



**IPICYT**

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN  
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

**POSGRADO EN NANOCIENCIAS Y MATERIALES**

**Nanoestructuras de NPsAg/TNT y Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/TNT como  
alternativa para la degradación de contaminantes y  
como agentes microbicidas**

Tesis que presenta

**Blanca Perla Núñez Luna**

Para obtener el grado de

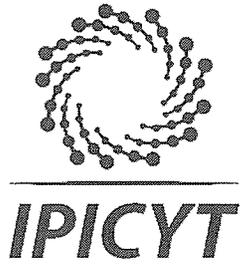
**Maestra en Nanociencias y Materiales**

Codirectores de la Tesis:

**Dr. Vicente Rodríguez González**

**Dr. Alejandro De Las Peña Nava**

**San Luis Potosí, S.L.P, 28 junio 2018**

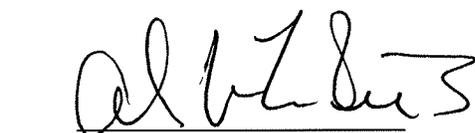


## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “*Nanoestructuras de  $NP_sAg/TNT$  y  $Ag_3PO_4/TNT$  como alternativa para la degradación de contaminantes y como agentes microbicidas*” presentada para obtener el Grado de Maestra en Nanociencias y Materiales fue elaborada por **Blanca Perla Núñez Luna** y aprobada el **veintiocho de junio de dos mil dieciocho** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Materiales Avanzados del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.



**Dr. Vicente Rodríguez González**  
Codirector de la tesis



**Dr. Alejandro De Las Peñas Nava**  
Codirector de la tesis



**Dr. Horacio Flores Zúñiga**  
Miembro del Comité Tutorial



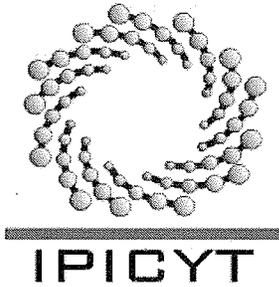
**Dra. Gladis Judith Labrada Delgado**  
Miembro del Comité Tutorial



## **Créditos Institucionales**

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Materiales y Catálisis Heterogénea Ambiental de la División de Materiales Avanzados y en el Laboratorio de Microbiología Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la codirección de los doctores Dr. Vicente Rodríguez González y Dr. Alejandro De Las Peñas Nava.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (592101) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 032 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Nanociencias y Materiales está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 28 días del mes de junio del año 2018, se reunió a las 17:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Horacio Flores Zúñiga</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. Gladis Judith Labrada Delgado</b>	<b>Secretaria</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Alejandro De Las Peñas Nava</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Vicente Rodríguez González</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**MAESTRA EN NANOCIENCIAS Y MATERIALES**

sustentó la C.

**Blanca Perla Núñez Luna**

sobre la Tesis intitulada:

*Nanoestructuras de  $NP_{5}Ag/TNT$  y  $Ag_{3}PO_{4}/TNT$  como alternativa para la degradación de contaminantes y como agentes microbicidas*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dr. Alejandro De Las Peñas Nava**  
**Dr. Vicente Rodríguez González**

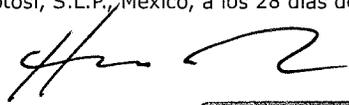
El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLA**

Dándose por terminado el acto a las 18:34 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 28 días del mes de junio de 2018.

  
**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado

  
**Dr. Horacio Flores Zúñiga**  
Secretario Académico



La zona de confort es un hermoso lugar, pero nada crece ahí. Lo desconocido es el lugar donde se produce el crecimiento.  
Wayne Dyer

*A mis padres  
Araceli Patricia Luna Solís  
Benito Ricardo Núñez Dávila*

## **Agradecimientos**

Al instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica por la oportunidad de realizar mis estudios de maestría y los recursos necesarios para la realización y conclusión de este trabajo. Así también a los profesores que contribuyen en mi aprendizaje.

A mis directores de tesis el Dr. Vicente Rodríguez González y el Dr. Alejandro De Las Peñas Nava. Por permitirme trabajar a su lado, por compartir su tiempo y sus conocimientos y sobre todo por la confianza.

Al comité tutorial, la Dra. Gladis Judith Labrada Delgado y al Dr. Horacio Flores Zuñiga por su paciencia, sus conocimientos impartidos, correcciones y discusiones para la mejora de este trabajo. Así también al coordinador de la División de Materiales el Dr. Armando Encinas Oropesa por todo su apoyo en especial en estos últimos días, muchas gracias.

Esto no habría sido posible sin la ayuda de los técnicos del Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología (LINAN) de la División de Materiales Avanzados, especialmente: la Dra. Gladis Judith Labrada Delgado, M en C. Ana Iris Peña Maldonado, M en C. Beatriz Adriana Rivera Escoto y al Dr. Héctor Silva, por todo el apoyo técnico brindado durante este proceso. A la Dra. Ma. Guadalupe Gutiérrez Escobedo del Laboratorio de Microbiología Molecular y a la Dra. Olivia Araceli Patrón, de la División de Biología Molecular, por todo el apoyo y todo el conocimiento brindado. A la Dra. Carolina Martínez Sánchez por todo su apoyo estos últimos días. A Gloria, sin ella el trabajo de laboratorio de Biología no sería el mismo.

