principales son:

- Fácil de implementar.
- Obtención de NPs con alta pureza.
- Capacidad de sintetizar una amplia variedad de nanomateriales en variedad de soluciones líquidas.
- Es un método “verde” ya que no es necesario utilizar químicos nocivos y no se producen residuos peligrosos.
- Bajo costo.
- Es de las técnicas más rápidas y limpias para producir nanopartículas.

Sin embargo, entre las desventajas de ALSL para la producción de NPs se puede mencionar que el volumen de producción de NPs es considerablemente menor que el logrado por métodos químicos, por otro lado, por ALSL no se tiene total control de la distribución de tamaños o la morfología en comparación a otros métodos de síntesis.

El proceso de ablación láser consiste en la remoción de material de la superficie de un sólido por la acción de la irradiación láser, ya sea este un láser pulsado o de emisión continua; la energía óptica depositada en la superficie del sólido es absorbida y se produce una rápida fundición-evaporación o sublimación del material. La nube de material evaporado o sublimado alcanza la energía suficiente para experimentar ionización y, por lo tanto, la formación de un plasma. En el procesamiento de materiales, además de utilizarse láseres de onda continua, se utilizan láseres de pulsos ultracortos, principalmente los láseres de pulsos con duración de femtosegundos. Estos tienen la ventaja de que debido a la duración de los pulsos se suprimen en gran medida los efectos térmicos colaterales que pueden afectar el proceso de ablación láser en materiales. Los láseres de femtosegundos más conocidos son aquellos que operan con un cristal de Ti:Za (Titanio-Zafiro), sin embargo, en años recientes se han desarrollado láseres de femtosegundos de fibra óptica.

Por otro lado, los láseres de onda continua tienen la desventaja de que los efectos térmicos que generan contribuyen con un daño colateral significativo que afecta de manera negativa el resultado de ablación, produciendo daño extendido más allá de la zona de interés. Por lo tanto, es preferible llevar a cabo la ablación utilizando láseres pulsados. Un parámetro importante en el procesamiento de materiales con láseres pulsados es la fluencia por pulso F_{pp} , que se define como la energía total por pulso depositada por unidad de área:

$$F_{pp} = \frac{E_{pp}}{A}, \quad (1)$$

en donde E_{pp} es la energía por pulso y A es el área de la sección transversal del haz láser sobre la superficie del sólido.

La remoción de material en la superficie del sólido generada por un pulso ocurre a un valor de fluencia crítica llamada fluencia umbral de ablación por pulso y se denota como $F_{th} [J/cm^2]$. De acuerdo con la ecuación (1), la fluencia por pulso aplicada durante el proceso de ablación se puede variar de dos maneras relativamente simples: ajustando la energía por pulso o bien modificando el tamaño del haz láser sobre la superficie del sólido.

2.2 Procesamiento de materiales con pulsos láser ultracortos

El método para procesar materiales a escala micro o nanométrica con láseres de pulsos ultracortos es una técnica cada vez más utilizada entre la comunidad científica. Aunque los láseres de attosegundos (as, magnitud 10^{-18}) siguen en desarrollo, los láseres de femto (fs, magnitud 10^{-15}), pico (ps, magnitud 10^{-12}) y nanosegundos (ns, magnitud 10^{-9}) se han utilizado ampliamente para estudiar y caracterizar una gran variedad de materiales.

A comparación de los pulsos cortos (ns), los pulsos ultracortos (fs) se caracterizan por intensidades pico extremadamente altas y por la interacción de la luz láser con los materiales en una escala de tiempo mucho menor a la difusión del calor en la red cristalina. Estas dos características permiten a los láseres ultracortos alcanzar una alta precisión y control en el procesamiento de los materiales. Como se muestra en la Figura 3, en el caso de la ablación láser con pulsos cortos de nanosegundos, hay grandes diferencias respecto a la interacción con el material. Por ejemplo, los efectos térmicos en el sólido son significativos debido a que la interacción es más prolongada, permitiendo que el proceso de difusión de calor afecte una zona extendida en el blanco, rebasando la frontera de la zona de irradiación por el haz láser, lo cual resulta en un procesamiento menos preciso y con daño colateral.

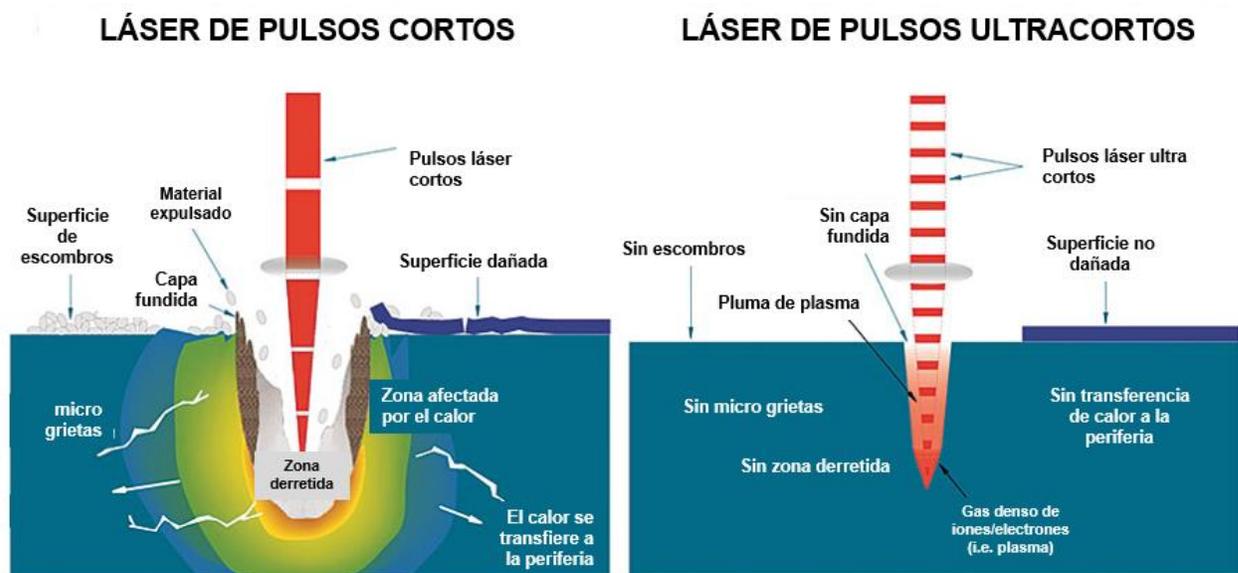


Figura 3. Comparación de ablación con pulsos cortos (izquierda) y pulsos ultracortos (derecha). Tomada y adaptada de la referencia (Amendola y Meneguetti, 2013).

2.3 Ablación láser de sólidos en líquidos para la formación de nanopartículas

La ablación láser induce modificaciones físicas en el material debido a la fragmentación del material en bulto a partir del cual se forman las NPs. En la mayoría de los casos también existen modificaciones químicas del material, es decir, existe la formación de nuevos compuestos y fases.

En la Figura 4 se ilustra el proceso de ablación láser de sólidos en líquidos; este inicia con la absorción del pulso láser en el blanco del material, en seguida se forma una columna de plasma que contiene el material removido y esta se expande hacia el líquido circundante, antecedido por la emisión de una onda de choque. Durante la expansión, la pluma de plasma se enfría y libera energía a la solución líquida. Este fenómeno genera una burbuja de cavitación que se expande en el líquido y luego colapsa en una escala de tiempo del orden de cientos de microsegundos, cuando ocurre el colapso se emite una segunda onda de choque.

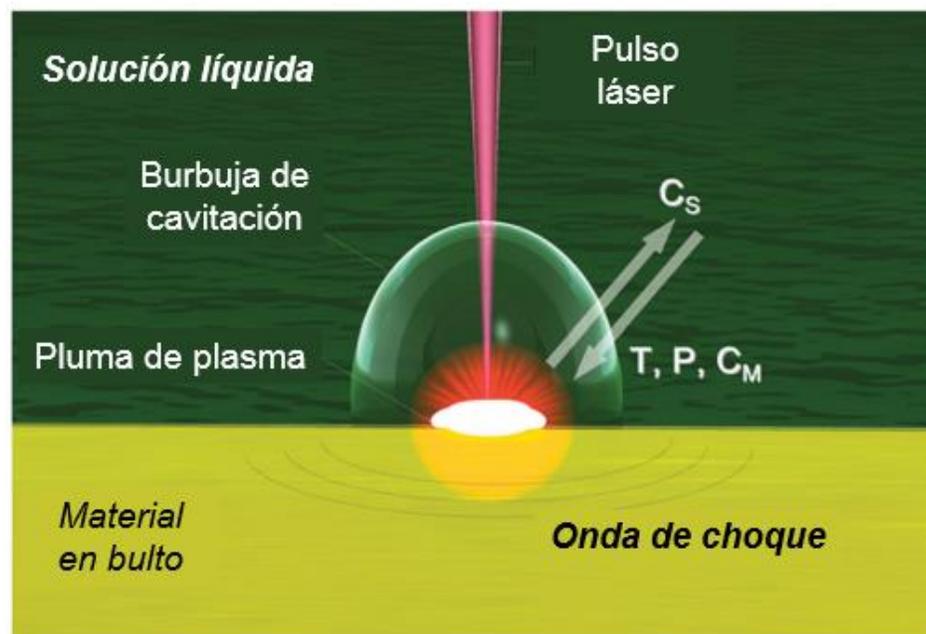


Figura 4. Esquema de las etapas de la ALSL. Tomado y adaptado de la referencia (Amendola y Meneghetti, 2013).

De acuerdo con Amendola y Meneghetti (2013), el mecanismo de la evolución del proceso de ALSL sigue la secuencia mostrada en la Figura 5, la cual se describe a continuación:

1) Penetración del pulso en el medio líquido ($t < 0$)

El pulso del láser atraviesa una capa del líquido antes de alcanzar el blanco. El medio acuoso debe ser elegido de manera que posea propiedades ópticas que permitan la interacción óptica con el blanco, por ejemplo, usualmente se eligen líquidos transparentes para evitar que la energía del pulso sea absorbida por el mismo líquido en vez del blanco del material. El objetivo de esto es evitar el rompimiento dieléctrico del líquido para que no se forme una nube del plasma del líquido, teniendo como consecuencia la formación de múltiples burbujas de cavitación. Esto desencadenaría el apantallamiento del pulso incidente sobre el blanco por absorción óptica en el plasma o por esparcimiento en las burbujas de cavitación, lo que restaría eficacia al proceso de ablación del blanco y finalmente afectaría el mecanismo de formación de las nanopartículas.

2) Absorción del pulso laser (desde $t=0$ a τ_{pulso})

En este intervalo de tiempo dominan las propiedades ópticas del blanco y la duración de pulso, ya que de ellos depende la cantidad de energía del pulso láser que será absorbido por el material, además del mecanismo de interacción que dará lugar al proceso de ablación (evaporación térmica o ionización del blanco).

3) Desprendimiento del material ablacionado (para $t = 10^{-12}s$ a $10^{-10}s$)

Una vez absorbido el pulso láser por el blanco, el material en la superficie comienza a desprenderse debido a procesos de calentamiento, fundición y evaporización. Los electrones de la red cristalina del material son excitados debido a la transferencia de energía cinética (térmica), lo que ocurre en tiempos de ps. La diferencia de temperatura entre la zona irradiada y el resto del sistema es muy grande, y el blanco disipa el calor eficientemente, por lo que el desprendimiento del material ocurre por mecanismos térmicos en la región casi coincidente al área de incidencia del haz láser.

Simultáneo al proceso de ablación, el depósito de la energía del pulso láser eleva la temperatura del líquido, lo que provoca que el cambio de presión en la interfaz haz láser-blanco impulse una onda de choque propagante hacia el blanco y hacia afuera del blanco. El líquido sobrecalentado está sujeto a la liberación espontánea (explosiva) de vapor que impulsa la rápida expansión del material, promoviendo el desprendimiento de materia del cráter.

4) Expansión y enfriamiento de la pluma del plasma ($t = 10^{-10} s$ a $10^{-7} s$)

Además de la ebullición durante la interacción haz-blanco debido al calentamiento del líquido, se genera una pluma de plasma; este plasma interactúa con el blanco y el medio líquido, lo cual conlleva a la formación de NPs por descomposición del material. La obtención de NPs ocurre en un lapso más largo que la duración del pulso láser, manteniéndose hasta la extinción del plasma debido al enfriamiento.

Debido a la interacción del plasma con el medio líquido, se favorece la formación de una burbuja de cavitación. Esta burbuja confina el plasma cerca de la superficie del blanco, controlando la tasa de enfriamiento del plasma, por lo que este se prolonga algunos nanosegundos después de que termina el pulso del láser.

5) Expansión y colapso de la burbuja de cavitación $t = 10^{-6} s$ a $10^{-4} s$)

Como se mencionó en el apartado anterior, la energía liberada por el plasma (ahora ya extinto) hacia el medio líquido, induce la creación de la burbuja de cavitación. Durante su expansión, la temperatura de la burbuja decrece y la presión interna de la misma baja a un valor aún menor al del medio líquido. En esta etapa la burbuja colapsa, emitiendo una onda de choque. Este es el último proceso físico relacionado a la ablación láser del sólido en un líquido. Cabe mencionar que aún no está claro en qué etapa exactamente se da la formación de las NPs y su distribución espacial, cuando inicia la expansión de la burbuja o durante el colapso.

6) Crecimiento lento y aglomeración de las NPs ($t > 10^{-4} s$)

Cuando se extingue la onda de choque generada por el colapso de la burbuja de cavitación, el sistema alcanza un estado físico-químico estable. En esta etapa, las NPs pueden sufrir ligeras modificaciones debido a la condensación de material ablacionado y grupos moleculares que aún sobreviven en solución. Si la dispersión de las NPs no es estable, empezará la aglomeración de ellas, produciendo precipitación en una escala de tiempo superior a minutos para partículas micrométricas y nanométricas. Por último, dependiendo de la composición de las NPs, el proceso de oxidación en su superficie puede ocurrir en esta etapa.

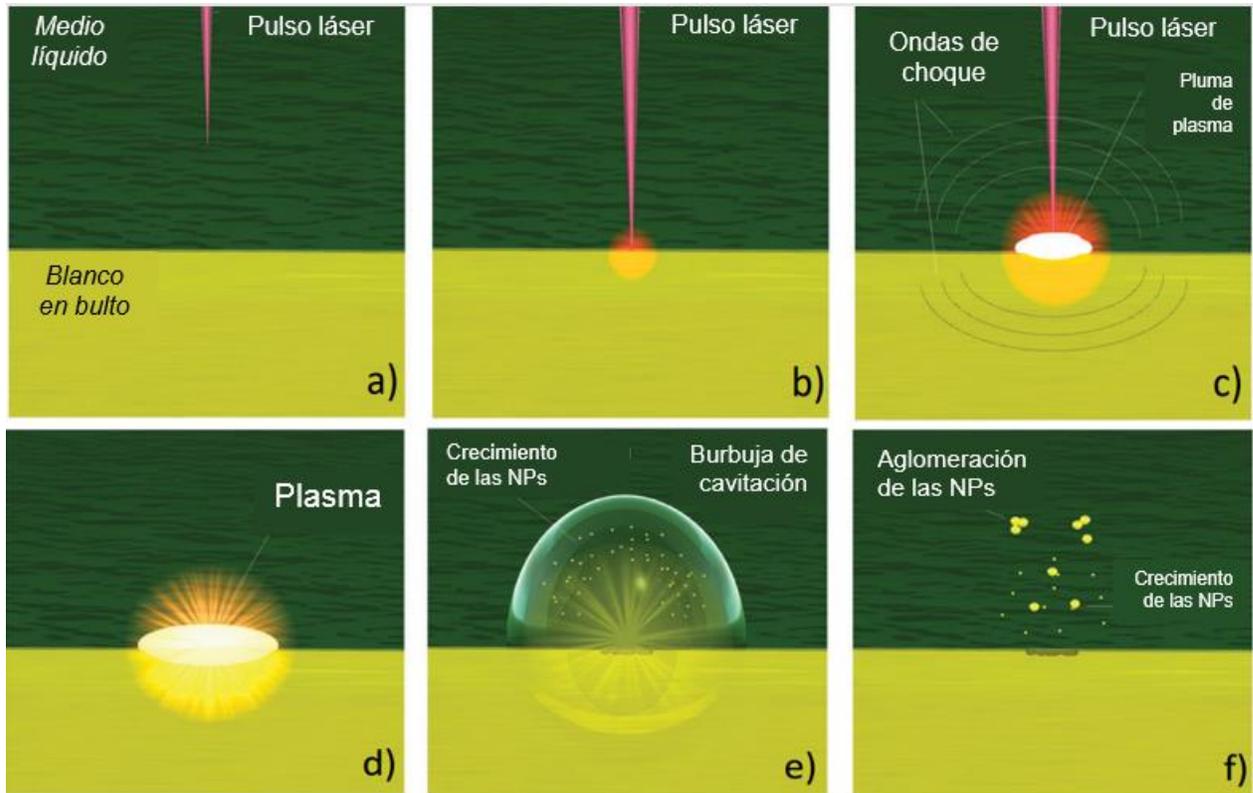


Figura 5. Evolución del proceso de ablación para la obtención de NPs. Tomado y adaptado de la referencia (Amendola y Meneguetti, 2013).

2.4 Parámetros de irradiación láser

El proceso de ablación láser de sólidos en líquidos conlleva complejos fenómenos físico-químicos que no necesariamente nos brinda NPs de la misma fase y composición que el blanco del material. Sin embargo, distintos materiales muestran distintas reacciones ante distintos medios bajo las mismas condiciones experimentales.

En la siguiente sección se discuten los parámetros láser más importantes para determinar las características de los nanomateriales sintetizados a través de la ablación láser.

2.4.1 Longitud de onda del pulso

Se debe conocer a qué longitud de onda presenta absorción óptica el medio líquido, lo cual ocasionaría que la energía depositada sobre el blanco sólido sufra una atenuación igualmente importante, afectando la eficiencia de ablación y por lo tanto la producción de nanopartículas. De igual manera, hay que tomar en cuenta el coeficiente de absorción del blanco, ya que este parámetro define la cantidad de energía láser absorbida en el material, y la profundidad de penetración óptica, la cual está dada por el inverso del coeficiente de absorción.

Además, según la literatura, a longitudes de onda más cortas como el UV, los materiales metálicos presentan cráteres de ablación bien definidos y confinados al área irradiada, esto en comparación con la ablación en el infrarrojo cercano que es absorbida por defectos e impurezas en blancos metálicos y que generan un perfil irregular de ablación en el área irradiada (Amendola y Meneghetti, 2013).

2.4.2 Fluencia del pulso

La fluencia es de los parámetros más importantes en el procesamiento de materiales. Cuando se quiere realizar ablación láser sobre un blanco, primero es necesario caracterizar la fluencia umbral de ablación del material. La fluencia umbral de ablación define la densidad de energía necesaria para iniciar la remoción de material en la superficie del material. Sadrolhosseini *et al.*, (2018), reporta que, a fluencias mayores, se producen nanopartículas con un tamaño mayor y distribución de tamaños más amplia.

2.4.3 Duración del pulso

Como se ha mencionado hasta ahora, este parámetro tiene una fuerte influencia en la distribución de tamaños de las NPs, estructura y composición. Para la realización de este trabajo se utilizaron pulsos ultra cortos de 270 fs de duración.

2.4.4 Frecuencia de repetición

La frecuencia de repetición define el intervalo temporal entre cada pulso, lo que implica que, a mayor frecuencia de repetición de los pulsos láser, menor es el intervalo temporal entre los mismos. La producción de NPs por unidad de tiempo incrementa con la frecuencia de repetición; sin embargo, un incremento lineal ocurre solo para intervalos de tiempo entre pulsos láser mayores al tiempo de vida de la burbuja de cavitación. Otro factor que se debe considerar es que para frecuencias de repetición altas, donde la separación entre pulsos consecutivos es menor al tiempo característico de difusión de calor, la modificación del blanco se acentúa debido a efectos térmicos acumulativos, o bien efectos de incubación, ya que cada pulso que llega al blanco lo modifica en cierto grado, por lo que cada pulso que incide sobre el mismo punto del blanco interactúa con un blanco que ha sido modificado por el pulso inmediatamente anterior.

2.4.5 Número de pulsos

El número de pulsos utilizado durante la irradiación es proporcional al tiempo que la muestra es sometida a irradiación láser y determina la cantidad de nanopartículas que serán obtenidas. Sin embargo, las NPs obtenidas de la ablación también puede sufrir modificaciones al incrementarse el número de pulsos; por ejemplo, las NPs en suspensión en el medio líquido se verán expuestas a interactuar con el haz láser incidente durante el proceso de síntesis, por lo que estas pueden sufrir fragmentación al ser irradiadas por los pulsos láser hasta completar la síntesis.

2.5 Efectos plasmónicos en las nanopartículas metálicas

Las NPs metálicas presentan propiedades plasmónicas, en donde los electrones de conducción del metal oscilan colectivamente en respuesta a la luz incidente. Esto se debe a que, en los metales, los electrones se encuentran altamente deslocalizados o menos confinados, ya que la separación entre la banda de conducción y la banda de valencia desaparece, permitiendo que el material absorba la radiación electromagnética en un amplio rango de energía. Sin embargo, cuando un metal se encuentra en una escala nanométrica donde la longitud de onda es mayor que el tamaño de la partícula metálica, la

separación entre las bandas de valencia y de conducción aumenta, por lo tanto, el espacio que tienen los electrones para moverse es menor, ocurriendo un confinamiento cuántico; en el momento que la luz incide sobre la partícula, se da un movimiento oscilatorio colectivo de los electrones de conducción que se encuentran en o cerca de la superficie de la NP. A esta oscilación de los electrones en respuesta a la luz incidente se le conoce como Resonancia de Plasmón de Superficie Localizado (o SPR por sus siglas en inglés) (Bozzola, Perotto y De Angelis (2017), y se muestra esquemáticamente en la Figura 6. Cabe mencionar que para producir dichos efectos plasmónicos, debe cumplirse que la interacción ocurra en una interfaz metal-dieléctrico.

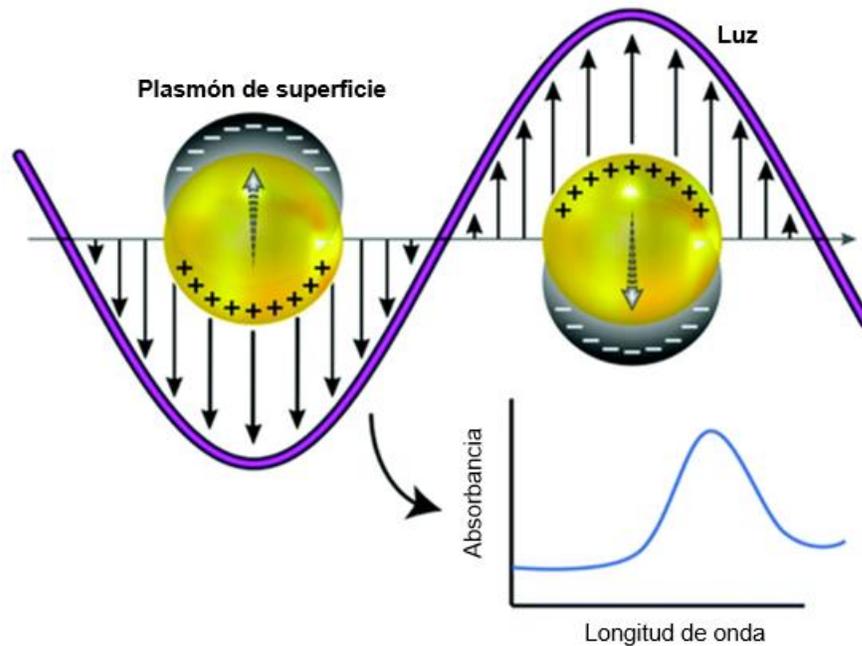


Figura 6. Ilustración de un plasmón de superficie localizado. Tomado y adaptado de la referencia (Masson, 2020).

La absorción asociada a la resonancia del plasmón de superficie puede inducir un aumento de temperatura de la NP cuando ésta se irradia con luz a la longitud de onda coincidente con dicha resonancia; este aumento de temperatura puede utilizarse para causar daño celular (Pfeiffer, 2018).

Las nanopartículas plasmónicas también exhiben interesantes propiedades de dispersión, absorbancia y acoplamiento basadas en sus geometrías, tamaños, composición y posiciones relativas. Estas propiedades

únicas los han convertido en un foco de investigación en muchas aplicaciones, incluidas las celdas solares, la espectroscopia, la mejora de la señal para la obtención de imágenes y el tratamiento del cáncer.

Las NPs obtenidas en este trabajo son predominantemente esféricas y con dimensiones mucho menores a la longitud de onda de irradiación, por lo que se puede utilizar la aproximación cuasiestática para determinar las secciones transversales de esparcimiento y absorción de las nanopartículas.

Dichas ecuaciones son:

$$\sigma_{sc} = \frac{8\pi}{3} k^4 R^6 \left| \frac{\epsilon_{particula} - \epsilon_{medio}}{\epsilon_{particula} + 2\epsilon_{medio}} \right|^2 \quad (2)$$

$$\sigma_{abs} = 4\pi k R^3 \text{Im} \left| \frac{\epsilon_{particula} - \epsilon_{medio}}{\epsilon_{particula} + 2\epsilon_{medio}} \right| \quad (3)$$

$$k = \sqrt{\epsilon_{particula} \frac{\omega}{c}}, \quad (4)$$

donde:

σ_{sc} : sección transversal de esparcimiento

σ_{abs} : sección transversal de absorción

k : número de onda del campo eléctrico

R : radio de la partícula

ϵ_{medio} : permitividad relativa del medio dieléctrico

$\epsilon_{particula}$: permitividad relativa de la nanopartícula, la cual se define como:

$$\epsilon_{particula} = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\omega\gamma} \quad (5)$$

$$\omega_p = \sqrt{3}(\omega_{res}) . \quad (6)$$

Lo anterior es conocido como el Modelo de Drude para electrones libres, donde ω_p es la frecuencia del plasma, γ es la frecuencia de relajación de los portadores de carga, ω es la frecuencia de la radiación electromagnética, y ω_{res} es la frecuencia clásica del plasmón de superficie.

Por lo tanto, la sección transversal de extinción será:

$$\sigma_{ext} = \sigma_{sc} + \sigma_{abs}. \quad (7)$$

El modelado y la simulación de las propiedades ópticas de las NPs de Cu tipo núcleo-coraza son de gran importancia para comprender la naturaleza de los plasmones superficiales localizados. En este trabajo, se diseñó un modelo numérico a partir de la teoría de Mie utilizando el software COMSOL Multiphysics, el cual funciona en base al Método de Elementos Finitos (ver Capítulo 3.4 Simulaciones en COMSOL para nanopartículas).

2.6 Efectos de oxidación en las propiedades ópticas de NPs de Cu

Uno de los retos al utilizar NPs de Cu, es que, al exponerse a una atmósfera normal, las nanopartículas exhiben la formación de una capa muy delgada de óxido que se conoce como óxido nativo, el cual influye en las propiedades ópticas de las mismas. Dicha oxidación en la superficie del material es con frecuencia visto como un efecto negativo, sin embargo, se han realizado varios estudios para buscar aplicaciones útiles de este efecto. La oxidación nativa o inducida de las nanopartículas es un método efectivo y simple para la fabricación de óxido nanoestructurado y/o para la síntesis de nanomateriales con núcleo metálico y coraza de óxido.

Peña-Rodríguez y Pal (2011) demostraron que la posición del SPR puede sintonizarse variando el espesor de la coraza de óxido, y que, para ciertos valores de dicho espesor, la ganancia de intensidad del SPR puede incrementarse hasta un 30%.

Purohit *et al.* (2020) estudió el efecto de la coraza de distintos óxidos variando los espesores de ésta, sintonizando e incrementando la intensidad del SPR a cierta longitud de onda, y finalmente llevando a cabo un atrapamiento óptico de NPs de Cu individuales (lo que se conoce como pinzas ópticas, o en inglés, optical tweezers).

Yoon *et al.* (2008), así como el grupo de Lee *et al.* (2015), probaron que las propiedades ópticas en las bandas desde el UV hasta el visible para nanopartículas de tipo núcleo-coraza, con un núcleo de cobre y una capa de carbono, pueden ser ajustadas modificando el núcleo o la coraza de la NP. Wang *et al.* (2012) encontró que el grosor de la coraza de carbono y el grado de grafeno presente en la NP, determina el estado electrónico de la superficie en el núcleo de cobre, causando un corrimiento del pico de absorción plasmónica.

2.7 Características del cobre

El cobre posee varias propiedades físicas que propician su uso industrial en múltiples aplicaciones, siendo el tercer metal, después del hierro y del aluminio, más consumido en el mundo. Es de color rojizo y de brillo metálico y, después de la plata, es el elemento con mayor conductividad eléctrica y térmica. Es un material abundante en la naturaleza; tiene un precio accesible y se recicla de forma indefinida; forma aleaciones para mejorar las prestaciones mecánicas y es resistente a la corrosión y oxidación. Su estructura cristalina se puede observar en la Figura 7. Algunas de las propiedades térmicas, físicas y ópticas del cobre con mayor relevancia son mencionadas en la Tabla 1.

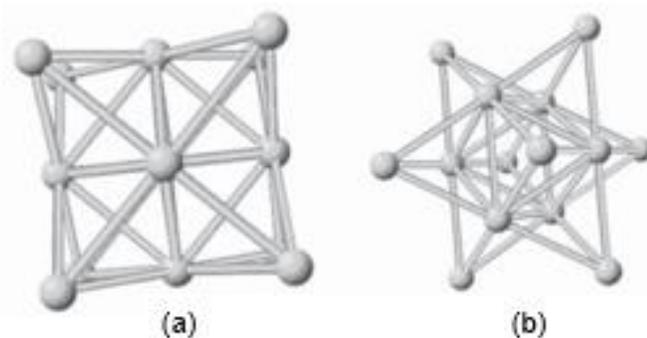


Figura 7. Estructura cristalina del cobre. (a) Celda FCC-Face Centered Cubic, vista frontal. (b) Celda FCC, vista lateral. Tomado de la referencia (Jaramillo, Sanchez y Amaris, 2006).

En la mayoría de sus compuestos, el cobre presenta estados de oxidación bajos, siendo el más común el +2, aunque también existen algunos con estado de oxidación +1.

Tabla 1. Propiedades térmicas, físicas y ópticas del cobre.

	Notación	Propiedad	Valor	Unidad
Propiedades térmicas y físicas	κ	Conductividad térmica a 20°C	3.94	W/m·K
	C_p	Capacidad de calor específico	376.81	J/kg·K
	ρ	Densidad	8.94	g/cm ³
	D	Difusividad térmica a 25°C	1.11E-4	m ² /s
	T_e	Temperatura de ebullición	2597	°C
	T_f	Temperatura de fusión	1083	°C
Parámetros ópticos a 1030 nm	n	Índice de refracción	0.3376	-
	k	Coeficiente de extinción	6.7731	-
	α	Coeficiente de absorción	8263.4	m ⁻¹
	ϵ_R	Permitividad relativa real	-45.76	-
	ϵ_I	Permitividad relativa imaginaria	4.5744	-
	F_{th}	Fluencia umbral de ablación	1.7 ±0.3	J/cm ²

Expuesto al aire, el oxígeno y el cobre al combinarse forman materiales muy interesantes, entre ellos el óxido de cobre (I) y óxido de cobre (II), los cuales son los más comunes y se encuentran en la naturaleza. En la Tabla 2 se mencionan las constantes ópticas del cobre, del óxido cúprico y del óxido cuproso.

2.7.1 Óxido cuproso (Cu₂O)

El óxido cuproso, también llamado óxido de cobre (I), monóxido de dicobre y óxido de dicobre, es uno de los óxidos de cobre más comunes. Tiene propiedades diamagnéticas, de semiconductor y fungicidas. Se cristaliza en forma de cubos y es de color rojizo, a veces amarillo dependiendo de su tamaño. Es insoluble en agua, es soluble solo en ácidos. En la Figura 8 observamos la estructura cristalina del óxido cuproso, así como su forma en polvo.

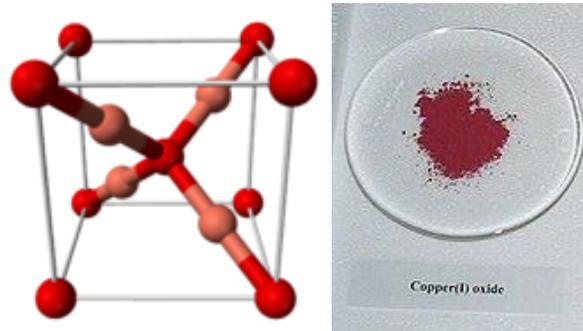


Figura 8. Estructura cristalina del óxido cuproso y su forma en polvo. Tomado de la referencia (Wikipedia Contributors, 2022).

2.7.2 Óxido cúprico (CuO)

El óxido cúprico, también llamado óxido de cobre (II) o simplemente óxido de cobre, pertenece al sistema monoclínico y suele ser de color negro o pardo (Figura 9). Se disuelve solo en ácidos y tiene propiedades biocidas. Los biocidas pueden ser sustancias químicas sintéticas o de origen natural o microorganismos que están destinados a destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer un control de otro tipo sobre cualquier organismo considerado nocivo para el ser humano. Algunos ejemplos: Los pesticidas y los agentes antimicrobianos (germicidas, antivirales, anti fúngicos, antiparásitos, antibacteriales, etc).

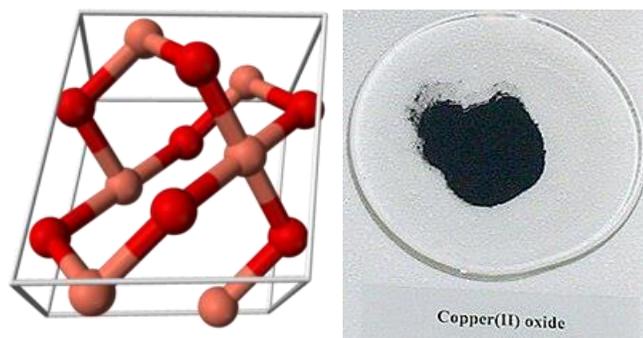


Figura 9. Estructura cristalina del óxido cúprico y su forma en polvo. Tomado de la referencia (Wikipedia Contributors, 2021).

Tabla 2. Constantes ópticas del cobre y sus óxidos.

Material	Índice de refracción (n)	Coefficiente de extinción (k)	Permitividad relativa (ϵ)	Coefficiente de absorción (α)
Cobre (Cu)	0.33769	6.7731	$\epsilon_1 = -45.76$ $\epsilon_2 = 4.574$	$8.263e5 \text{ cm}^{-1}$
Oxido cúprico (CuO)	0.8640	0.2040	$\epsilon_1 = 0.7048$ $\epsilon_2 = 0.3525$	$7.366e5 \text{ cm}^{-1}$
Oxido cuproso (Cu ₂ O)	2.2620	0.0250	$\epsilon_1 = 5.1160$ $\epsilon_2 = 0.1131$	1256.6 cm^{-1}

2.8 Nanopartículas con actividad antimicrobiana

Recientemente, numerosos estudios han demostrado que diferentes nanopartículas de óxidos metálicos presentan acción biocida frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas. Se sabe que la actividad antimicrobiana de las nanopartículas es función del área de superficie en contacto con los microorganismos (Ravishankar y Jamuna 2011; Franci *et al.*, 2015; Chiriac *et al.*, 2016). El efecto bactericida de las nanopartículas metálicas se ha atribuido a su tamaño diminuto y a la razón superficie / volumen, lo que les permite interactuar estrechamente con las membranas microbianas, por lo que el efecto bactericida no se debe simplemente a la liberación de iones metálicos en solución (Ruparelia *et al.*, 2008). Los iones metálicos específicos (metales esenciales) son indispensables para la bioquímica de la vida en todos los organismos, y su privación puede causar daños en la estructura de las membranas celulares y el ADN. Sin embargo, el exceso de estos iones o la presencia de otros iones no esenciales (como Ag) puede ser letal para las células, a menudo causado por estrés oxidativo, disfunción de las proteínas o daño de la membrana (Figura 10) (Lemire *et al.*, 2013; Beyth *et al.*, 2015).

La acción bactericida depende de varios factores como el tamaño, composición química, recubrimiento, forma, carga eléctrica, medio en el que se encuentren dispersas y concentración utilizada de NPs (Seil y Webster, 2012; Hajipour *et al.*, 2012).

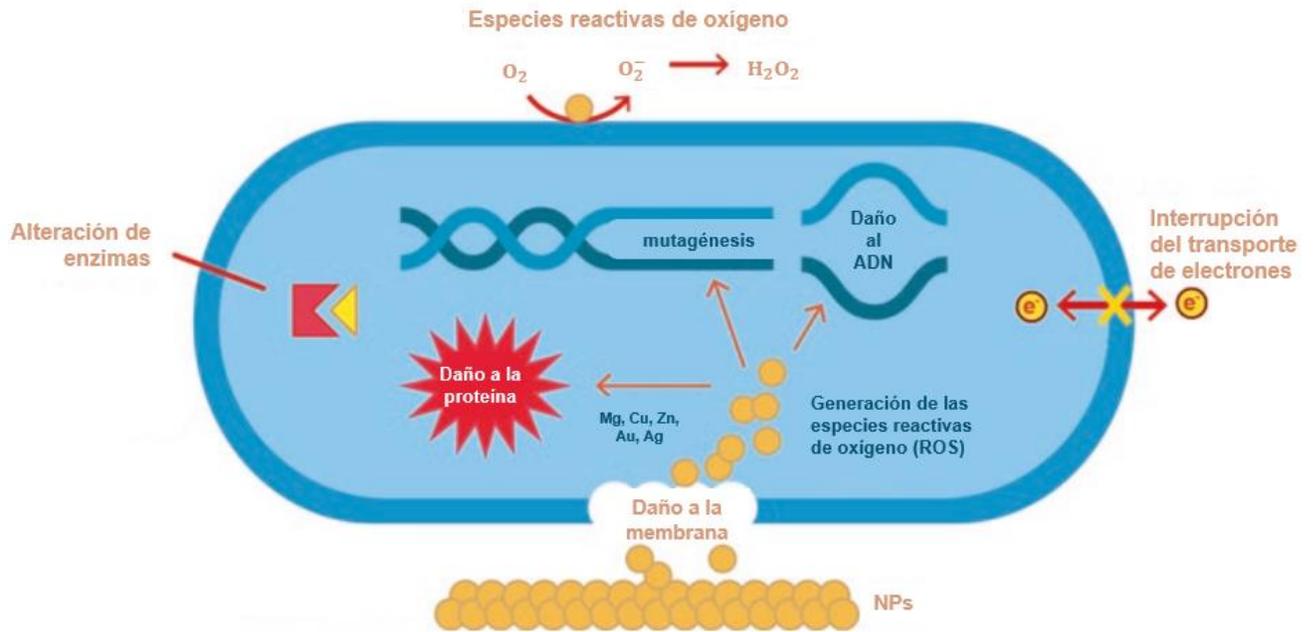


Figura 10. Efectos antibacteriales de las nanopartículas metálicas. El efecto bactericida de las nanopartículas metálicas se atribuye a su tamaño pequeño y a su relación radio-volumen, el cual permite una interacción más cercana con las membranas bacterianas. Después de la interacción con las células objetivo, las nanopartículas metálicas pueden inducir pérdida de la integridad de la membrana, estrés oxidativo y daños a las proteínas y ADN. Tomado y adaptado de la referencia (Brandelli *et al.*, 2018).

Para este trabajo, el microorganismo de estudio elegido es la bacteria *Escherichia coli* debido a su importancia tanto en el campo de la investigación básica como en el de su incidencia en salud pública.

2.8.1 *Escherichia coli*

Descrita por primera vez en 1885 por Theodor Escherich en 1885 (quien denominó a la bacteria como *Bacterium coli commune*, pero la taxonomía le adjudicó el nombre de *Escherichia coli* en honor a su descubridor), es un bacilo Gram negativo perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, es oxidasa negativo, no catalasa positivo, anaerobio facultativo, cuya temperatura de crecimiento preferente es 37°C. Su morfología se observa en la Figura 11.

En general la familia Enterobacteriaceae contiene una estructura antigénica muy compleja, con más de 150 tipos de antígeno O (lipopolisacárido), 100 antígenos K (capsular) y 50 antígenos H (flagelar), de los cuales la mayoría son identificables y nos permiten clasificar a las cepas en serotipos (Brooks *et al.*, 2007).

E. coli es principalmente una bacteria comensal que se encuentra colonizando el intestino de la mayoría de los mamíferos. Sin embargo, debido a eventos de recombinación y transferencia horizontal de genes por elementos genéticos móviles como plásmidos, bacteriófagos e islas de patogenicidad, *E. coli* ha sufrido modificaciones que permitieron el surgimiento de distintos patotipos como *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC), adherencia difusa (DAEC) y uropatógena (UPEC) que poseen la capacidad de colonizar e infectar el sistema gastrointestinal provocando diarrea u otras regiones del cuerpo humano como el tracto urinario y sistema circulatorio, lo que conlleva a la aparición cada vez más frecuente de infecciones extraintestinales (Croxen y Finlay, 2010; Friedmann, 2006).

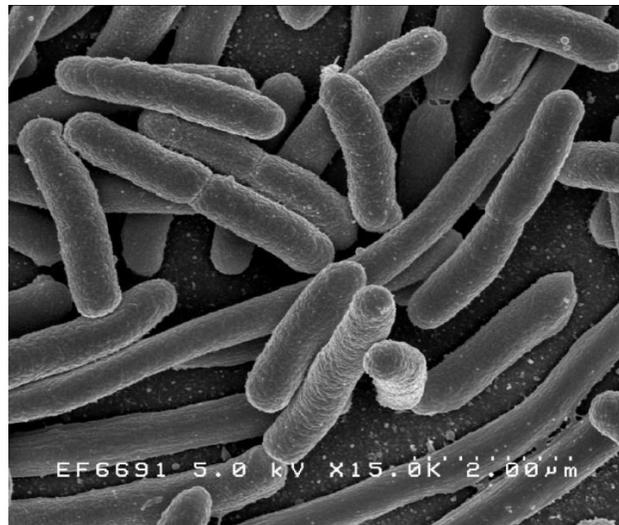


Figura 11. Imagen SEM de bacterias de *Escherichia coli*.