A la beca otorgada por COPOCYT para asistir al 5th Latin.American Congress of Photocatalysis, Photoelectrochemistry and Photobiology.

A mis amigos, a Silvia Mares y Mauricio Sánchez gracias por su amistad inigualable sin ustedes nunca hubiera sido lo mismo. A Carolina Mendoza, Claudia Espinoza y Anayeli, ¡chicas Rocka!. A Meli eres la Potosina más increíble, gracias por tu amistad. A Etel Maya por tu amistad y apoyo. A Betsabé Flores el destino nuevamente nos junta, y lo que falta gracias por todo. A Bety, Panchis, José, Ale y Cas por la amistad y la grata convivencia. A Fer, Kevin Brayan y Roque por la amistad brinda.

A mis compañeros del Laboratorio de Materiales: Silvia, Facundo, Carolina, Roberto, Claudia, Etel, Melisa, Jorge, Lu. A mis compañeros del Laboratorio de Biología Molecular: Norma, Eunice, Osney, Oscar, Isis, José, ya que con ellos he compartido laboratorio e incontables horas de trabajo y buenos ratos, lo cual no tiene precio. Por todo el tiempo que me han dado, por las conversaciones científicas, por el respaldo y la amistad, gracias.

Arturo, por ser, por estar, por existir, gracias por el apoyo y el ánimo todo este tiempo.

A mi familia, en especial a mis hermas Karen y Lizbeth por hacer siempre de mis idas a casa las mejores gracias por todo hermanas las amo. A mi abuelita Pili por siempre recibirme con todo el amor y sobre todo por la comida más rica del mundo. A mi abue Esperanza por todo su cariño.

Todo esto no hubiera sido posible sin el apoyo incondicional que me otorgaron y el cariño que me inspiraron mis padres, quienes son de mis más grandes motivaciones y figuras de admiración, quienes me han enseñado a trabajar duro y a nunca darme por vencida. Que a pesar de la distancia siempre estuvieron a mi lado para saber cómo iba mi proceso y que entendieron mi ausencia. Que gracias a su apoyo y consejos he llegado a realizar otra de mis metas. Gracias por todo el cariño y el sacrificio que han hecho en estos años, por creer en mí, por ayudarme y solventar cada uno de mis proyectos. Las palabras

nunca serán suficientes para testimoniar mi aprecio y mi infinito agradecimiento,  
los amo.

Y principalmente a Dios.

# Contenido

Constancia de aprobación de la tesis .....	II
Créditos Institucionales .....	III
Acta de examen.....	IV
Agradecimientos .....	VIII
Contenido .....	XI
Lista de tablas.....	IX
Lista de figuras .....	X
Abreviaturas .....	XII
Resumen .....	XIV
Abstract .....	XV
INTRODUCCIÓN.....	1
Hipótesis.....	4
OBJETIVO GENERAL .....	4
Objetivos específicos.....	4
Justificación .....	5
I. ANTECEDENTES GENERALES .....	2
1.1. Enfermedades infecciosas .....	2
1.2. <i>Escherichia coli</i> .....	2
1.3. <i>Candida glabrata</i> .....	5
1.4. Titanatos a base de dióxido de titanio .....	6
1.5. Síntesis de titanatos de hidrógeno .....	9
1.5.1. Mecanismo de síntesis de TNT .....	11
1.5.2. Nanotubos modificados.....	12
1.6. Nanopartículas de plata .....	14
1.7. Fosfato de plata .....	16
1.8. Métodos de preparación de nanopartículas soportadas.....	17
II. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	20
2.1. Síntesis hidrotermal de titanatos de hidrógeno .....	20
2.2. Síntesis de partículas de $Ag_3PO_4$ .....	20

2.3. Foto-depósito de nanopartículas de plata .....	21
2.4. Foto-depósito de partículas de fosfato de plata.....	21
2.5. Técnicas de caracterización.....	22
2.5.1. Difracción de rayos X (XRD) .....	22
2.5.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	23
2.5.3. Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	23
2.5.4. Espectroscopia de UV-Visible de reflectancia difusa (ERD) .....	24
2.5.5. Fisorción de N <sub>2</sub> .....	24
2.6. Reacciones evaluadas .....	25
2.6.1. Reacción de degradación de eosina amarillenta con AgXTNT y Ag <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> XTNH.....	25
2.6.2. Reacción antimicrobiana de AgXTNT con <i>E.coli</i> . .....	26
2.6.2.1. Crecimiento con <i>E. coli</i> . .....	26
2.6.2.2. Evaluación antimicrobiana con AgXTNT de <i>E. coli</i> .....	26
2.6.2.3. Caracterización morfológica de <i>E. coli</i> .....	27
2.6.3. Reacción antifúngica de Ag <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> XTNT en <i>C. glabrata</i> .....	28
2.6.3.1. Crecimiento de <i>C. glabrata</i> .....	28
2.6.3.2. Evaluación antifúngica de <i>C. glabrata</i> con TNT.....	28
2.7. Ensayo de sensibilidad a Ag <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> y cálculo de MIC50 con <i>C. glabrata</i> .....	29
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
3.1. Difracción de rayos X.....	31
3.2. Fisorción de Nitrógeno .....	33
3.3. Espectroscopia UV-Vis de Reflectancia Difusa .....	36
3.4. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) y de Barrido (MEB) .....	39
3.5. Reacciones fotocatalíticas .....	43
3.5.1. Reacción de degradación de Eosina amarillenta con TNT y AgXTNT. ....	43
3.5.2. Reacción de degradación de Eosina amarillenta con TNT y Ag <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> XTNT. ....	44
3.5.3. Evaluación de actividad antimicrobiana de AgXTNT en <i>E. coli</i> .....	46
3.5.3.1. Morfología y estructura de <i>E. coli</i> por microscopía electrónica de barrido .....	48
3.5.4. Evaluación de actividad antifúngica de Ag <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> XTNT en <i>C. glabrata</i> .....	53
IV. CONCLUSIONES.....	59
Perspectivas .....	61
REFERENCIAS .....	62
ANEXOS .....	73

## Lista de tablas

<b>Tabla 2.1.</b> Condiciones de experimentos para la evaluación antimicrobiana de TNT en <i>C. glabrata</i> .	35
<b>Tabla 3.1.</b> Área superficial, volumen y diámetro de poro de los materiales AgXTNT y TNT.	39
<b>Tabla 3.2.</b> Área superficial, volumen y diámetro de poro de los materiales Ag <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> XTNT y TNT.	41
<b>Tabla 3.3.</b> Eg para los materiales sintetizados por el método hidrotermal TNT y AgXTNT.	43
<b>Tabla 3.4.</b> Eg para los materiales sintetizados por el método hidrotermal TNT y Ag <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> XTNT.	44

## Lista de figuras

<b>Figura 1.1.</b> Diferentes mecanismos de acción contra células bacterianas por ERO.	8
<b>Figura 1.2.</b> Esquema representativo de la activación fotocatalítica del $\text{TiO}_2$ .	12
<b>Figura 1.3.</b> Esquema representativo del mecanismo de formación de titanatos de hidrógeno por el método hidrotermal.	16
<b>Figura 1.4.</b> Esquema representativo del acoplamiento de dos semiconductores cuando son irradiados.	18
<b>Figura 1.5.</b> Celda unitaria del $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ que presenta una estructura cúbica centrada en el cuerpo (CCC), donde los átomos azules representan la plata, los morados el fosfato y los rojos el oxígeno y la CCC está formada por $\text{PO}_4$ .	21
<b>Figura 1.6.</b> Esquema representativo del método de síntesis fotoquímica, 1) síntesis directa, 2) síntesis por medio de sensibilizadores.	22
<b>Figura 3.1.</b> Patrón de difracción de rayos-X, a) TNT y $\text{AgXTNT}$ , b) TNT y $\text{Ag}_3\text{PO}_4\text{XTNT}$ los triángulos denotan los picos característicos de los TNT $9.77^\circ$ , $24.05^\circ$ y $27.82^\circ$ .	35
<b>Figura 3.2.</b> Patrón de difracción de rayos X, a) $\text{Ag}_3\text{PO}_4\text{XTNT}$ , b) partículas de $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ .	36
<b>Figura 3.3.</b> Isotermas de adsorción-desorción de TNT sintetizados por el método hidrotermal y TNT funcionalizados con NPsAg.	37
<b>Figura 3.4.</b> Isotermas de adsorción-desorción de TNT sintetizados por el método hidrotermal y TNT funcionalizados con $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ .	38
<b>Figura 3.5.</b> Espectro UV-Vis RD de $\text{AgXTNT}$ , sintetizados por el método hidrotermal.	39
<b>Figura 3.6.</b> Espectro UV-Vis RD de TNT, $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ y $\text{Ag}_3\text{PO}_4\text{XTNT}$ , sintetizados por el método hidrotermal.	41
<b>Figura 3.7.</b> Imágenes a) HRTEM donde muestra la morfología de los TNT, b) MEB por electrones secundarios de la morfología de los TNT, c) espectro EDS de los TNT.	43
<b>Figura 3.8.</b> Imágenes de, HAADF del fotocatalizador $\text{Ag}_3\text{PO}_4\text{TNT}$ , b) HAADF del fotocatalizador $\text{Ag}_3\text{PO}_4\text{TNT}$ , c) HERTM del fotocatalizador $\text{Ag}_3\text{PO}_4\text{TNT}$ , d) espectro EDS de $\text{Ag}_3\text{PO}_4\text{TNT}$ .	44
<b>Figura 3.9.</b> $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ , a) imagen MEB en electrones secundarios, b) análisis químico por EDS.	46
<b>Figura 3.10.</b> Gráficas a) degradación de eosina amarillenta, b) adsorción del colorante eosina amarillenta con el fotocatalizador $\text{Ag}_1\text{TNT}$ .	47
<b>Figura 3.11.</b> Gráficas a) degradación de eosina amarillenta, b) adsorción del colorante eosina amarillenta con el fotocatalizador $\text{Ag}_3\text{PO}_4\text{TNT}$ .	48
<b>Figura 3.12.</b> Degradación fotocatalítica de eosina con la adición de sacrificantes a) $\text{Ag}_1\text{TNT}$ , b) $\text{Ag}_3\text{PO}_4\text{TNT}$ para identificar especies de oxígeno reactivas responsables de la fotodegradación.	49
<b>Figura 3.13.</b> Gráfica de viabilidad normalizado a 1 contra tiempo de exposición, donde 1 es igual a $1 \times 10^9$ cel/mL de de <i>E. coli</i> .	50