Capítulo 3. Metodología

En el presente capítulo se describe la metodología experimental que se utilizó para la síntesis de NPs de Cu mediante la técnica ALSL, así como la metodología para la implementación del modelo numérico en el software COMSOL Multiphysics, basado en el Método de Elementos Finitos, para estudiar las propiedades ópticas de las nanopartículas. Además, se describen brevemente las técnicas y el proceso de caracterización de las nanopartículas.

3.1 Arreglo experimental

Para la síntesis de las nanopartículas se utilizó el montaje experimental mostrado en la Figura 12, el cual consiste en hacer incidir un láser pulsado, sobre un blanco (en este caso cobre), con el propósito de remover/desprender material (ablación láser) del blanco de cobre, el cual está inmerso en un líquido.

Los parámetros de irradiación que determinan la síntesis de las NPs son los siguientes: longitud de onda, fluencia por pulso, frecuencia de repetición de los pulsos láser y velocidad de barrido del haz láser sobre la superficie del blanco.

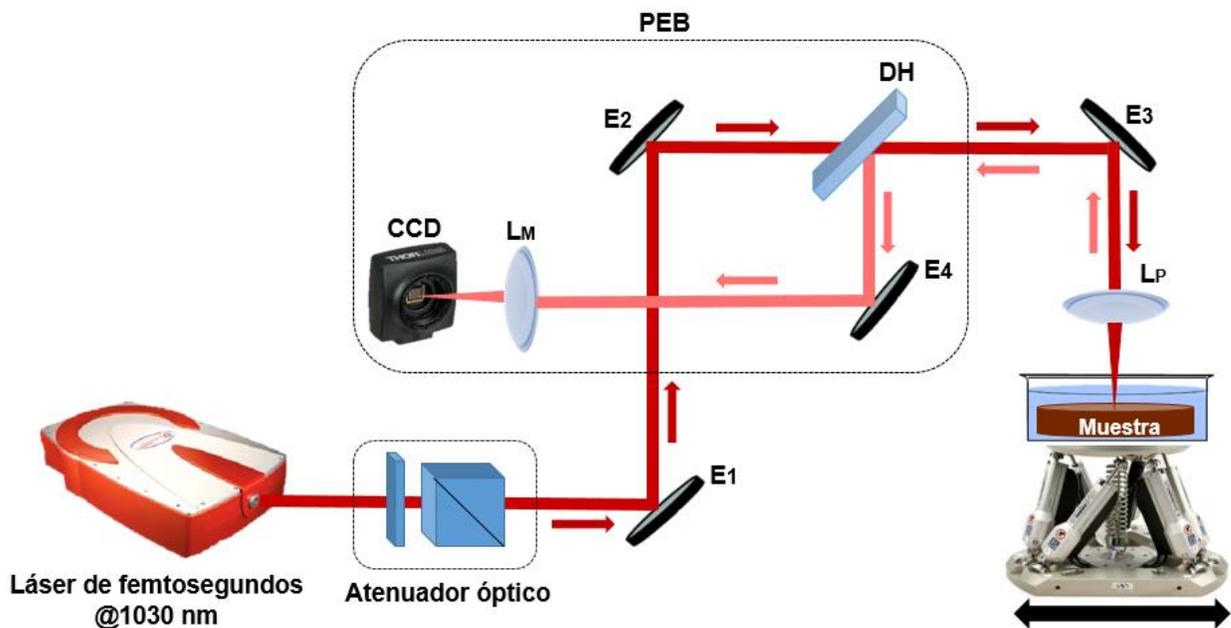


Figura 12. Arreglo Experimental para la síntesis de NPs de Cu mediante la técnica de ablación láser de sólidos en líquidos (ALSL) con un láser pulsado de fibra con duración del pulso de 270 fs.

Como se observa en la Figura 12, a la salida del láser (Satsuma Amplitud HP2), el haz pasa por un par de elementos ópticos (placa retardadora de media onda, y un cubo polarizador) con el fin de ajustar/atenuar la energía de los pulsos. Posterior a esto, el haz llega a un espejo periscopio, encargado de direccionar el haz hacia la parte superior del arreglo donde llega a otro espejo, pasa por un divisor de haz (92%T-8%R) y finalmente llega a otro espejo el cual direcciona el haz hacia la lente de procesado (LP) con una distancia focal $f_p = 150 \text{ mm}$, la cual enfoca el haz sobre la superficie del blanco de cobre. El haz es reflejado en la superficie del blanco sobre el cual se va a realizar ablación siendo la cantidad de luz reflejada dependiente de las propiedades ópticas intrínsecas del blanco. El blanco se coloca dentro del recipiente con el medio líquido, el cual está montado sobre una plataforma llamada "Hexapod" que tiene 6 ejes de libertad para realizar los barridos.

El haz retro-reflejado por el blanco, pasa a través de la lente de procesado, llega al espejo y nuevamente incide sobre el divisor de haz, que se encarga de enviar el haz de luz hacia el espejo y desde este a la lente magnificadora (LM) de distancia focal $f_M = 300 \text{ mm}$, que enfoca sobre una cámara CCD; esta parte del arreglo es lo que se conoce como el plano equivalente de blanco (PEB). La cámara CCD ubicada en el PEB permite capturar el perfil de intensidad del haz incidente; de esta manera se puede caracterizar en tiempo real la distribución de intensidad sobre el blanco. Se puede conocer con exactitud no solo el tamaño del haz, sino también el perfil de intensidad y la ubicación de la cintura del haz con respecto a la superficie del blanco. Si se conoce con precisión el tamaño del haz sobre la superficie del blanco entonces se puede determinar la fluencia por pulso incidente. Esta fluencia por pulso se determina de la energía por pulso que lleva el haz, la cual es cuantificada por un medidor de energía que se coloca al momento frente a la muestra, y el área de la sección transversal del haz en la superficie del blanco, la cual se obtiene de la medición en el plano equivalente de blanco con la cámara CCD. Con el propósito de remover/desprender material y sintetizar las nanopartículas, se utilizan valores de fluencia por encima del umbral de ablación del Cu ($1.74 \pm 0.063 \text{ J/cm}^2$).

3.1.1 Sistema de Plano Equivalente de Blanco

En la Figura 12 se observa el sistema de monitoreo Plano Equivalente de Blanco (PEB). Su funcionamiento se basa en la luz del haz láser que es retro-reflejada por la muestra (en la imagen corresponde al camino en rosa).

El sistema PEB está compuesto por una lente de procesamiento de 150 mm (Thorlabs LA1951-B), una lente de magnificación de 300 mm (Thorlabs LA1484-B), un divisor de haz (92%T-8%R, Thorlabs BP108) y una cámara CCD (Thorlabs DCC16445-HQ), en donde la magnificación está dada de la siguiente manera:

$$M = \frac{f_M}{f_p}, \quad (8)$$

con f_M la distancia focal de la lente de magnificación y f_p es la distancia focal de la lente de procesamiento.

3.1.2 Caracterización del haz láser

La caracterización del haz láser incidente nos ayuda a calcular el área efectiva del haz láser enfocado sobre la superficie del blanco, la cual será utilizada para determinar la fluencia por pulso. Este procedimiento se realizó capturando una imagen por medio del sistema PEB. El perfil de intensidad de la imagen capturada fue extraído con ayuda del Software ImageJ.

Debido a que el perfil del haz láser enfocado es ligeramente elíptico, se requieren tomar los perfiles a lo largo de sus ejes mayor y menor (Figura 13).

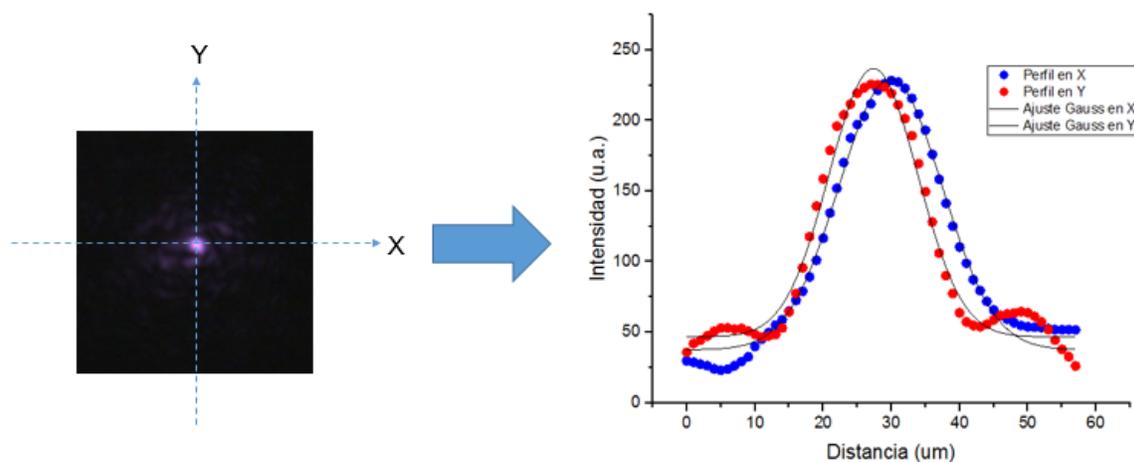


Figura 13. Perfiles de intensidad del haz láser.

El eje mayor, denominado en este caso eje X, y el eje menor, denominado eje Y, se procesaron en el software Origin, donde los perfiles fueron graficados y se les realizó un ajuste Gaussiano. Se determinó el ancho del haz a la mitad del máximo de intensidad (FWHM, por sus siglas en inglés “Full Width at Half Maximum”), teniendo como resultado los siguientes valores:

$$\text{FWHM}_x = 15.273 \mu\text{m}$$

$$\text{FWHM}_y = 17.775 \mu\text{m}$$

Una vez obtenido el tamaño del haz en el plano equivalente de blanco, se prosigue a calcular las dimensiones reales del haz en la superficie del blanco y el área efectiva de su sección transversal usando las siguientes expresiones:

$$D_i = \frac{\text{FWHM}_i * \text{Tamaño de pixel}}{\text{Magnificación}} \quad (9)$$

$$A = \pi * \omega_x * \omega_y, \quad (10)$$

donde

D_i : diámetro en x o y

FWHM_i : ancho del haz a la mitad de la máxima intensidad en x o y

Tamaño de pixel: de la cámara utilizada

Magnificación: utilizando las distancias focales de las lentes utilizadas

A: área de la sección transversal del haz

ω_i : radios para “x” y “y”, es decir la mitad del diámetro de la cintura del haz.

3.2 Fluencia umbral de ablación del cobre

Un parámetro muy importante de conocer o determinar, cuando se trabaja en el procesamiento de materiales con láseres pulsados, es la fluencia umbral de ablación del material. Este umbral establece la posibilidad de remover material en la superficie de la muestra de interés. En el caso que estudiamos en esta tesis, la síntesis de nanopartículas requiere del fenómeno de ablación para proveer el material a partir del cual se generarán las nanopartículas. Por lo tanto, la primera tarea de este trabajo consistió en determinar la fluencia umbral del blanco de cobre por medio del software Origin. De acuerdo a Byskov-Nielsen *et al.* (2010), la metodología para este procedimiento es la que se describe a continuación.

Primeramente, se realiza una matriz de ablación variando en las columnas el número de pulsos y en los renglones la energía por pulso como se muestra en la Figura 14.

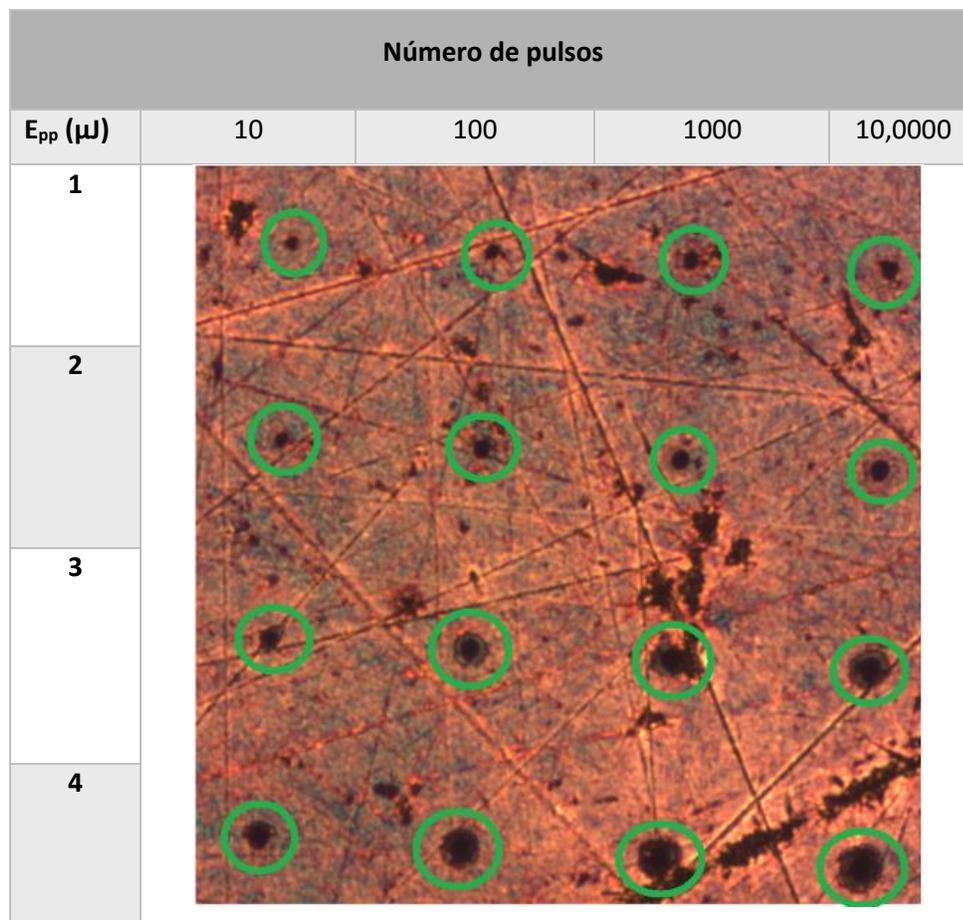


Figura 14. Matriz de ablación en cobre.

Una vez completa la matriz de ablación se mide el diámetro mayor y menor de cada uno de los cráteres formados a diferentes fluencias, esto usando microscopía de fuerza atómica (AFM). Se toma un promedio de varias mediciones y se determina la desviación estándar para calcular las incertidumbres.

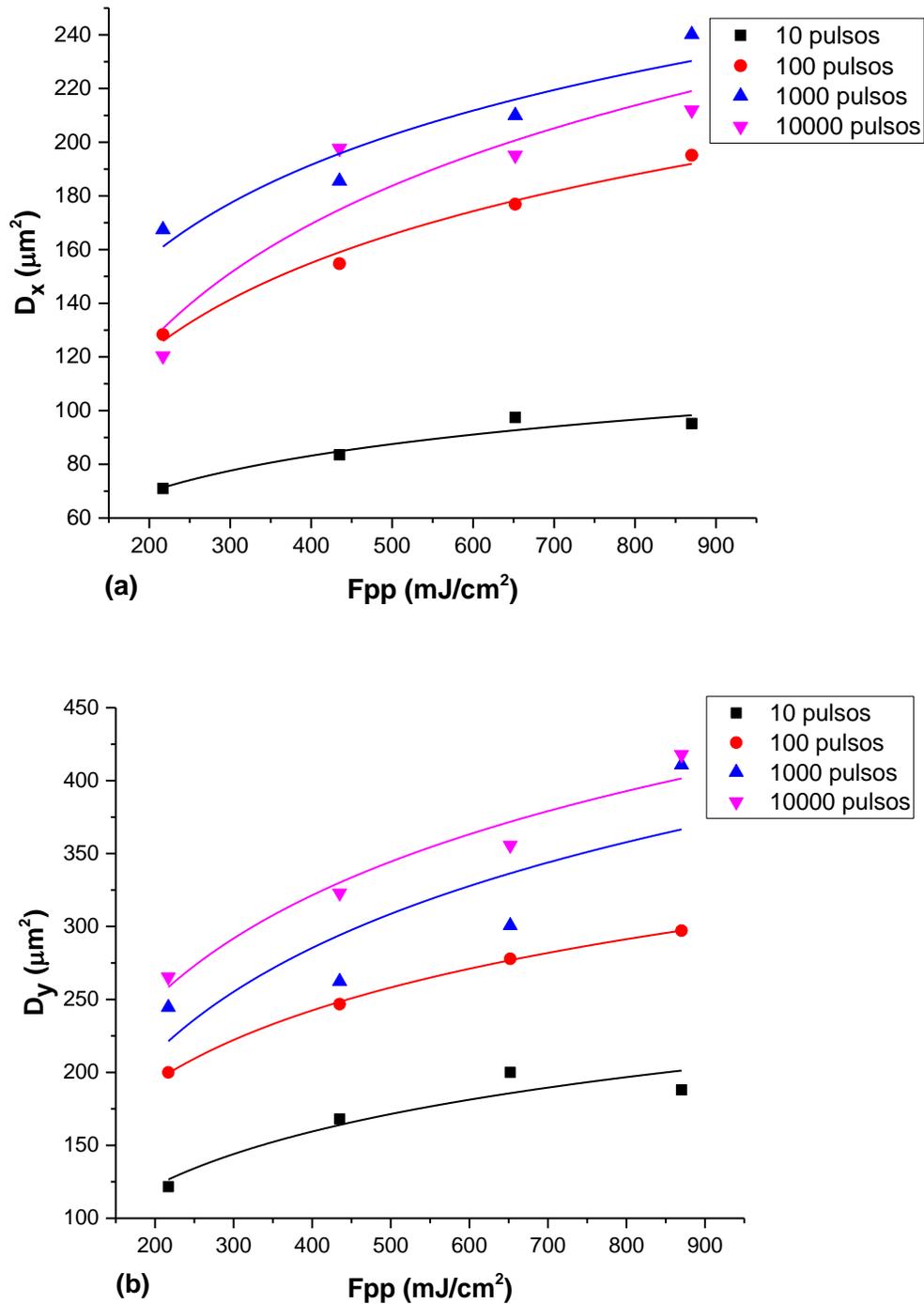


Figura 15. Diámetros al cuadrado para (a) diámetros en “x”, y (b) diámetros en “y”, en función de la fluencia por pulso aplicado para distintos números de pulsos. Las líneas continuas representan el ajuste realizado con la ecuación 11.

Del ajuste con Origin, se obtienen los datos ω_i y E_{th} para cada número de pulsos, por lo que ahora se puede determinar el valor de F_{th} para cada caso utilizando la ecuación 12 (Byskov-Nielsen et al., 2010);

$$F_{th}(N) = \frac{2E_{th}(N)}{\pi\omega_x\omega_y}, \quad (12)$$

donde:

F_{th} : fluencia umbral

E_{th} : energía umbral

ω_x : radio mayor

ω_y : radio menor.

Para determinar la fluencia umbral de ablación por pulso, se ajustan los datos obtenidos a la ecuación (12) por medio de la ecuación (13), la cual fue propuesta por Jee *et al.*, 1988, donde la fluencia umbral de ablación para N pulsos es proporcional a la fluencia umbral para un solo pulso multiplicada por el número de pulsos depositados sobre el blanco, elevado al exponente S-1, donde el factor S se conoce como coeficiente de incubación y toma en cuenta la modificación gradual que sufre el material con cada pulso (Figura 16).

$$F_{th}(N) = F_{th}(1) * N^{S-1}, \quad (13)$$

donde:

$F_{th}(N)$: fluencia umbral de ablación cuando se emplea un número N de pulsos

$F_{th}(1)$: fluencia umbral para 1 pulso

N: número de pulsos

S: coeficiente de incubación del material.

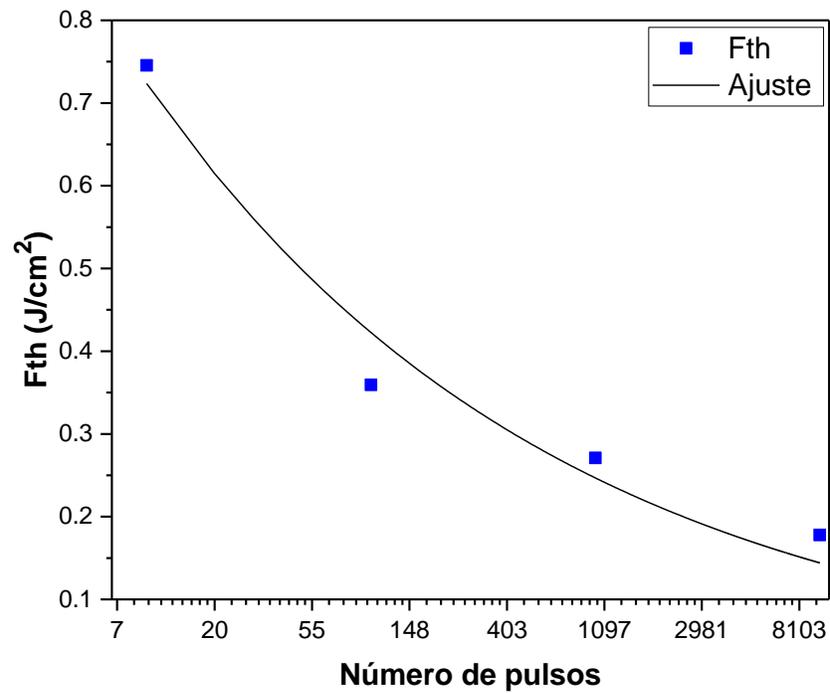


Figura 16. Fluencia umbral de ablación dependiente del número de pulsos.