<b>Figura 3.14.</b> Evaluación morfológica de <i>E. coli</i> después de 45 min con diferentes tratamientos por MEB, A) control, B) Ag3%TNT luz, C) Ag3%TNT en condiciones de oscuridad y D) TNT.	52
<b>Figura 3.15.</b> Evaluación morfológica por MET de <i>E. coli</i> después de 45 min, expuestos a diferentes tratamientos, a) control, b) Ag3%TNT, c) Ag3%TNT en condiciones de oscuridad y d) TNT.	54
<b>Figura 3.16.</b> Representación esquemática de los procesos fotocatalíticos que permiten la inactivación fotocatalítica de <i>E. coli</i> por Ag 3%TNT irradiadas con luz visible: ME: membrana externa, MI: membrana interna, CB: banda de conducción y VB: banda de valencia.	55
<b>Figura 3.17.</b> Gráfica de viabilidad normalizado a 1 donde 1 es igual a $2 \times 10^7$ cel/mL de actividad antimicrobiana de TNT sobre <i>C. glabrata</i> .	56
<b>Figura 3.18.</b> Gráfica de viabilidad normalizado a 1 donde 1 es igual a $2 \times 10^7$ UFC/mL, de <i>C. glabrata</i> expuesta a Ag <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 5%TNT con y sin irradiación.	57
<b>Figura 3.19.</b> Gráfica de viabilidad normalizado a 1 donde 1 es igual a $2 \times 10^7$ células/mL, de <i>C. glabrata</i> expuesta a 50 µg de Ag <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> con y sin irradiación.	58
<b>Figura 3.20.</b> Gráfica de crecimiento de <i>C. glabrata</i> a diferentes concentraciones de Ag <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> a 1 densidad óptica de 600 nm.	59
<b>Figura 3.21.</b> Gráfica de densidad óptica a 600 nm donde 1 D.O es igual a $2 \times 10^7$ UFC/mL de se muestras diferentes cepas mutantes de <i>C. glabrata</i> , expuestas a diferentes concentraciones de Ag <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> para obtener el MIC50.	60
<b>Figura A.1.</b> Gráficas de viabilidad de <i>C. glabrata</i> expuesta a Ag <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 1%TNT bajo irradiación de luz visible.	70
<b>Figura A.2.</b> Gráficas de viabilidad de <i>C. glabrata</i> expuesta a Ag <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0.25%TNT bajo irradiación de luz visible.	70
<b>Figura A.3.</b> Gráficas de viabilidad de <i>C. glabrata</i> expuesta a Ag3%TNT bajo irradiación de luz visible.	71

## Abreviaturas

<b>ADN</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>BET</b>	Método Brunaver Emmett Teller
<b>BC</b>	Banda de conducción
<b>BV</b>	Banda de valencia
<b>CCC</b>	Cúbica centrada en el cuerpo
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfoxido
<b>D.O</b>	Densidad óptica
<b>DRX</b>	Difracción de rayos-X
<b>EDS</b>	Espectroscopia de dispersión de rayos-X
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminatetraacético
<b>Eg</b>	Energía de banda prohibida
<b>EPS</b>	Sustancias poliméricas extracelulares
<b>ERO</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>HAADF</b>	High-Angle Annular Dark Field Scanning
<b>HRTEM</b>	Microscopia Electrónica de Transmisión de Alta Resolución
<b>ICP</b>	Espectrometría de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente
<b>IUPAC</b>	International Union of Pure and Applied Chemistry
<b>JCPDS</b>	Join Committe of Power Difrraction Standars
<b>LB</b>	Caldo nutritivo de Luria Bertani
<b>LRW</b>	Resina blanca
<b>MEB</b>	Microscopia Electrónica de Barrido
<b>MET</b>	Microscopia Electrónica de Transmisión
<b>MIC50</b>	Concentración Media Inhibitoria
<b>M°</b>	Metal de valencia cero
<b>nBA</b>	n-butyl alcohol
<b>NPs</b>	Nanopartículas
<b>TNT</b>	Nanotubos a base deTiO <sub>2</sub>

**UFC** Unidades formadoras de colonias  
**YPD** Caldo nutritivo de extracto de levadura dextrosa

## Resumen

Los nanotubos de titanatos de hidrógeno son nanoestructuras alternativas (TNT) para tratar la contaminación ambiental, tales como la desinfección de microorganismos patógenos y la limpieza de aguas residuales y aire contaminado. Una posible solución para estas problemáticas ambientales es el desarrollo de fotocatalizadores que pueden responder a la radiación de luz visible. En esta tesis, se sintetizaron nanotubos de titanato funcionalizados con nanopartículas de plata (NPsAg) y fosfato de plata ( $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ ) utilizando  $\text{TiO}_2$  comercial. Las nanopartículas funcionalizadas en la superficie de los nanotubos TNT se caracterizan por sus capacidades microbicidas y mejoran la separación de pares electrón-hueco fotogenerados. Las nanoestructuras preparadas se caracterizaron por difracción de rayos X (DRX), microcopias electrónicas (MEB y MET), espectroscopía UV-vis-DRS y fisisorción de nitrógeno (BET-BJH).

Los nanotubos TNT funcionalizados con diferentes porcentajes de NPsAg y  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ . Primero se evaluaron en la degradación de Eosina amarillenta para determinar las principales especies reactivas responsables (ROS) que controlan la fotoactividad. Luego se estudió su rol como agentes microbicidas con *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Candida glabrata* (*C. glabrata*) como microorganismos modelo patógenos. La vía de la desactivación fotocatalítica asistida se estudió mediante las microscopias MEB y MET mostrando que la integridad de la membrana fue dañada por las especies reactivas de oxígeno; y también revela que la morfología penetrante de los nanotubos puede inducir la muerte celular en un período de 45-60 minutos. Las nanoestructuras de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  son letales para *C. glabrata*.

Palabras clave: titanatos de hidrógeno, nanopartículas de Ag,  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ , actividad antimicrobiana, *C. glabrata*, *E. coli*.

## Abstract

Titanate nanotubes are alternative nanostructures (TNT) to treat environmental pollution such as pathogenic microorganism disinfection and cleaning of wastewater and polluted air. A possible solution for these environmental problems is the development of photocatalysts that can respond to visible-light radiation. In this research, the synthesis of titanate nanotubes functionalized with silver nanoparticles (AgNPs) and silver phosphate ( $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ ) using a commercial  $\text{TiO}_2$  is achieved.

The nanoparticles functionalized on the TNT surface are known as microbicides and enhances the separation of photogenerated electron-hole pairs. The as-prepared nanostructures were characterized by X-ray diffraction (XRD), electronic microcopies (SEM and TEM), UV-vis-DRS spectroscopy and nitrogen physisorption (BET-BJH). The TNT nanostructures functionalized with different loadings of AgNPs and  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ . First they were evaluated in the Eosin Y degradation in order to determine the main responsible reactive species (ROS) which control the photocatalytic performance. Then the role as microbicides agents was studied using *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Candida glabrata* (*C. glabrata*) as pathogenic model microorganisms. The pathway of the photo-assisted catalytic inactivation was studied by SEM and TEM techniques displaying that the membrane integrity was damaged by the reactive oxygen species; and also revealing the sharp nanotube morphology which induces the cell death within a period of 45–60 min. The  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  results to be lethal for *C. glabrata*.

Key words: hydrogen titanates, nanoparticles of Ag,  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ , antimicrobial activity, *C. glabrata*, *E. coli*.

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas causadas por microorganismos patógenos resistentes a diferentes antimicrobianos son una causa importante de muerte a nivel mundial. En los últimos años la mayoría de los microorganismos patógenos han desarrollado resistencia a uno o más antimicrobianos. Este problema surge a partir del mal uso de estos fármacos y es un problema de salud pública mundial.

De acuerdo con la organización mundial de la salud (OMS) hay pocas opciones terapéuticas para tratar infecciones resistentes a antibióticos. Algunos de los microorganismos que causan infecciones en el humano son bacterias como *Eschericia coli* (*E. coli*) y la levadura patógena *Candida glabrata* (*C. glabrata*). La OMS anuncio que en México el 85% de las cepas aisladas de *E. coli* son resistentes a aminopenicilina. México ocupa el quinto lugar entre los países con mayor riesgo por la presencia de microorganismos resistentes a aminopenicilina.

*E. coli* es la principal causante de infecciones intestinales que pueden complicarse hasta causar diarreas más graves. Este tipo de enfermedades se considera como uno de los principales problemas de salud pública en el mundo. En un estudio del Instituto Nacional de Salud Pública determinó que se recetan antibióticos al 70% de los pacientes con infecciones tanto respiratorias como diarreicas.

Por otra parte, existe una creciente preocupación en el aumento de infecciones nosocomiales causadas por hongos patógenos oportunistas como *C. glabrata*. Se ha incrementado la cantidad de pacientes diagnosticados con candidiasis durante su estancia intrahospitalaria.

La candidiasis se presenta con mayor frecuencia en pacientes inmunosuprimidos como los que se encuentran en unidades de cuidado intensivos después de cirugías, con cáncer, trasplantados, pacientes de la tercera edad y bebes prematuros. Por estos motivos se realiza la búsqueda de nuevos tratamientos, que puedan ayudar al control y eliminación de microorganismos

resistentes a diferentes antibióticos. Una de las propuestas es el uso de nanopartículas que presentan actividad antimicrobiana como alternativa a los tratamientos empleados hoy en día.

Actualmente hay un creciente interés en el desarrollo de nanomateriales con actividad antimicrobiana. Por ejemplo, los titanatos de hidrógeno (TNT), que tienen propiedades fotocatalíticas y pueden ser utilizados como antimicrobianos. Otros nanomateriales que reportan actividad antimicrobiana son las nanopartículas de plata (NPsAg).