3.3 Parámetros de irradiación

Con el fin de estudiar el efecto de la fluencia por pulso y la frecuencia de repetición en la síntesis de nanopartículas en un medio de agua destilada, se realizó un conjunto de experimentos a una frecuencia de repetición fija de 50 kHz y 100 kHz para distintos valores de F_{pp} (Tabla 3).

Tabla 3. Parámetros de irradiación para la síntesis de NPs de Cu en agua.

	Cu-Agua5	Cu-Agua6	Cu-Agua7	Cu-Agua8	Cu-Agua9
Frecuencia (kHz)	50	50	50	100	100
Potencia promedio (W)	1.27	0.65	0.30	1.27	0.65
Velocidad de barrido (mm/s)	4	4	4	4	4
Energía por pulso (J)	5.4E-6	13.0E-6	6.0E-6	12.7E-6	6.50E-6
Fluencia por pulso (mJ/cm²)	5.00	2.56	1.28	2.50	1.28

Por otro lado, los parámetros de irradiación para la síntesis de nanopartículas en acetona son los mostrados en la Tabla 4.

Tabla 4. Parámetros de irradiación para la síntesis de NPs de Cu en acetona.

	Cu-Acet6	Cu-Acet7	Cu-Acet8	Cu-Acet9	Cu-Acet10	Cu-Acet11
Frecuencia (kHz)	50	50	100	100	100	50
Potencia promedio (W)	1.29	0.65	1.29	0.65	0.30	0.3
Velocidad de barrido (mm/s)	4	4	4	4	4	4
Energía por pulso (J)	25.8E-6	13.0E-6	12.9E-6	6.5E-6	3E-6	6E-6
Fluencia por pulso (mJ/cm²)	3.80	1.92	1.90	0.958	0.442	0.884

3.4 Simulaciones en COMSOL para nanopartículas

Utilizando el software COMSOL, que funciona en base al Método de Elementos Finitos, se implementó un modelo para calcular las secciones transversales de absorción, esparcimiento y extinción de una partícula esférica y tipo núcleo-coraza. De esta forma fue posible determinar las propiedades ópticas de las nanopartículas de Cu, para diferentes tamaños, y también fue posible estudiar el efecto del espesor de la coraza de CuO y Cu₂O.

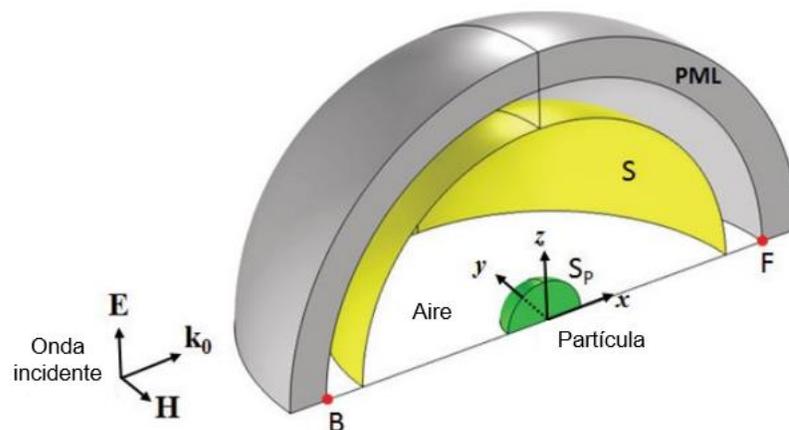


Figura 17. Diagrama de la nanopartícula en la simulación. Tomado y adaptado de la referencia (Yushanov, Crompton y Koppenhoefer, 2013).

La

Figura 17 muestra una sección del diagrama utilizado en la simulación donde se considera una onda plana propagándose en la dirección x y con polarización en la dirección z. La región del PML (Perfectly Matched Layer, por sus siglas en inglés) limita el área de cálculo y evita posibles reflexiones generadas por la interacción del campo EM con la frontera; la superficie S se utiliza para calcular la energía total esparcida y el volumen contenido en Sp (es decir, la nanopartícula) se utiliza para calcular la energía total absorbida.

3.4.1 Modelado

El primer paso es abrir un modelo 3D y seleccionar la opción de “Electromagnetic Waves, Frequency Domain”. Una vez dentro procedemos a definir los parámetros mostrados en la Tabla 5.

Tabla 5. Parámetros definidos para la simulación de una nanopartícula núcleo-coraza.

Nombre	Expresión	Descripción
E0	1 [V/m]	Amplitud del campo electromagnético
radio	10 [nm]	Radio de la nanopartícula
r_pml	10*radio	Radio del PML
t_pml	3*radio	Grosor del PML
lambda	200[nm]	Longitud de onda inicial
lambda_min	lambda	Longitud de onda inicial
lambda_max	1200[nm]	Longitud de onda final
lambda_step	10[nm]	Pasos en la longitud de onda
t_shell	2[nm]	Grosor de la coraza
sigma_geom	$\pi \cdot (\text{radio} + \text{t_shell})^2$	Sección transversal geométrica
s_in	$E0^2 / (2 \cdot Z0_const)$	Factor de escala
N	1.33	Índice de refracción del agua
kinc	$2 \cdot \pi \cdot n / \text{lambda}$	Vector de onda

A continuación, se define la geometría de la figura a simular. Para nuestro caso se añadirán dos esferas; una esfera para la nanopartícula con un tamaño de radio que hayamos definido anteriormente, y otra esfera que será el PML, de radio r_{pml} y de grosor t_{pml} .

Por otro lado, se necesitan los datos de índice de refracción de los materiales que componen la nanopartícula núcleo-coraza. Para esto se agregan 4 funciones de interpolación: 2 para el material en el núcleo de la NP (una para los datos de la parte real del índice de refracción “n”, y una para la parte imaginaria “k”), y 2 funciones para el material en la coraza de la NP (de igual manera para la parte real e imaginaria del índice de refracción). En cada función se importan las respectivas tablas en archivo “.txt”.

De acuerdo a Grand y Le Ru (2020), se consideran las ecuaciones (13) - (17) para calcular las secciones transversales de absorción y esparcimiento, donde primero definimos el campo incidente (en COMSOL llamado “back-ground electric field”) como

$$E_{inc} = E_0 \exp(-ikz) e_x, \quad (13)$$

$$\text{con } k = 2\pi/\lambda, \quad (14)$$

es decir, una onda que se propaga en la dirección z con polarización en la dirección x. En COMSOL, la ecuación se escribirá $E_0 \exp(-j*2*\pi/(\lambda)*z)$.

La sección transversal de esparcimiento es calculada integrando el flujo del vector de Poynting complejo del campo disperso S_{sc} a través de la superficie de la nanopartícula:

$$\sigma_{sc} = \frac{1}{S_0} \iint_{NP} \text{Re} (S_{sc} \cdot n) dS, \quad (15)$$

$$\text{con } S_0 = \frac{E_0^2}{2Z_0}, \quad (16)$$

siendo Z_0 la impedancia característica en el vacío y S_0 el parámetro definido en la Tabla 6 como S_{in} .

La sección transversal de absorción es calculada a partir de la integral de volumen de la densidad de disipación de potencia total dentro de la NP:

$$\sigma_{abs} = \frac{1}{S_0} \iiint_{NP} Q_h dV. \quad (17)$$

Por lo tanto, en COMSOL, se debe crear dos funciones de integración; una llamada **intop_vol**, la cual será la integral de volumen dentro de toda la nanopartícula, y otra función llamada **intop_surf** para la integral de superficie en la superficie de la nanopartícula. Después, se procede a definir las variables de la Tabla 6:

Tabla 6. Variables definidas para la simulación de una nanopartícula núcleo-coraza.

Nombre	Expresión	Unidad	Descripción
nrelPoav	$n_x * \text{emw.relPoav}_x + n_y * \text{emw.relPoav}_y + n_z * \text{emw.relPoav}_z$	W/m ²	Vector de Poynting
sigma_sc	$\text{intop_surf}(\text{nrelPoav})/s_in$	m ²	Sección transversal de esparcimiento
sigma_abs	$\text{intop_vol}(\text{emw.Qh})/s_in$	m ²	Sección transversal de absorción
sigma_ext	$\text{sigma_sc} + \text{sigma_abs}$	m ²	Sección transversal de extinción

Por último, después de crear la geometría y asignar las correspondientes ecuaciones al modelo, el siguiente paso es construir el mallado, que es parte de la discretización para el cálculo por medio del Método de Elementos Finitos.

3.5 Caracterización de las nanopartículas

Una vez obtenidas las nanopartículas en las soluciones coloidales, se procedió a su caracterización. Para dicho fin, se utilizaron las siguientes técnicas:

- Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM, por sus siglas en inglés, High Resolution Transmission Electron Microscopy), para evaluar las características morfológicas y estructurales de las NPs;
- Espectroscopía micro-Raman, para estudiar la forma estructural y composición química;
- Espectroscopía UV-VIS-IR, para estudiar la absorción óptica de las soluciones coloidales en un rango espectral de ultravioleta al infrarrojo cercano (200- 1100 nm);
- Medición de Potencial Zeta, para mediciones de la distribución de tamaños y la estabilidad de las soluciones coloidales.

3.5.1 Espectroscopía UV-VIS-IR

En las mediciones por medio de espectroscopia UV-VIS-IR (ultraviolet-visible-infrared light), la absorción de la luz como función de la longitud de onda nos provee información sobre las transiciones electrónicas que ocurren en el material sujeto de caracterización. También nos permite identificar la longitud de onda de la resonancia plasmónica del material, esta longitud de onda de resonancia varía dependiendo del material del que está hecho la NP, así como de su tamaño y forma. La fracción de luz transmitida a través de una muestra coloidal de NPs se describe mediante la ley de Beer-Lambert, la cual establece que la fracción de luz transmitida (medida después de su interacción con la muestra) tiene una dependencia exponencial decreciente de la siguiente forma (Di Capua, Offi y Fontana, 2014):

$$I_t = I_0 e^{-\mu_a l},$$

donde I_t es la intensidad transmitida, I_0 es la intensidad incidente, μ_a es el coeficiente de absorción de la solución coloidal y l es el camino óptico.

La absorbancia de la solución coloidal está dada por el producto del coeficiente de absorción por el camino óptico y ésta a su vez se puede describir en función del coeficiente de absorción molar y la concentración de las nanopartículas de la siguiente manera (Chen, Dinh y Miller, 2013):

$$A = \epsilon cl = -\log_{10}\left(\frac{I}{I_0}\right),$$

donde:

A : absorbancia

ϵ : coeficiente de absortividad molar

c : concentración de las especies absorbentes

l : camino óptico de la luz a través de la muestra.

En este trabajo se utilizó un espectrómetro UV-VIS-IR (StellarNet SL5-DH como la fuente de luz, StellarNet BLACK-Comet-SR como el detector) en el rango de 200 a 1000 nm (Figura 18).



Figura 18. Diagrama de configuración del espectrómetro UV-VIS-IR StellarNet.

La fuente de luz es una lámpara halógena de tungsteno y deuterio. La lámpara combina el espectro del deuterio con el espectro del halógeno de tungsteno para formar un solo camino óptico, el cual se

direcciona hacia la muestra a través de un cable de fibra óptica. La luz que no es absorbida en la muestra, es decir, la luz transmitida, es direccionada mediante otra fibra óptica hacia el detector del espectrómetro, en donde la luz incide sobre una rejilla de difracción y la luz difractada se detecta en una cámara CCD. Finalmente, a través del software del equipo, se realiza el procesamiento de datos de la absorbancia y/o transmitancia.

3.5.2 Espectroscopia Raman

La espectroscopia Raman es una técnica que nos proporciona información sobre la estructura química, modos vibracionales y fase cristalina del material de interés. Se basa en la dispersión inelástica de fotones, conocida como dispersión Raman. Se usa una fuente de luz monocromática, generalmente de un láser en el rango visible, infrarrojo cercano o ultravioleta cercano. La luz láser interactúa con vibraciones moleculares, fonones u otras excitaciones en el sistema, lo que hace que la energía de los fotones láser incidentes se incremente o disminuya ligeramente. El cambio de energía proporciona información sobre los modos vibracionales del sistema. Cuando el fotón esparcido tiene una energía menor a la del fotón incidente, se dice que tenemos esparcimiento Stokes, y por el contrario si el fotón esparcido tiene una energía mayor que la del fotón incidente se dice que tenemos esparcimiento Anti-Stokes.

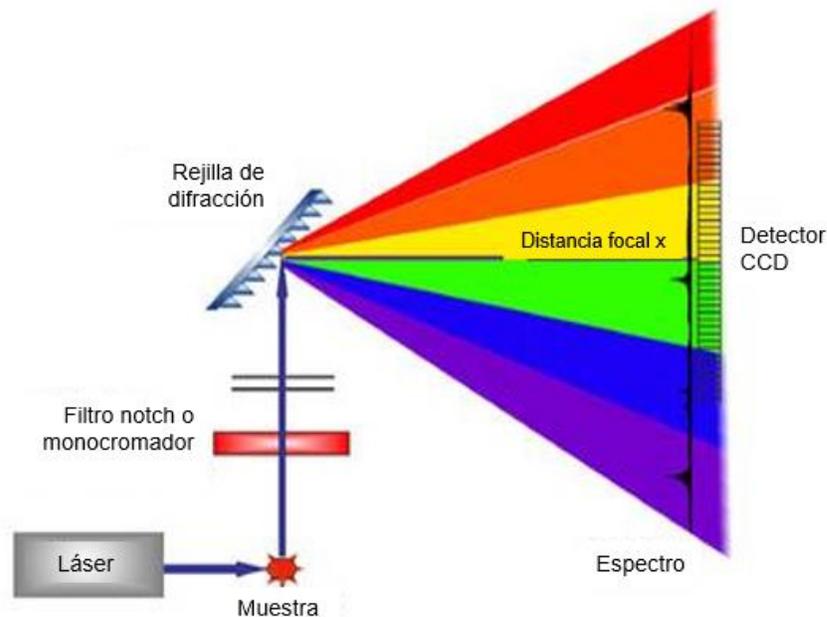


Figura 19. Esquema básico de un espectrómetro Raman. Imagen tomada y adaptada de StellarNet.

Como se muestra en la Figura 19, normalmente, el material de interés se ilumina con un haz láser. La luz esparcida se recoge con una lente y se envía a una rejilla de difracción. La luz dispersada elásticamente que conserva la longitud de onda correspondiente a la línea láser (dispersión de Rayleigh) se filtra mediante un filtro notch o un filtro pasa bandas, mientras que el resto de la luz recolectada se envía a un detector (usualmente un arreglo lineal CCD).

Para este estudio se utilizó el equipo micro-Raman Lambda Solutions P2, equipado con un láser CW Nd-YAG de 50mW con una longitud de onda de 532 nm y un microscopio Olympus BX-41. Se usó un objetivo de 100X para enfocar el haz láser en la muestra, con un tamaño de cintura de 3 μ m. Para realizar las mediciones Raman se prepararon las muestras secando a temperatura ambiente unas gotas de la suspensión coloidal de NPs sobre un portaobjetos de vidrio. Los espectros Raman se capturaron para 20 adquisiciones con duración de 1s cada una, en el rango de 160 a 1200 cm^{-1} .

3.5.3 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Esta técnica de caracterización se usó con el propósito de conocer e identificar el patrón morfológico de las nanopartículas. Se tomaron imágenes con el microscopio TEM en la modalidad de alta resolución, o HRTEM (High Resolution Transmission Electron Microscopy, por sus siglas en inglés), ya que esta permite obtener información de los planos atómicos de los elementos que conforman las nanopartículas.

Básicamente, un haz de electrones se transmite a través de una muestra ultradelgada, interactuando con la muestra a medida que la atraviesa. Se forma una imagen a partir de la interacción de los electrones transmitidos a través de la muestra; la imagen se amplía y se enfoca en un dispositivo de formación de imágenes, como una pantalla fluorescente, en una película fotográfica o se detecta mediante un sensor como una cámara CCD. En la Figura 20 se muestra el diagrama básico de un microscopio TEM. Los microscopios TEM son capaces de obtener imágenes con una resolución significativamente más alta que los microscopios ópticos, debido a la pequeña longitud de onda de De Broglie de los electrones. Esto permite al usuario del instrumento examinar detalles finos, incluso tan pequeños como una sola columna de átomos, que es miles de veces más pequeña que el objeto más pequeño que se puede resolver en un microscopio óptico.



Figura 20. Diagrama básico de un microscopio electrónico de transmisión. Tomada y adaptada de la referencia (Bradbury et al., 2019).

La morfología, el tamaño, la forma y la estructura cristalina de las NP de cobre se investigaron mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) utilizando un microscopio Hitachi H-7500 y uno JEOL 2100, este último en su modalidad de alta resolución (HRTEM), ambos operan a un voltaje de aceleración de 120 kV con un filamento LaB6. La muestra se preparó colocando una gota del coloide directamente sobre una rejilla de cobre recubierta de carbón y dejando que el líquido se evaporara a temperatura ambiente. Las imágenes TEM fueron procesadas por el software Image J para obtener la distribución de tamaños de las NPs de Cu.

3.5.4 Medición del potencial zeta

El potencial zeta es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción electrostática (o de carga) entre las nanopartículas, y es uno de los parámetros fundamentales que se sabe que afectan la estabilidad. Su medición aporta información detallada de las causas de la dispersión, agregación o floculación, y se puede aplicar para mejorar la formulación de dispersiones, emulsiones y suspensiones. Los coloides con un alto potencial zeta, tanto positivo como negativo, son más estables eléctricamente, mientras que los coloides con un bajo potencial zeta tienden a aglomerarse o coagularse, lo que da lugar a una estabilidad coloidal deficiente.

Las partículas o coloides dispersos pueden tener carga eléctrica positiva o negativa debido a los iones que las rodean, por lo que se busca maximizar las fuerzas repulsivas entre ellos para producir suspensiones estables. Las repulsiones mutuas entre partículas adyacentes impiden la unión de grandes y rápidas sedimentaciones de aglomerados, tal como se observa en la Figura 21.

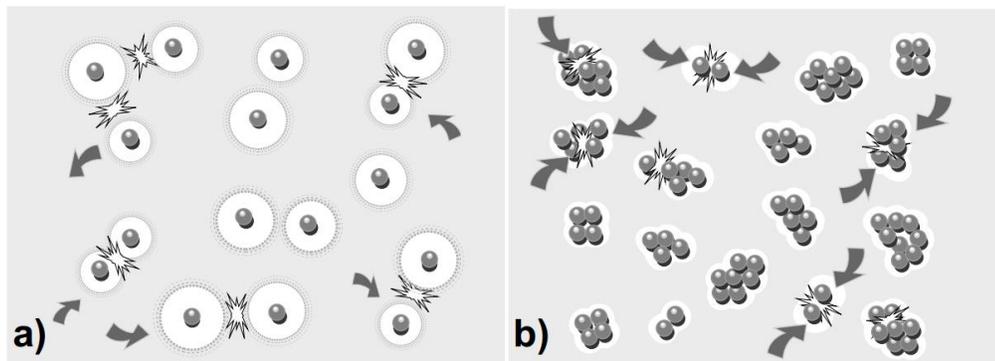


Figura 21. Representación gráfica de NPs en un coloide. a) Partículas con cargas se repelen. b) Partículas sin cargas se aglomeran. Tomado de la referencia (Rojas, 2013).

Para llevar a cabo este análisis se utiliza un dispositivo llamado Zeta Seizer, el cual nos ayuda a medir tanto tamaños de NPs, como el potencial zeta del coloide. El equipo realiza mediciones de tamaño mediante un proceso llamado dispersión dinámica de luz (DLS). La dispersión dinámica de luz (también conocida como PCS-Espectroscopía de correlación de fotones) mide el movimiento browniano y lo relaciona con el

tamaño de las partículas. Para ello, ilumina las partículas con un láser y analiza las fluctuaciones de intensidad de la luz dispersada.

Para el cálculo del potencial zeta, se determina la movilidad electroforética realizando un experimento de electroforesis en la muestra y midiendo la velocidad de las partículas usando velocimetría láser Doppler (LDV).

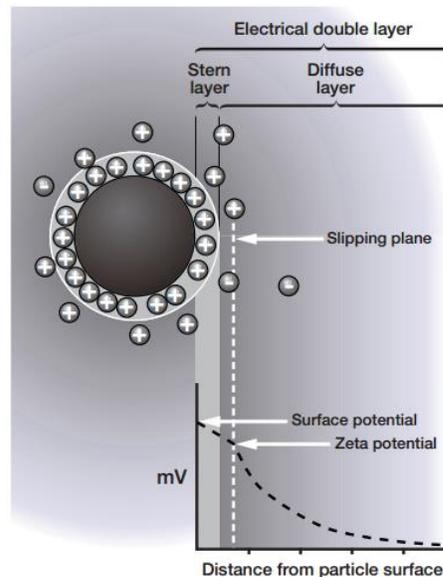


Figura 22. Diagrama del modelo de Doble Capa, mostrando una nanopartícula cargada y la distribución de iones positivos y negativos alrededor del coloide. Tomado de la referencia (Rojas, 2013).

Usualmente se utiliza el modelo de Doble Capa (Figura 22) para visualizar la atmósfera iónica en la proximidad del coloide cargado y para explicar cómo actúan las fuerzas de repulsión. El desarrollo de una carga neta en la superficie de la partícula afecta la distribución de iones en la región interfacial circundante, lo que resulta en una mayor concentración de contraiones (iones de carga opuesta a la de la partícula) cerca de la superficie. La capa líquida que rodea la partícula existe en dos partes; una región interna, llamada capa Stern, donde los iones están fuertemente unidos y una región externa, la capa difusa, donde están menos firmemente unidos; por tanto, existe una doble capa eléctrica alrededor de cada partícula. Dentro de la capa difusa hay un límite teórico dentro del cual los iones y partículas forman una entidad estable. Cuando una partícula se mueve (por ejemplo, debido a la gravedad), los iones dentro del límite se mueven con ella, pero los iones más allá del límite no viajan con la partícula. Este límite se denomina

superficie de cizallamiento hidrodinámico o plano de deslizamiento. El potencial que existe en este límite se conoce como potencial zeta.

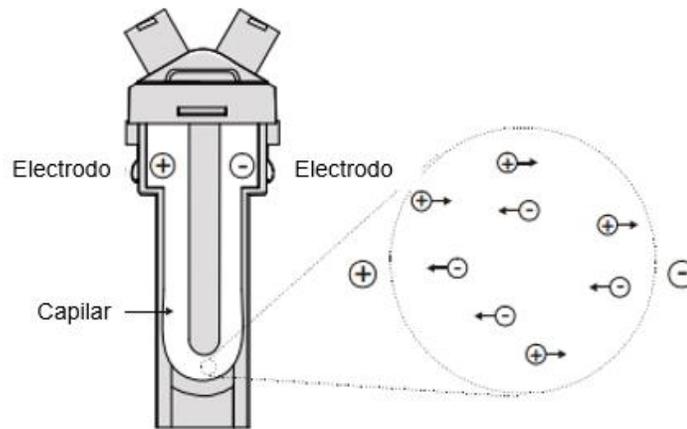


Figura 23. Gráfico de una celda capilar, donde se dará a lugar el fenómeno de electroforesis. Tomado de la referencia (Rojas, 2013).

Lo que se mide directamente es la movilidad electroforética, y la conversión a potencial zeta se infiere de consideraciones teóricas. La esencia de un sistema clásico de microelectroforesis es una celda con electrodos en cada extremo a la que se aplica un potencial (Figura 23). Las partículas se mueven hacia el electrodo de carga opuesta, su velocidad se mide y se expresa en fuerza de campo unitaria como su movilidad.

3.5.5 Determinación de la concentración de nanopartículas

El picnómetro, mostrado en la Figura 24, es un utensilio empleado en laboratorios que se utiliza para medir el volumen o la densidad de un elemento o una solución. Dicha herramienta nos ayuda a determinar la cantidad de nanopartículas sintetizadas en cierto volumen. Consta de un pequeño matraz con un pequeño tapón esmerilado con un capilar.

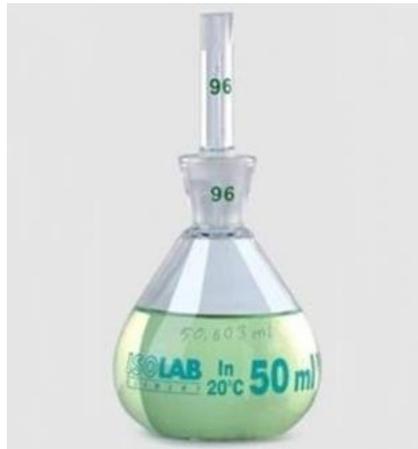


Figura 24. Imagen de un picnómetro con volumen de 50 ml.

Para utilizarlo, se quita el tapón esmerilado y se vierte la sustancia líquida en la vasija del picnómetro. Al colocar de nuevo al tapón, la sustancia subirá a través del interior de la tapa hasta el capilar que tiene por dentro. Se debe llenar toda la vasija de la sustancia hasta que se derrame un poco por encima al introducir el tapón, y es muy importante que no quede ninguna burbuja al realizar este procedimiento.

Para el cálculo de la concentración de nanopartículas, la metodología es la siguiente:

1. Se pesa en una balanza analítica el picnómetro con el coloide.
2. Se pesa el picnómetro con el medio líquido, en este caso, con el agua destilada.
3. La diferencia entre ambos pesos se divide entre el volumen que le cabe al picnómetro con todo y el capilar (este dato viene grabado en el instrumento).
4. Una vez obtenido el resultado del volumen, se tendrá el resultado final de cuál es la densidad de la sustancia (g/ml).

El instrumento utilizado en este trabajo es un picnómetro de vidrio de 10 ml, calibrado, con un volumen neto de 10.638 ml, de la marca ISOLAB Labware.

3.6 Ensayos de inhibición con *E. coli*

Para evaluar los efectos antibacteriales de las NPs de Cu, se tomó una muestra sintetizada en agua y se siguieron los pasos siguientes:

1. Se expuso el coloide a luz UV para esterilizarlo.
2. Se prepararon dos series o muestras del coloide.
3. Se diluyó una muestra de 100 μ l de coloide en 3 ml de medio de cultivo (LB) y se incubó el medio a 37 °C por 24 horas; completado este lapso, se confirmó que las muestras no estuvieran contaminadas.
4. Se separó el coloide con LB en tres tubos, con 0.5 ml, 1 ml y 1.5 ml, teniendo 9 tubos en total, (dos series con 0.5 ml, dos de 1 ml y dos de 1.5 ml, cada uno con sus respectivos controles).
5. Se agregó un volumen de 22 μ l de *E. coli* en solución líquida (~10,000 células) en cada tubo de coloide.
6. Se incubaron las muestras a 37 °C por 15 horas.

Al final, cada muestra analizada consiste de coloide en agua + medio de cultivo LB + bacteria *E. coli*. Los controles consisten en medio de cultivo LB + bacteria *E. coli*.

Capítulo 4. Resultados y Discusión

4.1 Fluencia umbral de ablación del cobre

Se realizó un matriz de ablación de 18 X 18 puntos (ver Figura 25), variando en las columnas el número de pulsos y en los renglones la potencia promedio. Los puntos se repiten 9 veces para cada parámetro (el objetivo de repetirlo fue para obtener datos de incertidumbre en cada punto, debido a las variaciones de punto a punto asociadas a un blanco de superficie rugosa).

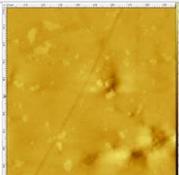
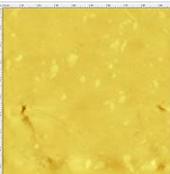
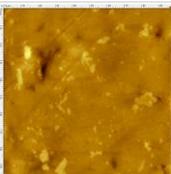
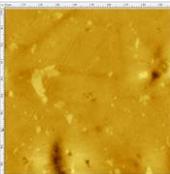
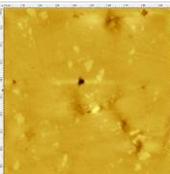
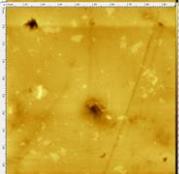
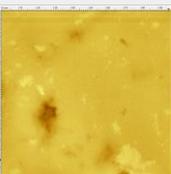
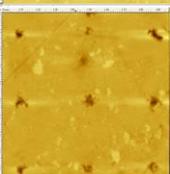
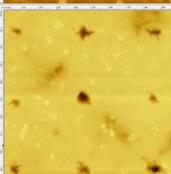
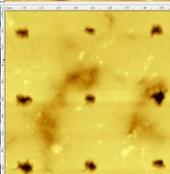
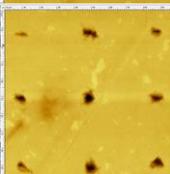
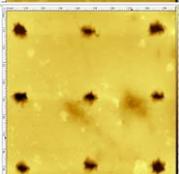
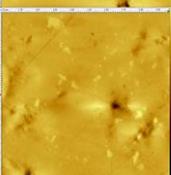
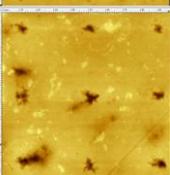
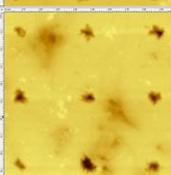
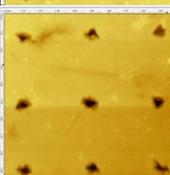
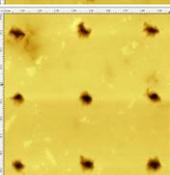
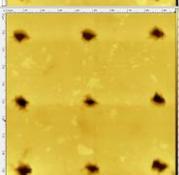
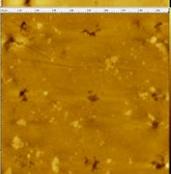
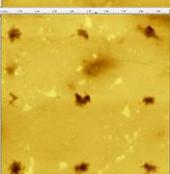
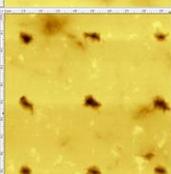
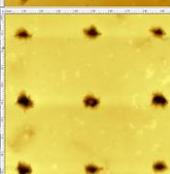
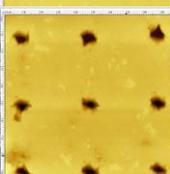
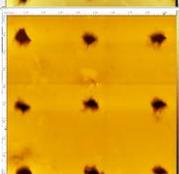
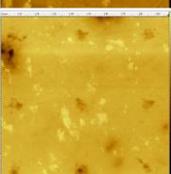
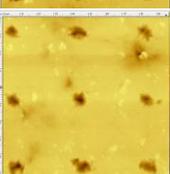
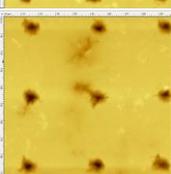
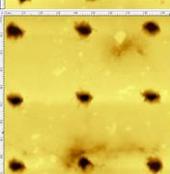
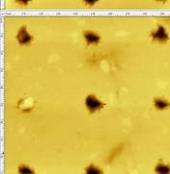
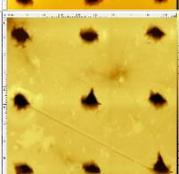
		Número de pulsos					
Epp (μJ)		10	50	100	500	1000	10,000
1		x	x	x	x	x	
2		x					
3							
3.2	5						
3.5							
4							

Figura 25. Matriz de ablación en cobre. Los recuadros con "x" indican que no hubo cambios significativos en el material.

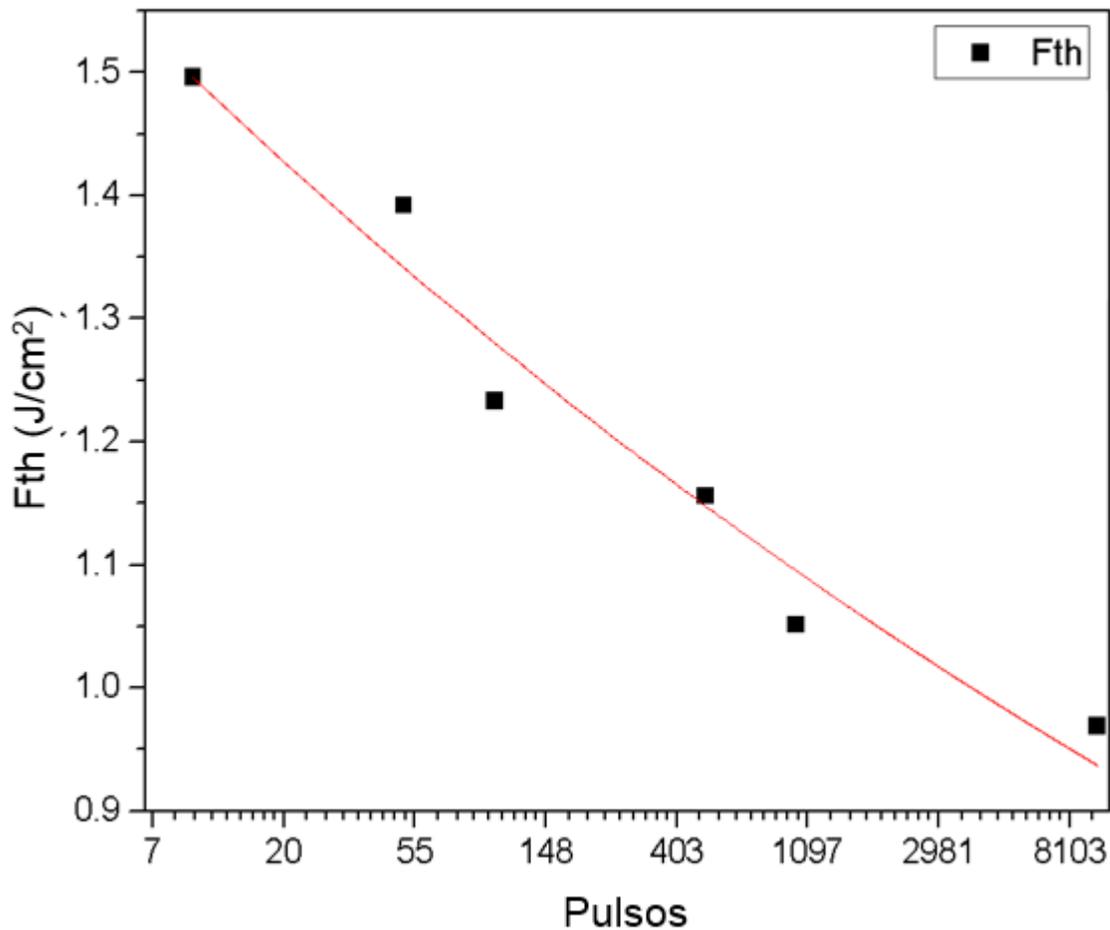


Figura 26. Fluencia umbral de ablación del cobre dependiente del número de pulsos. La línea continua roja corresponde al ajuste.

Después de realizar los pasos en la metodología descrita, se calculó que la fluencia umbral de ablación por pulso para el cobre es de $F_{th} 1.74 \pm 0.063 \text{ J/cm}^2$ (Figura 26), valor que es acorde con lo que se ha reportado en la literatura; por ejemplo, Byskov-Nielsen, Savolainen, Christensen, y Balling (2010), reportaron que el umbral de ablación para el cobre es de $1.7 \pm 0.3 \text{ J/cm}^2$.

4.2 Resultados de espectroscopía UV-VIS-IR

Una vez sintetizados los coloides utilizando una fluencia por pulso de 250 J/cm^2 (es decir, aproximadamente 143 veces la fluencia umbral de ablación), se procedió a caracterizarlos

inmediatamente después de la ablación, monitoreando su evolución por varios días posterior a la síntesis. En el caso de los coloides en agua, los cuales se observan en la Figura 27, las NPs son más estables que en el caso de los coloides en acetona (Figura 28) conservando su morfología y composición química hasta por una semana posterior a la síntesis. Para las NPs sintetizadas en acetona, la estabilidad del coloide es muy corta, ya que la precipitación de éstas comienza al cabo de unas horas.

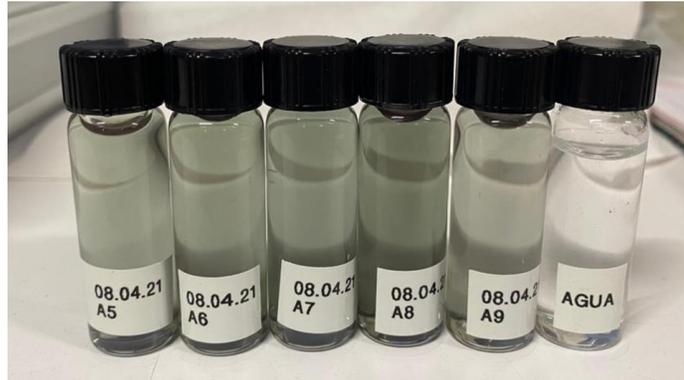


Figura 27. Soluciones coloidales de NPs de Cu en agua destilada. Cada muestra fue sintetizada bajo distintos parámetros de irradiación.



Figura 28. Soluciones coloidales de NPs de Cu en acetona. Cada muestra fue sintetizada bajo distintos parámetros de irradiación.

Por simplicidad, se tomó la muestra más representativa y óptima de cada medio líquido (una de agua y otra de acetona) respecto a la formación de las nanopartículas tipo núcleo-coraza del coloide y a la concentración obtenida para su caracterización. Los espectros UV-VIS del coloide se midieron inmediatamente después de la síntesis y nuevamente a los 3 días de la misma. La Figura 29 muestra los

espectros de absorción de nanopartículas de cobre sintetizadas en agua, en el recuadro se observa que después de la síntesis la solución coloidal tiene una tonalidad azul oscuro. El espectro de absorción está caracterizado por una banda de absorción centrada en la longitud de onda alrededor de 600 nm, la cual está asociada a la resonancia del plasmón superficial de las NPs de cobre en el agua. Por otro lado, en el UV la absorbancia alcanza valores muy altos. Al evolucionar la solución coloidal, 3 días posterior a la síntesis, la banda de resonancia plasmónica en 600 nm se mantiene, registrando un ligero corrimiento de 12 nm hacia el rojo, mientras que en el UV la absorbancia disminuye y se forma una banda bien definida y centrada alrededor de 220 nm. La Figura 30 muestra los espectros de absorción de las NPs de cobre sintetizadas en acetona, el coloide tiene una tonalidad marrón claro, como se muestra en el recuadro de la figura; esta tonalidad corresponde a la solución coloidal el día de la síntesis y 3 días posteriores a la misma. El máximo de la banda de absorción se ubica centrado a 575 nm, la absorbancia de la solución coloidal disminuye con el tiempo, la banda en 575 nm decrece en magnitud en el periodo de monitoreo de 3 días, sin embargo, no se presentó ningún desplazamiento. La posición en longitud de onda de la banda de absorción en acetona sugiere que el tamaño promedio de las NPs sintetizadas en acetona es menor que el de las NPs sintetizadas en agua.

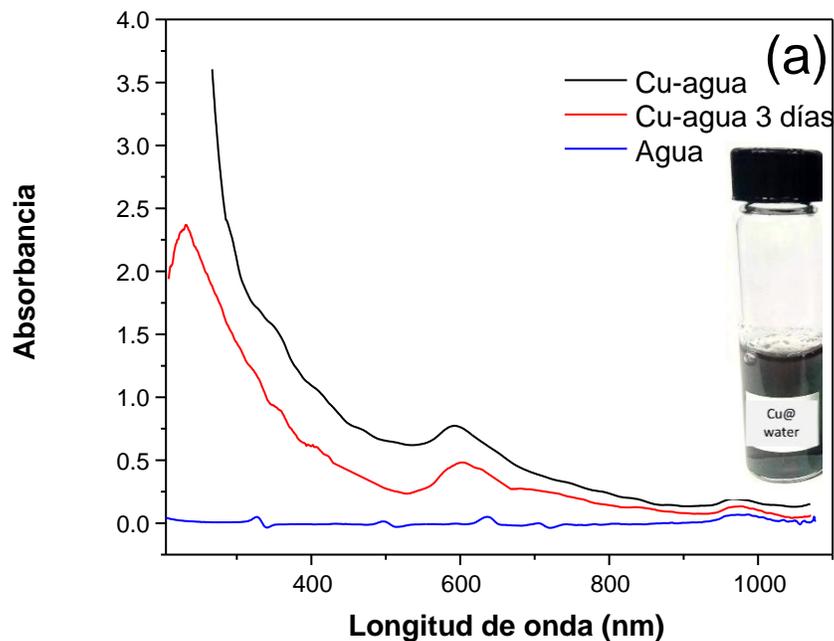


Figura 29. Espectros UV-VIS de los coloides sintetizados en agua.

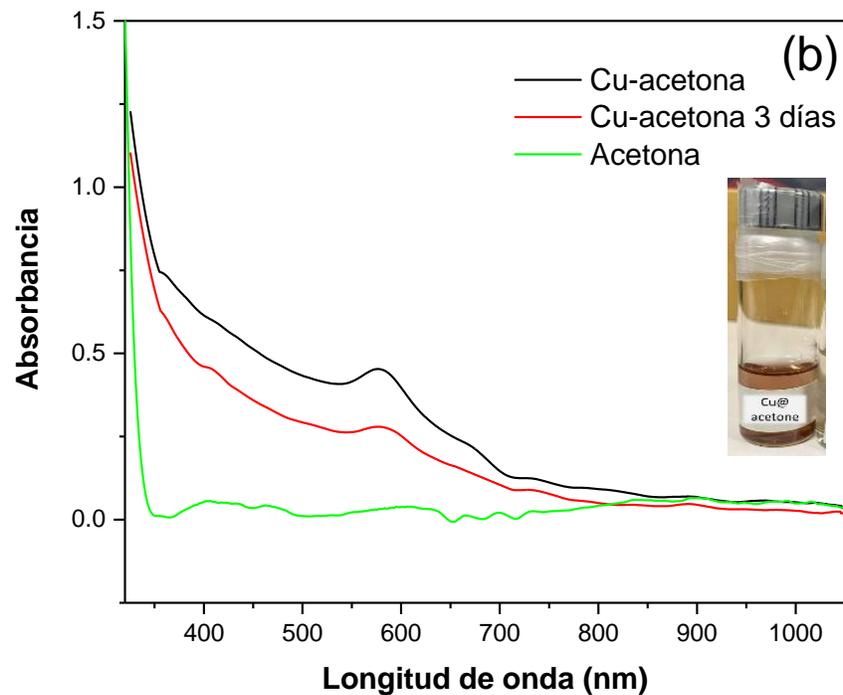


Figura 30. Espectros UV-VIS de los coloides sintetizados en acetona.