La actividad antimicrobiana que presentan los TNT puede ser por la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) que se producen cuando son irradiados por luz UV. Esto es posible por la actividad fotocatalítica que presentan los TNT por ser un material semiconductor. La morfología tubular de los TNT es otro factor por el cual pueden tener actividad antimicrobiana además de una mayor actividad fotocatalítica, debido a su gran área superficial. Actualmente se tienen diferentes métodos de síntesis de TNT. El método hidrotermal es el más usado ya que es un procedimiento sencillo y de bajo costo para obtener TNT.

Los TNT son reactivos bajo la exposición de luz UV y esta luz UV daña el ADN y ARN de las células vivas. Por tal motivo uno de los aspectos claves para el uso de TNT como antimicrobiano es modificar su superficie con otros materiales para mejorar su actividad fotocatalítica y su actividad antimicrobiana bajo luz visible. Estos materiales pueden ser semiconductores y/o metales de transición [1].

En el presente trabajo se realizó la síntesis por el método hidrotermal de TNT funcionalizados con nanopartículas de plata (NPsAg) y fosfato de plata ( $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ ). Los materiales se analizaron por diferentes técnicas para determinar su textura. Estas técnicas fueron: fisisorción de nitrógeno para la determinación del área específica por el método BET y la determinación de la fase cristalina por medio de difracción de rayos X (DRX). Las características morfológicas, como forma y tamaño de partícula, se determinaron por microscopía electrónica de barrido

(MEB) y de transmisión (MET). Las propiedades físicas se obtuvieron por medio de espectroscopía UV-visible con reflectancia difusa (ERD). Esta técnica permite determinar la región de absorción donde se realizarán las transiciones electrónicas del material y la energía de banda prohibida. Finalmente, estos materiales fueron evaluados en reacciones de degradación del colorante eosina amarillenta, para comprobar su actividad fotocatalítica y en su actividad antimicrobiana en *E. coli* con AgXTNT y en *C. glabrata* con Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>XTNT.

## Hipótesis

Los TNT modificados con  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  y NPsAg tienen actividad fotocatalítica en la región del visible y actividad antimicrobiana que inhibe el crecimiento de la bacteria *E. coli* y de la levadura patógena *C. glabrata*.

## OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo es sintetizar nanotubos TNT funcionalizados con  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  y NPsAg y evaluar sus propiedades fotocatalíticas y como agente microbicida.

### Objetivos específicos

- Sintetizar titanatos de hidrógeno (TNT) por método hidrotermal.
- Foto-depositar NPsAg y  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  en la superficie de los TNT.
- Caracterizar los TNT funcionalizados con NPsAg y  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ , por espectroscopia UV-Vis, Microscopia electrónica de barrido (MEB) y de transmisión (MET), difracción de rayos X (DRX) y fisisorción de nitrógeno (BET).
- Determinar la dosis letal de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4/\text{TNT}$  sobre *C. glabrata* y  $\text{Ag}/\text{TNT}$  en *E. coli*.
- Evaluar la actividad fotocatalítica de  $\text{Ag}/\text{TNT}$  y  $\text{Ag}_3\text{PO}_4/\text{TNT}$  en la degradación de eosina amarillenta.

## Justificación

Las enfermedades infecciosas aunado al incremento en la resistencia de estos patógenos a antibióticos, son un problema de salud pública mundial. Por tal motivo la búsqueda y estudio de nuevos compuestos y/o sustancias capaces de inhibir el crecimiento microbiano es fundamental. Estos compuestos tienen que ser de amplio espectro ante diferentes microorganismos.

El uso de nanopartículas con propiedades antimicrobianas como: las NPsAg, Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> y TNT pueden ser una alternativa como agentes antimicrobianos para *E. coli* y *C. glabrata* .

# I. ANTECEDENTES GENERALES

## 1.1. Enfermedades infecciosas

Las enfermedades infecciosas son la principal causa de muerte en el mundo, y son consideradas como un problema grave de salud pública mundial por su frecuencia y su elevada mortalidad. En México, las enfermedades infecciosas son una de las principales causas de mortalidad. Estas infecciones también pueden ser de origen nosocomial, con una alta morbilidad y la mortalidad principalmente en pacientes inmunodeprimidos.

Actualmente las enfermedades infecciosas ocasionan 17 millones de muertes al año, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS). El 50% de los casos se pueden prevenir con un tratamiento adecuado si son diagnosticados oportunamente y de forma precisa.

En 1928 el descubrimiento de la penicilina marcó un hito en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Los antibióticos son considerados el descubrimiento terapéutico más relevante de la historia de la medicina [2].

Sin embargo, debido al uso indiscriminado de antibióticos y a la gran plasticidad genómica de los microorganismos para generar resistencia ha favorecido el desarrollo de resistencia en contra de los antibióticos. La resistencia a los antibióticos es un problema que se encuentra en constante evolución.