De acuerdo a la teoría de Mie, la presencia de un solo pico de extinción indica que las partículas tienen forma esférica o cuasi esférica según la literatura (Tilaki *et al.*, 2007). Asimismo, el pico alrededor de 300 nm está relacionado con óxidos de cobre (Jayaprakash *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2017; Arreguín-Campos *et al.*, 2018). Con base en esta información, fue posible simular el tamaño principal de las NPs en las muestras.

4.3 Cálculo de la sección transversal de absorción

Los resultados demuestran el impacto del tamaño de las nanopartículas y la composición del recubrimiento de la superficie en la respuesta a los fenómenos ópticos. Se realizaron simulaciones de NPs de cobre metálico puro, de CuO y de Cu₂O con diámetro de 5-70 nm, sin embargo, estos espectros no mostraron relación con los resultados experimentales. Posteriormente se simularon NPs de tipo núcleo-coraza con núcleo de Cu y capa de CuO, Cu₂O y C (carbono), variando los diámetros y espesores de la

coraza. Finalmente, se observó que al considerar nanopartículas con núcleo de cobre y coraza de CuO, las secciones transversales calculadas describen bien a los espectros de absorción obtenidos experimentalmente (Figura 31).

En la Figura 31 (a) se muestra la simulación de la sección transversal de absorción de una nanopartícula tipo núcleo-coraza, con un diámetro de núcleo de cobre de 15 nm y un espesor de coraza de 7 nm. En la parte inferior se compara con el espectro UV-VIS de la muestra de NPs de Cu sintetizadas en agua destilada. Se puede observar la banda de resonancia plasmónica cercana a los 600 nm, coincidiendo con la simulación y presentando un aspecto similar en la forma del espectro. Por otro lado, en la Figura 31(b), en la parte superior, se presenta una simulación de la sección transversal de absorción de una nanopartícula tipo núcleo-coraza con un núcleo de cobre de 16 nm y una coraza de 4 nm, la cual coincide con la banda de absorción máxima a 580 nm con la muestra de las NPs sintetizadas en acetona.

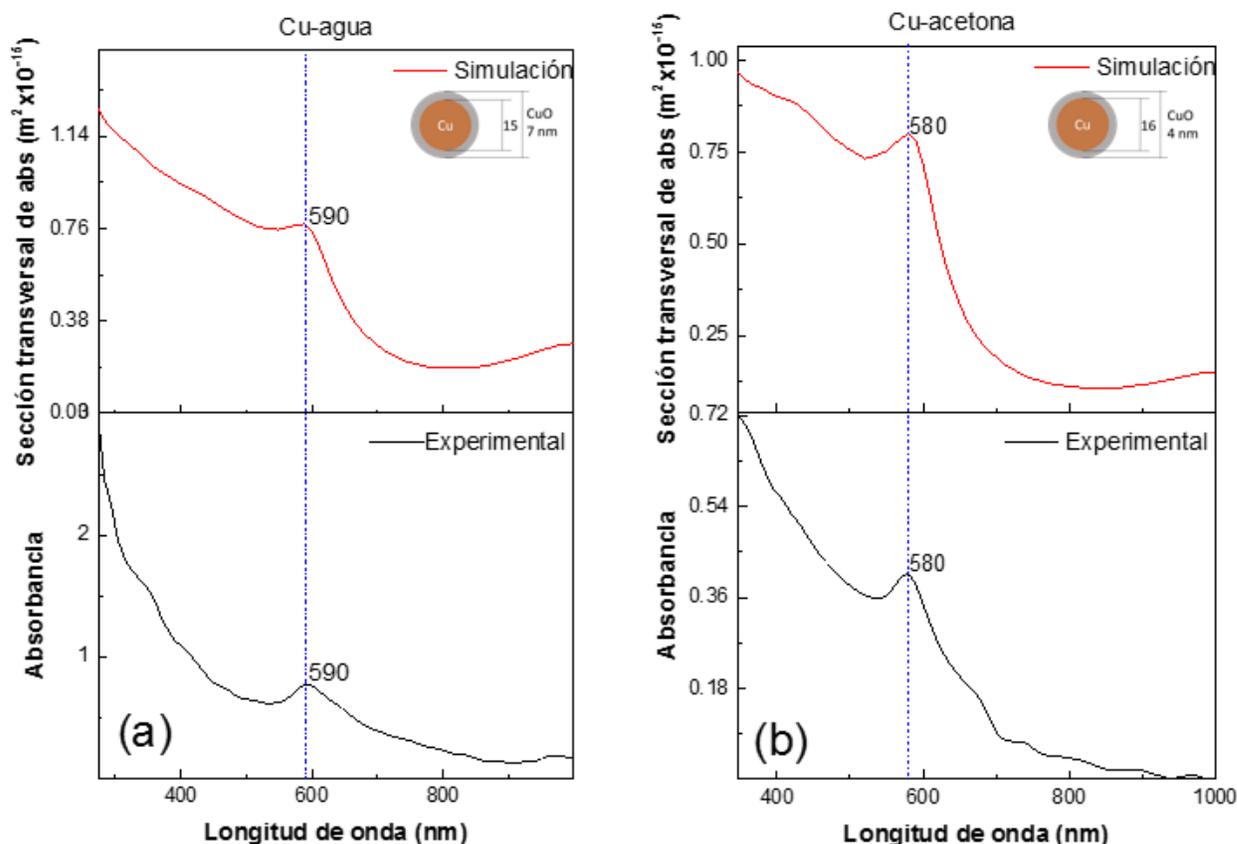


Figura 31. Sección transversal de absorción de una nanopartícula tipo núcleo-coraza Cu@CuO calculada para (a) agua (b) acetona, con sus respectivos espectros experimentales.

En ambos casos de síntesis, la banda de resonancia plasmónica más representativa de los espectros UV-VIS corresponde a una nanopartícula de tipo núcleo-coraza con un núcleo de Cu y una capa de CuO; las simulaciones en las que se propuso una capa de Cu₂O o carbono no coincidían con la forma del espectro.

4.4 Resultados del estudio del efecto de oxidación en NPs de Cu

El efecto del proceso de oxidación en las propiedades ópticas de las nanopartículas fue analizado teóricamente considerando nanopartículas tipo núcleo-coraza y variando el espesor de la capa de óxido, representada por la coraza. En la Figura 32 se muestran los resultados del cálculo de la sección transversal de absorción para una nanopartícula núcleo-coraza en agua destilada, con un núcleo de Cu y una capa de CuO, variando el grosor de la capa desde 2 nm hasta 8 nm y considerando dos radios de núcleo, de 10 nm de radio y de 50 nm radio, para su comparativa. Para el caso de una nanopartícula de 10 nm de radio, iniciamos con un grosor de capa de 2 nm, observando dos bandas de resonancia plasmónica características en 300 nm y 570 nm. Al incrementar dicho grosor, se observa una disminución en la absorción, esto debido a que la diferencia de tamaño entre el núcleo y la coraza es cada vez más estrecha, por lo que llega un momento en que el grosor de la capa de óxido se asemeja al diámetro del núcleo de la nanopartícula, resultando en que la banda de absorción perteneciente al cobre sea apantallada por la coraza de óxido cada vez más.

Por otro lado, para una nanopartícula de 50 nm de radio, se observan las bandas plasmónicas características del cobre. Observamos que, dado que se tiene una capa muy delgada de óxido en comparación con el tamaño del núcleo, al incrementarse el grosor de la coraza, ocurre un pequeño desplazamiento del plasmón hacia el rojo y que disminuye su intensidad.

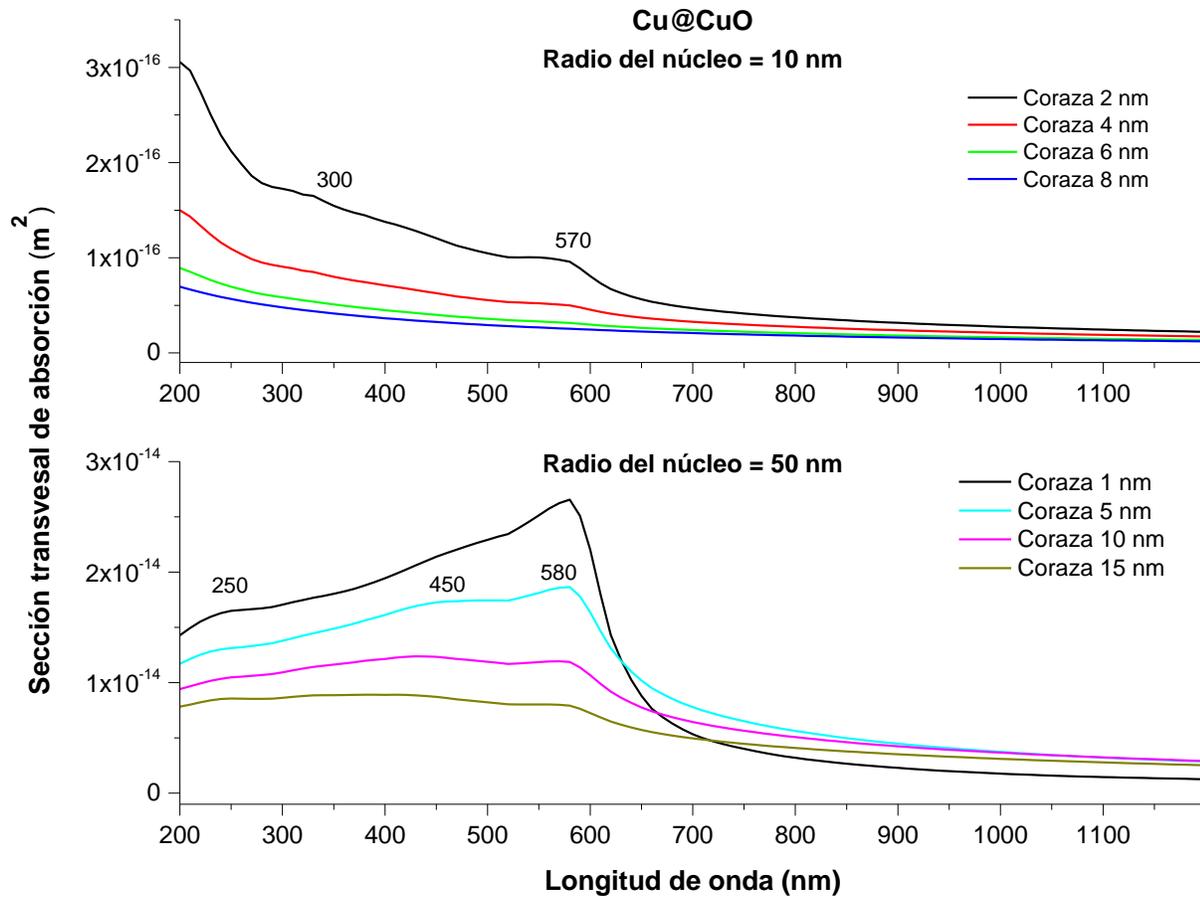


Figura 32. Simulación en agua destilada de una nanopartícula núcleo-coraza con un núcleo de cobre y una capa de óxido cúprico. En la parte superior, un núcleo de 10 nm de radio. En la parte inferior, un núcleo de 50 nm de radio.

La Figura 33 muestra las secciones transversales de absorción calculadas para una nanopartícula de cobre con recubrimiento de Cu_2O . Al igual que en la figura anterior, se tomaron dos radios de nanopartículas (10 nm y 50 nm) y se varió el grosor de la coraza de óxido cuproso. Observamos la presencia de las bandas en 220 nm, 590 nm, 630 nm y 660 nm para el caso de un núcleo de 10 nm, y las bandas plasmónicas en 250 nm, 600 nm y 660 nm para un núcleo de 50 nm. El corrimiento de las bandas y su atenuación se explica de la misma manera que el análisis anterior, en donde se tenía una capa de CuO . Habrá un punto en donde la capa de óxido crecerá tanto que apantallará los efectos plasmónicos de la nanopartícula. También hay que notar que, al variar el grosor de la coraza, podemos sintonizar la resonancia plasmónica a una longitud de onda deseada, incluso incrementar la ganancia de esta, tal como lo mencionan Peña-Rodríguez y Pal (2011).

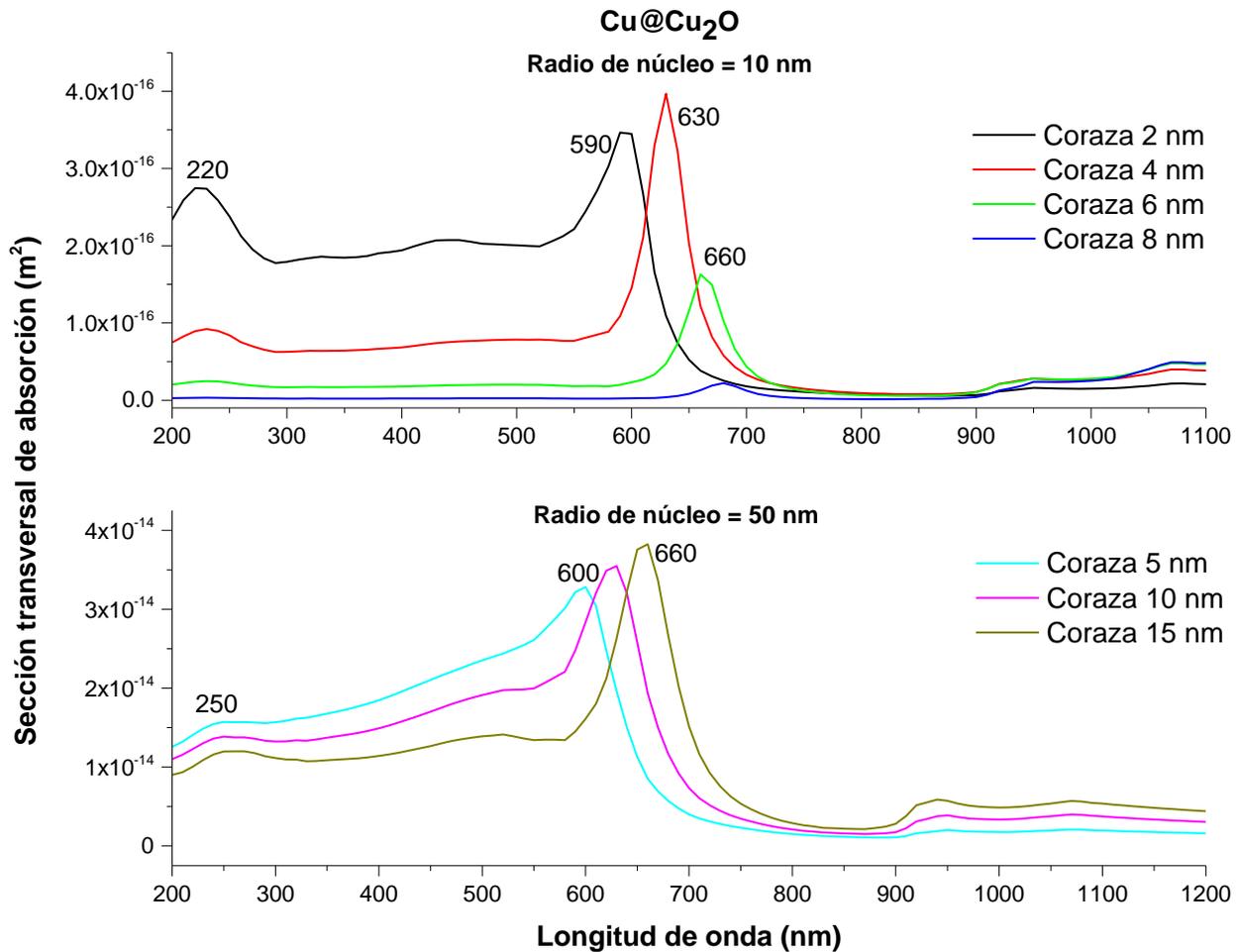


Figura 33. Simulación en agua destilada de una nanopartícula núcleo-coraza con un núcleo de cobre y una capa de óxido cuproso. En la parte superior, un núcleo de 10 nm de radio. En la parte inferior, un núcleo de 50 nm de radio.

4.5 Resultados de caracterización TEM/HRTEM

La morfología, el tamaño y la estructura cristalina de las NPs resultantes preparadas usando agua y acetona se estudiaron mediante TEM y HRTEM, tomando varias imágenes de los coloides y promediando los valores obtenidos en todas las micrografías. En la Figura 34 se muestran las imágenes más representativas de las NPs obtenidas. En la Figura 34 (a) se puede observar que las NPs sintetizadas en agua son predominantemente esféricas y el pico de la distribución de tamaños abarca de 10 a 25 nm (Figura 34 (b)); estas NPs presentan una amplia distribución de tamaños con un ancho medio de 20 nm. La Figura 34 (c) muestra las NPs sintetizadas en acetona, donde, al igual que las sintetizadas en agua, éstas presentan una morfología predominantemente esférica; sin embargo, en este caso el pico de la

distribución de tamaños medios se centra en 15 nm (Figura 34 (d)), y el ancho medio de la distribución es de 8 nm.

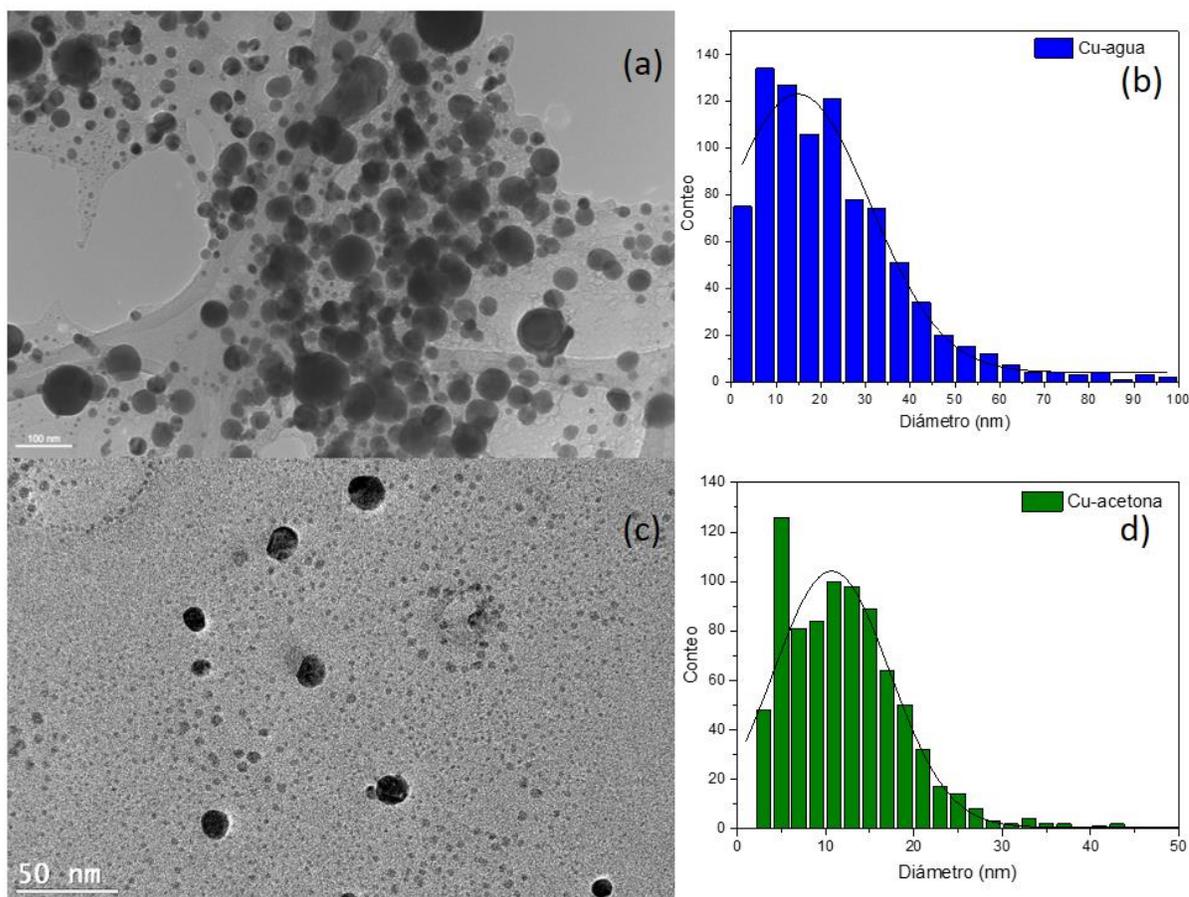


Figura 34. Micrografías HRTEM de NPs de Cu sintetizadas en agua (a), y en acetona (b), además de sus correspondientes histogramas de distribución de tamaños (b) y (d).

La distribución de tamaños de las NPs obtenida por TEM, muestra que la elección del tamaño de las NPs en la simulación de la sección transversal de absorción de NP es adecuada para las NPs sintetizadas en agua (~ 20 nm) pero difiere un poco con el tamaño principal de las muestras sintetizadas en acetona (~ 10 nm).