## 1.2. *Escherichia coli*

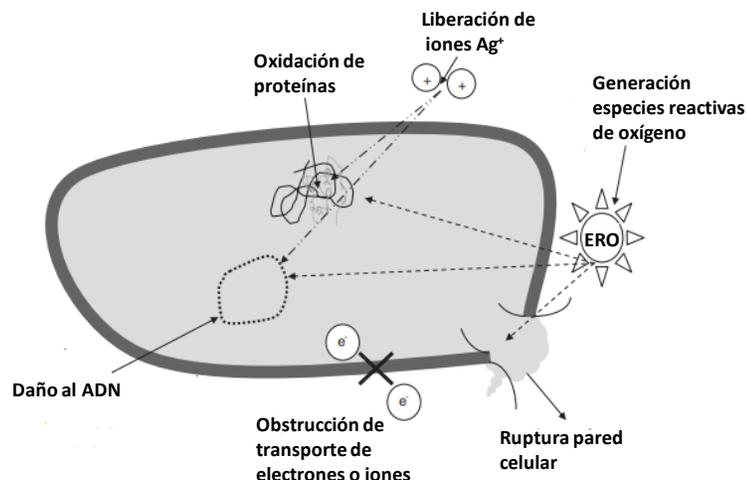
*E. coli* es una enterobacteria gram negativa que se distribuye ampliamente en el agua, los alimentos y mamíferos, donde colonizan el colon de forma natural y en algunos casos pueden ser patógenos. Diferentes cepas de *E. coli* pueden causar diversas enfermedades intestinales y extraintestinales [3]–[5]. *E. coli* es un

microorganismo que se utiliza como modelo de estudio por su amplia información existente sobre este.

Infecciones causadas por *E. coli* pueden ocurrir a través de los productos agrícolas cultivados en el suelo regados con aguas residuales. Otra vía de contagio puede originarse a partir de superficies comunes contaminadas, como el transporte público, supermercados, escuelas y por heces de animales domésticos. También puede haber contaminación de los sistemas de agua potable con agua residual debido a una red de distribución vieja y sin mantenimiento [3]–[5].

Estos microorganismos crecen en condiciones ambientales y se reproducen generalmente a 30°C, en superficies húmedas, aeróbicas y con fuentes de nutrientes como carbohidratos, proteínas y grasas [6]. Debido a la importancia de estas infecciones por microorganismos patógenos se han desarrollado nuevos nanomateriales para su inactivación [7], [8].

Los TNT pueden presentar actividad antimicrobiana por sus propiedades fotocatalíticas [6]–[17]. Cuando los nanomateriales fotocatalíticos se exponen a radiación generan ERO como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), radical superóxido ( $\bullet O_2^-$ ) y el radical hidroxilo ( $\bullet OH$ ) que pueden dañar todas las biomoléculas de la célula. La inactivación de *E. coli* se da primero por la ruptura de la membrana celular y por la desnaturalización irreversible de proteínas y ácidos nucleicos [7], [11] [13], Figura 1.1.



**Figura 1.1.** Diferentes mecanismos de acción contra células bacterianas por ERO [18].

Los nanomateriales a base de  $TiO_2$  y otros nanomateriales que tienen propiedades fotocatalíticas se han desarrollado para que presenten actividad antimicrobiana mediante generación de ERO [7], [9], [11]–[17], [19]–[25]. Se han descrito que la adición de NPsAg aumenta sus propiedades antimicrobianas además de una mayor eficiencia fotocatalítica [9], [16], [17], [21], [24]. Las diferentes estructuras a base de  $TiO_2$  presentan similitud en sus propiedades físicas y químicas. Sin embargo los materiales sintetizados como nanotubos de hidrógeno tienen características similares al  $TiO_2$  [19], [20]. Los TNT presentan gran relación superficie-volumen, defectos estructurales y vacantes de oxígeno, estas características favorecen las propiedades antimicrobianas del material. Existen informes sobre nanotubos de titanatos funcionalizados con NPsAg que presentan actividad antimicrobiana a largo plazo [7], [8], [16], [21], [26]

Por otro lado, se encuentran las infecciones causadas por hongos patógenos. En la actualidad *C. glabrata* se considera la segunda causa de candidiasis invasiva especialmente en personas inmunosuprimidas. Para el tratamiento de infecciones se utilizan medicamentos antifúngicos como el fluconazol. Sin embargo, aislados clínicos de *C. glabrata* están adquiriendo

resistencia a los antifúngicos. Esto hace necesario la búsqueda de nuevos compuestos antifúngicos.

### 1.3. *Candida glabrata*

*C. glabrata* un microorganismo patógeno oportunista que se encuentra en la flora normal de individuos sanos, que con frecuencia causan infecciones en individuos sanos [27]. *C. glabrata* es la segunda causa más común de candidiasis después de *Candida albicans*. Crece a temperaturas entre 30-40°C. Las colonias son lisas, no adherentes de color blanco o cremoso.

*C. glabrata* se aísla en diferentes pacientes adultos con estomatitis debido a prótesis dentales (22-55%), en estómago (5-25%) y en mujeres con vaginitis (5-30%). Esta especie se aísla con baja frecuencia de la piel (1-2%) y se ha cultivado 36% de muestras de orina de pacientes hospitalizados [28].

Las enfermedades infecciosas causadas por *C. glabrata* presentan una alta tasa de morbi-mortalidad en pacientes hospitalizados, inmunocomprometidos, diabéticos, neonatos, intervenidos quirúrgicamente, y adultos mayores [77], [78]. La incidencia de infecciones por *C. glabrata* ha aumentado en las últimas tres décadas. La colonización por estas levaduras coincide con la estancia prolongada en el hospital del enfermo [28] y en las unidades de cuidados intensivos.