La síntesis en ambos medios líquidos produce NPs tipo núcleo-coraza. En la Figura 35 (a) y (c) se muestran micrografías de las NPs sintetizadas en agua; éstas NPs presentan una coraza que es muy fácil de identificar dada la diferencia de contraste entre el núcleo y la coraza. Por otro lado, en la Figura 35 (b) y (d) las NPs

sintetizadas en acetona no muestran las mismas características, solo en algunos casos se observó la coraza, mientras que la mayoría de las NPs parecen carecer de esta.

Se realizaron mediciones de diámetro de núcleo y espesor de coraza, y se determinó que, en el caso de coloide en agua, la coraza promedio corresponde al 20% del diámetro total de las NPs. En el caso del coloide en acetona, el espesor de la coraza no está consistentemente correlacionado con el tamaño total de las NPs ya que se encontraron espesores muy variados.

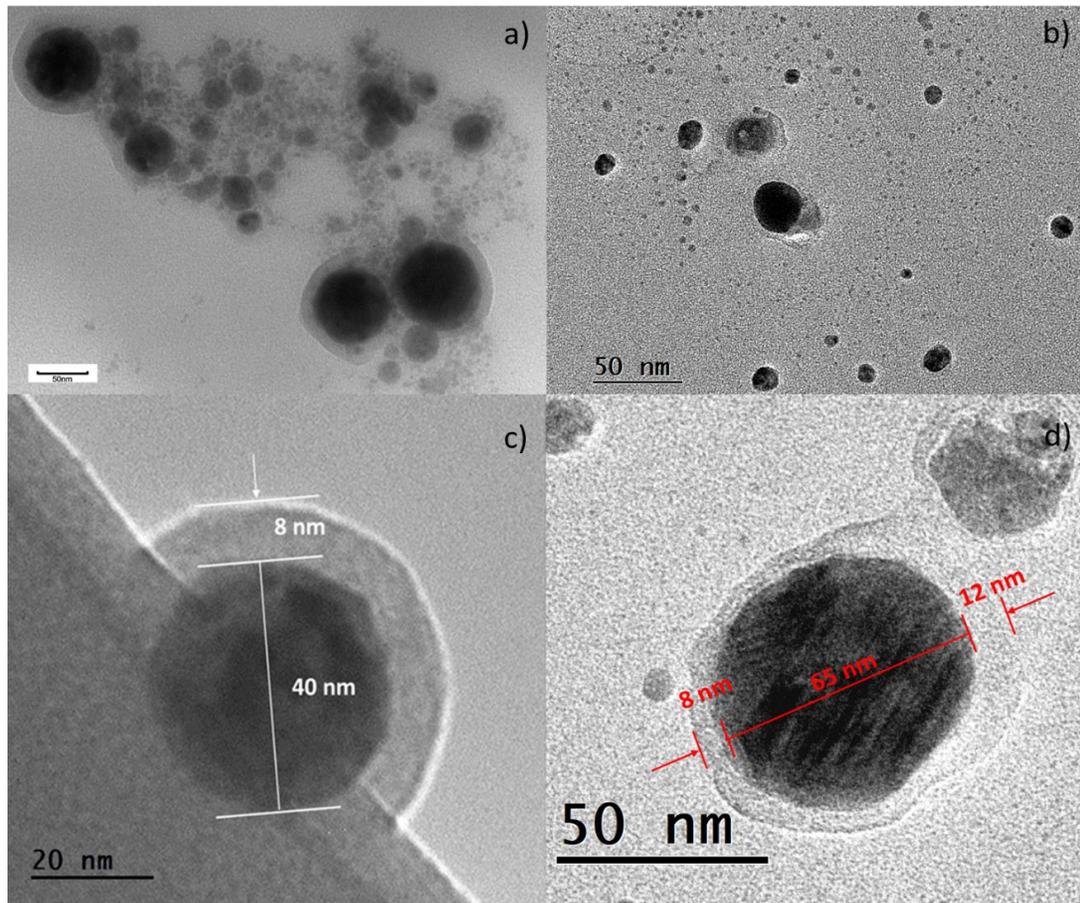


Figura 35. Nanopartículas tipo núcleo-coraza sintetizadas en a) agua, y b) acetona, siendo c) y d) imágenes magnificadas de las NPs sintetizadas en agua y acetona, respectivamente.

Con las micrografías HRTEM fue posible determinar la estructura cristalina de las NPs. En la Figura 36 (a) se analizan las distancias interplanares para una NP de Cu sintetizada en agua, las cuales corresponden a la estructura monoclinica de CuO. Estas distancias pertenecen a los planos cristalinos (111), (200) y (202), así como al plano (111) de cobre metálico de una estructura cristalina cúbica. En la parte central de la

nanopartícula, se determinó la existencia del plano (111) del Cu_2O de estructura cristalina cúbica. En la Figura 36 (b) se muestra una imagen de la transformada de Fourier de la micrografía de HRTEM, donde se observan los planos (111), $(20\bar{2})$ y $(11\bar{1})$ del CuO y (200) y (111) del Cu_2O . En la micrografía TEM de la Figura 36 (c) se aprecian una variedad de NPs aisladas, cuya composición corresponde al cobre metálico orientado en el plano (111) y otras correspondientes al CuO orientado en el plano (202); en el recuadro se puede observar el patrón de difracción de electrones. En el caso de la Figura 36 (d) de HRTEM se observaron los planos (111) y (110) correspondientes a Cu_2O para la nanopartícula analizada.

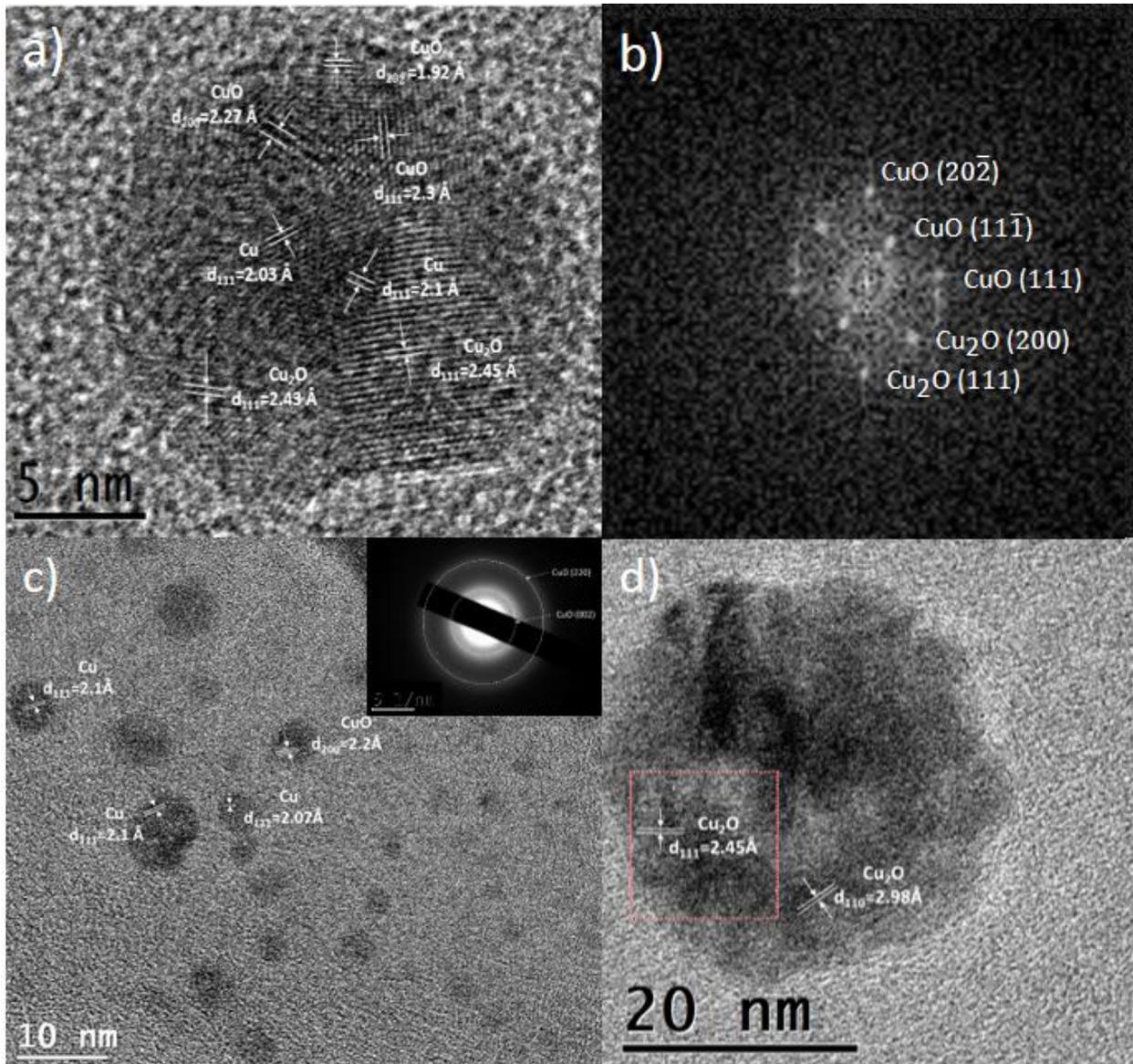


Figura 36. Micrografías HRTEM. a) Nanopartícula con núcleo de Cu y coraza de distintos óxidos. b) Imagen de la FFT. c) Nanopartículas de Cu y CuO . d) Nanopartícula de Cu_2O .

Se observa que las nanopartículas están compuestas por una mezcla de cobre metálico, CuO en su mayoría y Cu₂O en menor cantidad. Este resultado da soporte a los resultados obtenidos en las simulaciones para la absorción óptica de las NPs, donde el espectro simulado que describe de la manera más cercana al espectro experimental corresponde al de una NP de Cu@CuO.

4.6 Resultados de caracterización Raman

Las mediciones de espectroscopía Raman sugieren que una mezcla de fases CuO y Cu₂O coexisten en la estructura de las nanopartículas sintetizadas para la síntesis en agua y también para la síntesis en acetona.

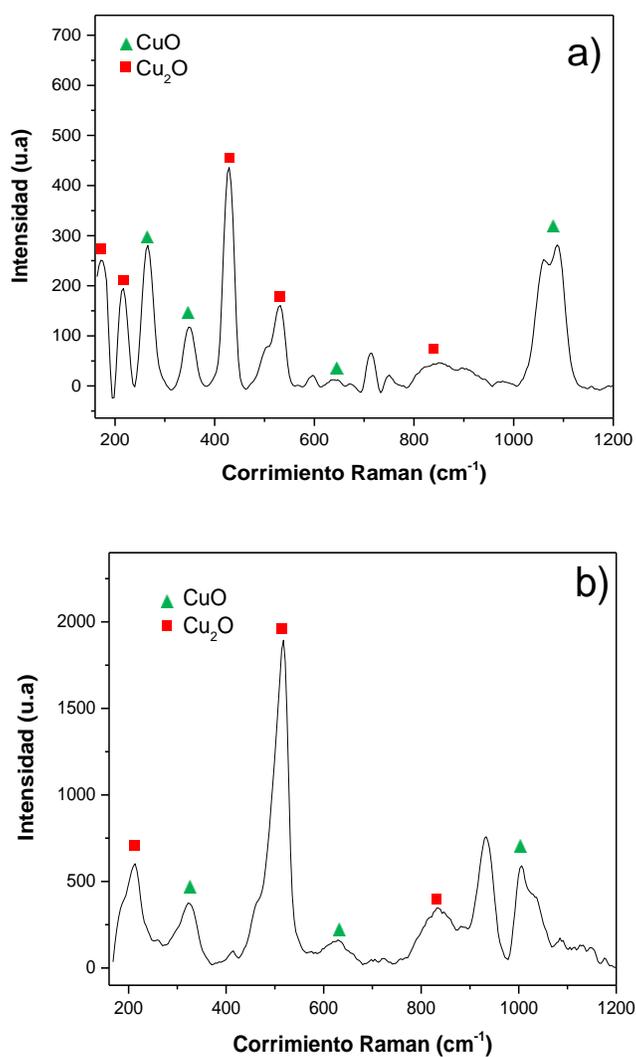


Figura 37. Espectros Raman de nanopartículas de CuO y Cu₂O en (a) agua y (b) acetona.

En la Figura 37 (a) las NPs sintetizadas en agua muestran las bandas correspondientes a las fases de óxido de cobre CuO y Cu₂O. En la Figura 37 (b) las NPs sintetizadas en acetona también presentan la misma mezcla de fases. Las bandas características de los espectros para ambas muestras de NPs se muestran en la Tabla 7 junto con el origen de cada banda y la posición de estas bandas según se reporta en la literatura.

Tabla 7. Posición de las bandas Raman identificadas en las NPs sintetizadas en agua y acetona; se incluye la fase del óxido de cobre al que pertenecen y la posición para estas bandas de acuerdo a la literatura.

Muestra en agua (cm ⁻¹)	Muestra en acetona (cm ⁻¹)	Modo de vibracional	Sistema	Pico de referencia (cm ⁻¹)
167			Cu ₂ O	154 (Ivanda <i>et al.</i> , 1997)
217	213	2Eu	Cu ₂ O	218 (Deng <i>et al.</i> , 2016) 220 (Singhal <i>et al.</i> , 2013)
262		Ag	CuO	260 (Dizajghorbani <i>et al.</i> , 2019)
348	321	Bg ₁	CuO	327 (Dizajghorbani <i>et al.</i> , 2019) 340 (Toparli <i>et al.</i> , 2017) 343 (Tran y Nguyen, 2014) 346 (Debbichi <i>et al.</i> , 2012) 347 (Deng <i>et al.</i> , 2016)
432		Multifonón	Cu ₂ O	400-490 (Toparli <i>et al.</i> , 2017) 436 (Ivanda <i>et al.</i> , 1997)
535	513		Cu ₂ O	515 (Ivanda <i>et al.</i> , 1997) 520 (Dizajghorbani <i>et al.</i> , 2019) 523 (Deng <i>et al.</i> , 2016)
593			CuO	591 (Deng <i>et al.</i> , 2016)
632	626	Bg ₂ T _{1u}	CuO Cu ₂ O	629 (Tran y Nguyen, 2014) 630-634 (Toparli <i>et al.</i> , 2017) 631 (Debbichi <i>et al.</i> , 2012) 635 (Toparli <i>et al.</i> , 2017)
715			Cu ₂ O	
	933			
	998		CuO	
1065		Multifonón	CuO	1000-1200 (Tran y Nguyen, 2014)
1090			CuO	

4.7 Análisis del potencial zeta

Se realizó la caracterización del potencial zeta de las NPs sintetizadas, pues el potencial zeta está relacionado en cierta medida con la capacidad bactericida de las NPs. Se sintetizaron nuevos coloides, uno en agua y uno en acetona, se usaron los mismos parámetros de irradiación utilizados para las muestras tomadas para los análisis anteriores; esto porque las muestras se deterioran con el tiempo y es necesario para una buena caracterización sintetizar coloides nuevos. De igual manera se caracterizaron por UV-VIS para comprobar que tuvieran las mismas propiedades ópticas que las muestras anteriores, corroborando el factor de reproducibilidad del experimento. También se sintetizó un nuevo coloide en la mezcla de agua destilada con ácido alfa-lipoico. Esto con la intención de recubrir a las NPs con el ácido alfa-lipoico y así evitar su aglomeración. Cabe mencionar además que el ácido alfa-lipoico se utiliza en aplicaciones biomédicas para ciertas funciones específicas como prevención de daños celulares, mejoramiento de la conducción neuronal, como antioxidante y en suplementos alimenticios, además que se ha estudiado desde el punto de vista clínico para el tratamiento de la diabetes e hipertensión arterial.

Para el estudio del potencial zeta, se tomaron las cantidades mostradas en la Tabla 8:

Tabla 8. Volúmenes de muestra tomados para la disolución del coloide para llevar a cabo el análisis de potencial zeta.

	Coloide (μL)	Buffer Ph 7.4 (ml)
Muestra en agua	400	800
Muestra en acetona	400	800
Agua con ácido lipoico	400	800

Para el caso de la muestra sintetizada en acetona, se desea remover las NPs del medio líquido, ya que la acetona es extremadamente dañina para las bacterias debido a su naturaleza corrosiva, por lo que se centrifugó por 15 minutos a 12k RPM y se removió por completo el líquido, quedando un pellet de NPs. Seguidamente, se tomó el pellet y se mezcló con la cantidad de buffer mostrada en la Tabla 8, sonicando la muestra para la dispersión de las NPs. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Tamaño promedio de las NPs y su respectivo potencial zeta.

	Tamaño promedio de NP (nm)	Potencial zeta (mV)
Muestra en agua	140	-13.1
Muestra en acetona	300	-13.4
Agua con ácido lipoico	100	-15.8
		35.3
		9.67

Los tamaños obtenidos de las NPs indican la posible aglomeración de éstas, ya que difieren con los obtenidos en los estudios realizados mediante TEM. Los resultados para los coloides en agua y acetona muestran un bajo potencial zeta alrededor de -13 mV, lo cual podría explicar la aglomeración de NPs, ya que según la literatura (Kumar *et al.*, 2017), para tener una estabilidad coloidal moderada, el potencial zeta deberá estar entre ± 30 a ± 40 mV. Sin embargo, para la muestra sintetizada en agua con ácido lipoico se obtienen tres distintas mediciones, es decir, hay NPs con tres valores de cargas en su mayoría, entre ellas un valor de 35 mV, el cual es un indicador de una buena estabilidad coloidal. Esta es una característica que beneficia a la inactivación bacteriana debido a que las NPs se mantendrán en tamaños nanométricos, penetrando la pared celular de la bacteria con mayor facilidad y repercutiendo en el organismo de la misma debido a los efectos bactericidas mencionados anteriormente.

4.8 Resultados de la concentración de NPs de Cu

Es de interés conocer la concentración de NPs obtenida en la síntesis, por lo tanto, llevando a cabo la metodología descrita en el capítulo 3, se pesaron los volúmenes del coloide y el agua destilada contenidos en el picnómetro con el capilar. Los resultados se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Datos obtenidos para los distintos medios líquidos.

	Peso (g)	Volumen (ml)
Coloide	10.486	-
Agua destilada	10.482	-
Volumen neto en el picnómetro	-	10.638

Con los datos de la Tabla 10, ahora se procede a calcular la concentración de NPs de Cu de la siguiente manera:

$$\frac{(10.486g) - (10.482g)}{10.638 ml} = 376.010 \frac{mg}{l}$$

La concentración obtenida es de 376.010 mg/l para el coloide de NPs de Cu sintetizada en agua.

4.9 Resultados de los ensayos de inhibición con *E. coli*

Una vez realizados los pasos correspondientes a los ensayos de inhibición con *E. coli*, se estudiaron los efectos antibacteriales de las NPs de Cu sintetizadas en este trabajo. Los resultados se muestran en la Tabla 11 y se observan en la Figura 38.

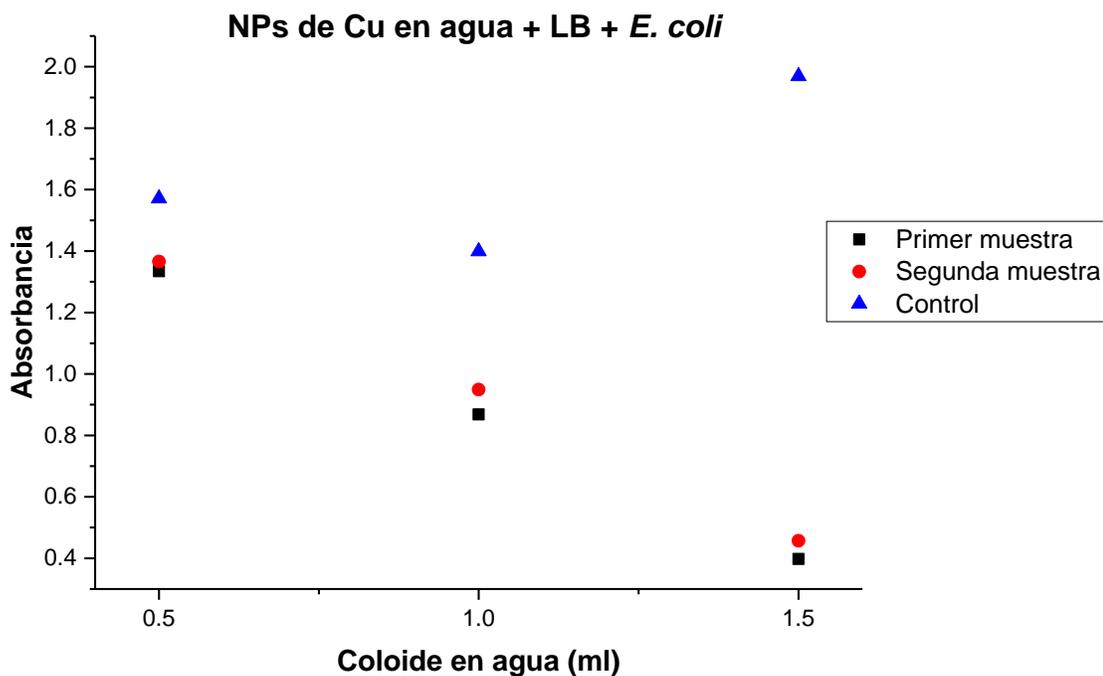


Figura 38. Absorbancia para las distintas muestras y para el control.

Tabla 11. Valores de absorbancia para cada una de las muestras.

Coloide en agua (ml)	Primer muestra (absorbancia)	Segunda muestra (absorbancia)	Control (absorbancia)	Diferencia entre primer muestra y control (absorbancia)	Diferencia entre segunda muestra y control (absorbancia)
0.5	1.334	1.366	1.571	0.237	0.205
1	0.868	0.949	1.399	0.531	0.45
1.5	0.398	0.457	1.969	1.571	1.512

En la Figura 38, podemos examinar el efecto inhibitorio de las NPs de Cu sobre la bacteria de *E. coli*, cuyos valores de absorbancia para los distintas muestras se encuentran en la Tabla 11. Se observa que, para un volumen de coloide de 0.5 ml mezclado con la bacteria, ambas series exhiben una pequeña diferencia en absorbancia en comparación con el control, correspondiente a un 15% de inhibición para la primera muestra y un 13% para la segunda muestra. Sin embargo, si se aumenta el volumen del coloide, es decir, para una mayor concentración de nanopartículas, la diferencia entre la absorbancia del control y el coloide con *E. coli* es mucho más notoria, obteniendo un 38% y 32% de inhibición para la primer y segunda muestra de 1 ml de coloide, respectivamente. El mejor resultado corresponde al coloide con el volumen de 1.5 ml para las dos series, en donde se alcanzó hasta el 80% de inhibición en la primera muestra y 77% de inhibición en la segunda muestra.

Aunque estos resultados son preliminares, demuestran el potencial de las NPs de Cu, Cu@CuO y Cu@Cu₂O sintetizadas por ALSL para la inhibición de *E. coli*. Sin embargo, es necesario implementar un mayor número de experimentos de inhibición para confirmar los efectos bactericidas de nuestras nanopartículas.

Capítulo 5. Conclusiones

En este trabajo, se pudo demostrar exitosamente la síntesis de nanopartículas de cobre por medio de la técnica de ablación láser de sólidos en líquidos. Se determinaron los parámetros de irradiación óptimos para obtener nanopartículas de cobre tipo núcleo-coraza, consiguiendo recubrimientos de óxido cúprico (CuO) y óxido cuproso (Cu₂O).

Encontramos que, para nanopartículas sintetizadas en agua, la morfología de éstas es esférica con tamaños desde 20 nm hasta 70 nm en su mayoría. En el caso de las nanopartículas sintetizadas en acetona, sus formas son cuasi esféricas, ya que la coraza no se forma de manera homogénea, y tenemos una distribución de tamaños que alcanza su máximo entre 5 y 15 nm aproximadamente.

El análisis del estudio UV-VIS nos ayudó a identificar la resonancia plasmónica característica del cobre, la cual se encuentra alrededor de 600 nm, y al estudiar el comportamiento del corrimiento en las bandas de resonancia obtenidos para ambos medios líquidos cuando se sintetizan nanopartículas de tipo núcleo-coraza.

Las simulaciones de la sección transversal de absorción nos brindaron una herramienta para analizar las propiedades ópticas de los diferentes óxidos, así como la contribución de los mismos en la coraza de la nanopartícula, y estimar el tamaño del núcleo de cobre y el espesor de la coraza de óxido de cobre.

La caracterización mediante TEM y Raman indican la presencia de CuO y Cu₂O, sin embargo, según los espectros UV-VIS, la fase del óxido dominante en las nanopartículas es el CuO.

Los ensayos preliminares de inhibición demuestran el efecto bactericida de estas nanopartículas núcleo-coraza de Cu@CuO siendo los resultados acordes a lo esperado. Esto marca una directriz de trabajo a futuro en este tema.

5.1. Trabajo a futuro

- Se propone estudiar de manera sistemática el efecto inhibitorio de las NPs de Cu sintetizadas en agua y acetona.

- Explorar alternativas que permitan lograr el recubrimiento adecuado de las nanopartículas con el objetivo de evitar su aglomeración, maximizando el potencial zeta.
- Sintetizar nanopartículas de cobre bajo otros medios líquidos como agua oxigenada, alcohol etílico, alcohol metílico, entre otros, e identificar las diferencias entre ellas.

Literatura citada

- Amendola, V., y Meneghetti, M. 2013. What controls the composition and the structure of nanomaterials generated by laser ablation in liquid solution? *Physical Chemistry Chemical Physics*, 15(9), 3027–3046.
- Ananth, A., Dharaneedharan, S., Heo, M.-S., y Mok, Y. S. 2015. Copper oxide nanomaterials: Synthesis, characterization and structure-specific antibacterial performance. *Chemical Engineering Journal*, 262, 179–188.
- Arreguín-Campos, M., Campos-Gonzalez, E., Guillén-Cervantes, A., Santos-Cruz, J., Mayén-Hernández, S. A., Zelaya-Angel, O., Olvera, M. de la L., Contreras-Puente, G., y de Moure-Flores, F. 2018. Synthesis of paramelaconite nanoparticles by laser ablation. *Journal of Laser Applications*, 30(1), 12012.
- Beyth, N., Hour-Haddad, Y., Domb, A., Khan, W., y Hazan, R. 2015. Alternative antimicrobial approach: nano-antimicrobial materials. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, 2015, 246012.
- Bozzola, A., Perotto, S., y De Angelis, F. 2017. Hybrid plasmonic-photonic whispering gallery mode resonators for sensing: A critical review. *Analyst*, 142(6), 883–898.
- Bradbury, S., Ford, Brian J. y Joy, David C. 2019. transmission electron microscope. *Encyclopedia Britannica*. Consultado el 7 de marzo de 2022 de: <https://www.britannica.com/technology/transmission-electron-microscope>
- Brandelli, A., Ritter, A. C., y Veras, F. F. 2017. Antimicrobial Activities of Metal Nanoparticles. In M. Rai Ph.D y R. Shegokar Ph.D (Eds.), *Metal Nanoparticles in Pharma* (pp. 337–363). *Springer International Publishing*.
- Brooks, G. F., Butel, J. S., Carroll, K. C., Mietzner, T. A., y Morse, S. A. 2007. Jawetz, Melnick y Adelberg's Medical Microbiology: 24th Edition. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, 7(3), 273–275.
- Byskov-Nielsen, J., Savolainen, J. M., Christensen, M. S., y Balling, P. 2010. Ultra-short pulse laser ablation of metals: Threshold fluence, incubation coefficient and ablation rates. *Applied Physics A: Materials Science and Processing*, 101(1), 97–101.
- Camacho López, M. A., Reyes Contreras, D., Mayorga Rojas, M., Díaz Sánchez, L. E., Reyes Contreras, A., Arrieta Castañeda, A., Vilchis Nestor, R., y Camacho López, S. 2014. Síntesis de puntos cuánticos de CdTe mediante la técnica de ablación láser de sólidos en líquidos. *Superficies y Vacío*, 27(3), 93–97.
- Chen, Z., Deutsch, T. G., Dinh, H. N., Domen, K., Emery, K., Forman, A. J., Gaillard, N., Garland, R., Heske, C., Jaramillo, T. F., Kleiman-Shwarscstein, A., Miller, E., Takanabe, K., y Turner, J. 2013. *UV-Vis Spectroscopy* (pp. 49–62).

- Chiriac, V., Stratulat, D. N., Calin, G., Nichitus, S., Burlui, V., Stadoleanu, C., Popa, M., y Popa, I. M. 2016. Antimicrobial property of zinc based nanoparticles. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 133(1).
- Collins, J. F., y Klevay, L. M. 2011. Copper. *Advances in Nutrition*, 2(6), 520–522.
- Conte, A., Longano, D., Costa, C., Ditaranto, N., Ancona, A., Cioffi, N., Scrocco, C., Sabbatini, L., Contò, F., y Del Nobile, M. A. 2013. A novel preservation technique applied to fiordilatte cheese. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 19, 158–165.
- Croxen, M. A., y Finlay, B. B. 2010. Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, 8(1), 26–38.
- Debbichi, L., Marco De Lucas, M. C., Pierson, J. F., y Krüger, P. 2012. Vibrational properties of CuO and Cu₄O₃ from first-principles calculations, and raman and infrared spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry C*, 116(18), 10232–10237.
- Deng, Y., Handoko, A. D., Du, Y., Xi, S., y Yeo, B. S. 2016. In Situ Raman Spectroscopy of Copper and Copper Oxide Surfaces during Electrochemical Oxygen Evolution Reaction: Identification of Cu III Oxides as Catalytically Active Species. *ACS Catalysis*, 6(4), 2473–2481.
- Dhas, N. A., Raj, C. P., y Gedanken, A. 1998. Synthesis, Characterization, and Properties of Metallic Copper Nanoparticles. *Chemistry of Materials*, 10(5), 1446–1452.
- Di Capua, R., Offi, F., y Fontana, F. 2014. Check the Lambert-Beer-Bouguer law: A simple trick to boost the confidence of students toward both exponential laws and the discrete approach to experimental physics. *European Journal of Physics*, 35(4).
- Dizajghorbani Aghdam, H., Azadi, H., Esmailzadeh, M., Moemen Bellah, S., y Malekfar, R. 2019. Ablation time and laser fluence impacts on the composition, morphology and optical properties of copper oxide nanoparticles. *Optical Materials*, 91(October 2018), 433–438.
- Enríquez-Sánchez, N., Vilchis-Nestor, A. R., Camacho-López, S., Camacho-López, M. A., y Camacho-López, M. 2020. Influence of ablation time on the formation of manganese oxides synthesized by laser ablation of solids in liquids. *Optics Laser Technology*, 131, 106418.
- Esteban-Cubillo, A., Pecharromán, C., Aguilar, E., Santarén, J., y Moya, J. S. 2006. Antibacterial activity of copper monodispersed nanoparticles into sepiolite. *Journal of Materials Science*, 41(16), 5208–5212.
- Esteban-Tejeda, L., Malpartida, F., Esteban-Cubillo, A., Pecharromán, C., y Moya, J. S. 2009. Antibacterial and antifungal activity of a soda-lime glass containing copper nanoparticles. *Nanotechnology*, 20(50), 505701.
- Farrokhi, Z., Ayati, A., Kanvisi, M., y Sillanpää, M. 2019. Recent advance in antibacterial activity of nanoparticles contained polyurethane. *Journal of Applied Polymer Science*, 136(4), 46997.

- Friedmann, H. C. B. T.-A. in A. M. 2006. Escherich and Escherichia (Vol. 60, pp. 133–196). Academic Press.
- Franci, G., Falanga, A., Galdiero, S., Palomba, L., Rai, M., Morelli, G., y Galdiero, M. 2015. Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 20(5), 8856–8874.
- Grand, J., y Le Ru, E. C. 2020. Practical Implementation of Accurate Finite-Element Calculations for Electromagnetic Scattering by Nanoparticles. *Plasmonics*, 15(1), 109–121.
- Hajipour, M. J., Fromm, K. M., Akbar Ashkarran, A., Jimenez de Aberasturi, D., Larramendi, I. R. de, Rojo, T., Serpooshan, V., Parak, W. J., y Mahmoudi, M. 2012. Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in Biotechnology*, 30(10), 499–511.
- Hossain, K. M. Z., Patel, U., y Ahmed, I. 2015. Development of microspheres for biomedical applications: a review. *Progress in Biomaterials*, 4(1), 1–19.
- Ingle, A. P., Duran, N., y Rai, M. 2014. Bioactivity, mechanism of action, and cytotoxicity of copper-based nanoparticles: A review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(3), 1001–1009.
- Ivanda, M., Waasmaier, D., Endriss, A., Ihringer, J., Kirfel, A., y Kiefer, W. 1997. Low-temperature anomalies of cuprite observed by raman spectroscopy and X-ray powder diffraction. *Journal of Raman Spectroscopy*, 28(7), 487–493.
- Jaramillo, J. D., Sanchez, L. E. Ll., y Amaris, H. V. 2006. Estructura cristalina del cobre, propiedades macroscopicas mecanicas y de procesamiento. *Ciencia e Ingenieria Neogranadina*, 16(2), 9.
- Jayaprakash, J., Srinivasan, N., y Chandrasekaran, P. 2014. Surface modifications of CuO nanoparticles using Ethylene diamine tetra acetic acid as a capping agent by sol-gel routine. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 123, 363–368.
- Jee, Y., Becker, M. F., y Walsler, R. M. 1988. Laser-induced damage on single-crystal metal surfaces. *Journal of the Optical Society of America B*, 5(3), 648.
- Kumar, B., Smita, K., Cumbal, L., Debut, A., y Angulo, Y. 2017. Biofabrication of copper oxide nanoparticles using Andean blackberry (*Rubus glaucus* Benth.) fruit and leaf. *Journal of Saudi Chemical Society*, 21, S475–S480.
- Lee, J., Tsai, M., Chen, P., Chen, T., Chan, K., Lee, C., y Lee, R. 2015. Thickness Effects on Light Absorption and Scattering for Nanoparticles in the Shape of Hollow Spheres. *Journal of Physical Chemistry C*, 119, 25754–25760.
- Lemire, J. A., Harrison, J. J., y Turner, R. J. 2013. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nature reviews. Microbiology*, 11(6), 371–384.

- Longano, D., Ditaranto, N., Cioffi, N., Di Niso, F., Sibillano, T., Ancona, A., Conte, A., Del Nobile, M. A., Sabbatini, L., y Torsi, L. 2012. Analytical characterization of laser-generated copper nanoparticles for antibacterial composite food packaging. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403(4), 1179–1186.
- Makvandi, P., Gu, J., Nazarzadeh Zare, E., Ashtari, B., Moeini, A., Tay, F., y Niu, L. 2019. Polymeric and inorganic nanoscopic antimicrobial fillers in dentistry: A review. *Acta Biomaterialia*, 101, 69-101.
- Makvandi, P., Wang, C., Zare, E. N., Borzacchiello, A., Niu, L., y Tay, F. R. 2020. Metal-Based Nanomaterials in Biomedical Applications: Antimicrobial Activity and Cytotoxicity Aspects. *Advanced Functional Materials*, 30(22), 1910021.
- Masson, J. 2020. Portable and field-deployed surface plasmon resonance and plasmonic sensors. *Analyst*, 145(11), 3776–3800.
- Peña-Rodríguez, O., y Pal, U. 2011. Effects of surface oxidation on the linear optical properties of Cu nanoparticles. *Journal of the Optical Society of America B*, 28(11), 2735.
- Pfeiffer, P.A. 2018. *Estudio del daño a bacterias por nanopartículas plasmónicas de plata y oro*. [Tesis de Maestría, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla]. Repositorio Institucional-Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Purohit, P., Samadi, A., Bendix, P. M., Laserna, J. J., y Oddershede, L. B. 2020. Optical trapping reveals differences in dielectric and optical properties of copper nanoparticles compared to their oxides and ferrites. *Scientific Reports*, 10(1), 1–10.
- Raffi, M., Mehrwan, S., Bhatti, T. M., Akhter, J. I., Hameed, A., Yawar, W., y Ul Hasan, M. M. 2010. Investigations into the antibacterial behavior of copper nanoparticles against Escherichia coli. *Annals of Microbiology*, 60(1), 75–80.
- Rai, M., y Shegokar, R. 2017. Metal nanoparticles in pharma. *Metal Nanoparticles in Pharma, July 2018*, 1–493.
- Rajawat, S., y Qureshi, M. S. 2012. Comparative Study on Bactericidal Effect of Silver Nanoparticles, Synthesized Using Green Technology, in Combination with Antibiotics on Salmonella Typhi. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 03(04), 480–485.
- Ramyadevi, J., Jeyasubramanian, K., Marikani, A., Rajakumar, G., y Rahuman, A. A. 2012. Synthesis and antimicrobial activity of copper nanoparticles. *Materials Letters*, 71, 114–116.
- Ravishankar Rai, V., y Jamuna Bai, a. 2011. Nanoparticles and their potential application as antimicrobials. *Formatex*, 197–209.
- Reyes-Contreras, D., Camacho-López, M., Camacho-López, M. A., Camacho-López, S., Rodríguez-Beltrán, R. I., y Mayorga-Rojas, M. 2015. Influence of the per pulse laser fluence on the optical properties of carbon nanoparticles synthesized by laser ablation of solids in liquids. *Optics and Laser Technology*, 74, 48–52.

- Rojas, B. 2013. Zeta-Meter Inc. *Academia.edu*. Consultado el 7 de marzo del 2022 en: https://www.academia.edu/4973310/Zeta_Meter_Inc
- Ruparelia, J. P., Chatterjee, A. K., Duttagupta, S. P., y Mukherji, S. 2008. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta Biomaterialia*, 4(3), 707–716.
- Sadrolhosseini, A. R., Mahdi, M. A., Alizadeh, F., y Rashid, S. A. 2018. Laser ablation technique for synthesis of metal nanoparticle in liquid. *Laser Technology and its Applications*, 63-81.
- Seil, J. T. y Webster, T. J. 2012. Antimicrobial applications of nanotechnology: Methods and literature. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 2767–2781.
- Singhal, A., Pai, M.R., Rao, R., Pillai, K.T., Lieberwirth, I. y Tyagi, A.K. 2013, Copper(I) Oxide Nanocrystals – One Step Synthesis, Characterization, Formation Mechanism, and Photocatalytic Properties. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2013: 2640-2651.
- Theivasanthi, T., y Alagar, M. 2011. *Studies of copper nanoparticles effects on micro-organisms*. *arXiv preprint arXiv:1110.1372*.
- Tilaki, R. M., Zad, A. I., y Mahdavi, S. M. 2007. Size, composition and optical properties of copper nanoparticles prepared by laser ablation in liquids. *Applied Physics A: Materials Science and Processing*, 88(2), 415–419.
- Toparli, C., Sarfraz, A., Wieck, A. D., Rohwerder, M., y Erbe, A. 2017. In situ and operando observation of surface oxides during oxygen evolution reaction on copper. *Electrochimica Acta*, 236, 104–115.
- Tran, T. H., y Nguyen, V. T. 2014. Copper Oxide Nanomaterials Prepared by Solution Methods, Some Properties, and Potential Applications: A Brief Review. *International Scholarly Research Notices*, 1-14.
- Varios autores 1984, *Enciclopedia de Ciencia y Técnica. Tomo 4 Cobre*, Salvat Editores S.A. ISBN 84-345-4490-3.
- Wang, S., Huang, X., He, Y., Huang, H., Wu, Y., Hou, L., Liu, X., Yang, T., Zou, J., y Huang, B. 2012. Synthesis, growth mechanism and thermal stability of copper nanoparticles encapsulated by multi-layer graphene. *Carbon*, 50(6), 2119–2125.
- Wang, W., Zhou, Q., Fei, X., He, Y., Zhang, P., Zhang, G., Peng, L., y Xie, W. 2010. Synthesis of CuO nano- and micro-structures and their Raman spectroscopic studies. *CrystEngComm*, 12(7), 2232–2237.
- Wei, Y., Chen, S., Kowalczyk, B., Huda, S., Gray, T. P., y Grzybowski, B. A. 2010. Synthesis of stable, low-dispersity copper nanoparticles and nanorods and their antifungal and catalytic properties. *Journal of Physical Chemistry C*, 114(37), 15612–15616.

Wikipedia Contributors. Copper(II) oxide. Wikipedia; Wikimedia Foundation. Consultado el 7 de marzo del 2022 en: [https://en.wikipedia.org/wiki/Copper\(II\)_oxide](https://en.wikipedia.org/wiki/Copper(II)_oxide)

Wikipedia Contributors. Copper(I) oxide. *Wikipedia*; Wikimedia Foundation. Consultado el 7 de marzo del 2022 en: [https://en.wikipedia.org/wiki/Copper\(I\)_oxide](https://en.wikipedia.org/wiki/Copper(I)_oxide)

Yoon, J., Baca, A. J., Park, S. I., Elvikis, P., Geddes, J. B., 3rd, Li, L., Kim, R. H., Xiao, J., Wang, S., Kim, T. H., Motala, M. J., Ahn, B. Y., Duoss, E. B., Lewis, J. A., Nuzzo, R. G., Ferreira, P. M., Huang, Y., Rockett, A., y Rogers, J. A. 2008. Ultrathin silicon solar microcells for semitransparent, mechanically flexible and microconcentrator module designs. *Nature materials*, 7(11), 907–915.

Yushanov, S., Crompton, J. S., y Koppenhoefer, K. C. 2013. Mie Scattering of Electromagnetic Waves. Consultado el 7 de marzo de 2022 de: https://www.comsol.jp/paper/download/181101/crompton_paper.pdf

Zamora-Romero, N., Camacho-Lopez, M. A., Camacho-Lopez, M., Vilchis-Nestor, A. R., Castrejon-Sanchez, V. H., Camacho-Lopez, S., y Aguilar, G. 2019. Molybdenum nanoparticles generation by pulsed laser ablation and effects of oxidation due to aging. *Journal of Alloys and Compounds*, 788, 666–671.

Zamora-Romero, N., Camacho-Lopez, M. A., Vilchis-Nestor, A. R., Castrejon-Sanchez, V. H., Aguilar, G., Camacho-Lopez, S., y Camacho-Lopez, M. 2020. Synthesis of molybdenum oxide nanoparticles by nanosecond laser ablation. *Materials Chemistry and Physics*, 240, 122163.