Por ejemplo, pacientes con terapias inmunosupresoras presentan infecciones sistemáticas por *C. glabrata* difíciles de tratar. *C. glabrata* presenta resistencia innata a compuestos azólicos. Los azoles son una clase de antifúngicos, que se usan en tratamientos de micosis tanto superficiales como profundas incluidas las candidiasis [31].

En los últimos 20 años se han identificado factores de virulencia de *C. glabrata* como su capacidad de adherirse a células epiteliales y endoteliales, de

formar biopelículas en tejido de hospedero así como a materiales inertes, una alta resistencia innata a xenobióticos y una resistencia alta a estrés oxidante.

Por tal motivo es necesaria la búsqueda de nuevos compuestos para controlar las infecciones causadas por *C. glabrata* y otras especies de *Candidas*. Las nanopartículas que presentan propiedades antimicrobianas son una alternativa para la búsqueda de nuevos tratamientos para el control de enfermedades infecciosas.

Las nanopartículas presentan un amplio espectro de actividad antimicrobiana contra bacterias y hongos. Entre las nanopartículas (NPs) que presentan mayor actividad antimicrobiana son las de metales como: plata, cobre y zinc. Estos materiales presentan actividad antimicrobiana en tamaño de bulk como en tamaños nanométricos. Hay otros materiales que solo en nanopartículas presentan dicha actividad.

Hasta el momento no se ha reportado un mecanismo específico por el cual las nanopartículas presenten actividad antimicrobiana de las nanopartículas se debe a su estructura física, así como su tamaño y morfología que daña abrasivamente a la membrana celular. Otros autores mencionan que las nanopartículas metálicas liberan iones en la superficie de la nanoestructura y el área superficial específica es mayor a medida que disminuye el tamaño de la partícula. Esto provoca que haya mayor área de contacto del material con el entorno. Por tal motivo algunas nanopartículas pueden presentar múltiples mecanismos de actividad antimicrobiana.

#### **1.4. Titanatos a base de dióxido de titanio**

El dióxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) es un material semiconductor tipo n químicamente estable, con alta actividad fotocatalítica y puede ser soportado en diferentes sustratos. [32] El  $\text{TiO}_2$  es anfótero, biocompatible y no tóxico en humanos ni medio

ambiente. Además es un semiconductor sensible radiación electromagnética específicamente en la región del Ultravioleta Visible (UV) [33].

El  $\text{TiO}_2$  se considera uno de los mejores fotocatalizadores y se utiliza para purificar el aire, desinfección del agua, para tratamiento de aguas residuales y como antimicrobiano [32]–[34]. Se ha propuesto que su actividad antimicrobiana por fotocatálisis se da por la interacción entre los microorganismos y las ERO ya que generan estrés oxidante a las células. Las ERO son capaces de dañar a todas las biomoléculas de la célula [35], [36].

Se ha reportado que las nanopartículas con morfología como, varillas, alambres, cinturones y tubos han atraído mucha atención por sus propiedades únicas, por que presentan un área graden de superficie, que resulta de una mayor área para que ocurra las reacciones degradación de contaminantes e inactivación de microorganismos [37], [38]. Además esta morfología favorece la actividad antimicrobiana, debido a su área superficial, que se puede cargar de agentes bioactivos antimicrobianos y pueden utilizarse como vehículos de administración de fármacos [33], [39]. Estas nanoestructuras combinan las propiedades y aplicaciones del  $\text{TiO}_2$  [35], [40].

Las reacciones fotocatalíticas se dan en la superficie de los (TNT). Estas reacciones se activan por medio de la absorción de fotones con energía superior a la banda prohibida ( $E_g$ ). La energía de banda prohibida es la brecha de energía que separa a la banda de valencia (BV) de la banda de conducción (BC). Cuando el semiconductor se irradia los electrones que se encuentran en la BV se excitan y pasan a la BC y generan reacciones de oxidación-reducción [41]. En la activación fotónica ( $h\nu$ ), de los TNT con energía igual o mayor a la del  $E_g$ , el semiconductor se encuentra en una solución en forma de polvo o partículas pequeñas y generan la separación de cargas en direcciones opuestas electrón-hueco ( $e^-$ ,  $h^+$ ).

La Figura 1.2, muestra el proceso de fotocatálisis de los TNT. Cuando el semiconductor se irradiado, se genera el par electrón-hueco ( $E_c$  1), cuyo promedio de vida se encuentra en los picos segundos. Después en este lapso el par  $e^-$ ,  $h^+$ ,

debe migrar hacia la superficie y generar radicales libres que reaccionan con moléculas que se encuentran en el medio a través de reacciones de oxidación-reducción. Estos se forman por la reacción de oxidación del agua (iones OH<sup>-</sup>) con los huecos (h<sup>+</sup>) cargados positivamente (Ec 2). Por otro lado están los electrones (Ec 3), que reaccionan con las moléculas de O<sub>2</sub> disueltas en el medio y se convierten en radicales superóxidos aniónicos (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) [42]–[44]. La energía de banda prohibida de los TNT para que puedan llevar a cabo las reacciones fotocatalíticas es aproximadamente de 3.2 eV [45].

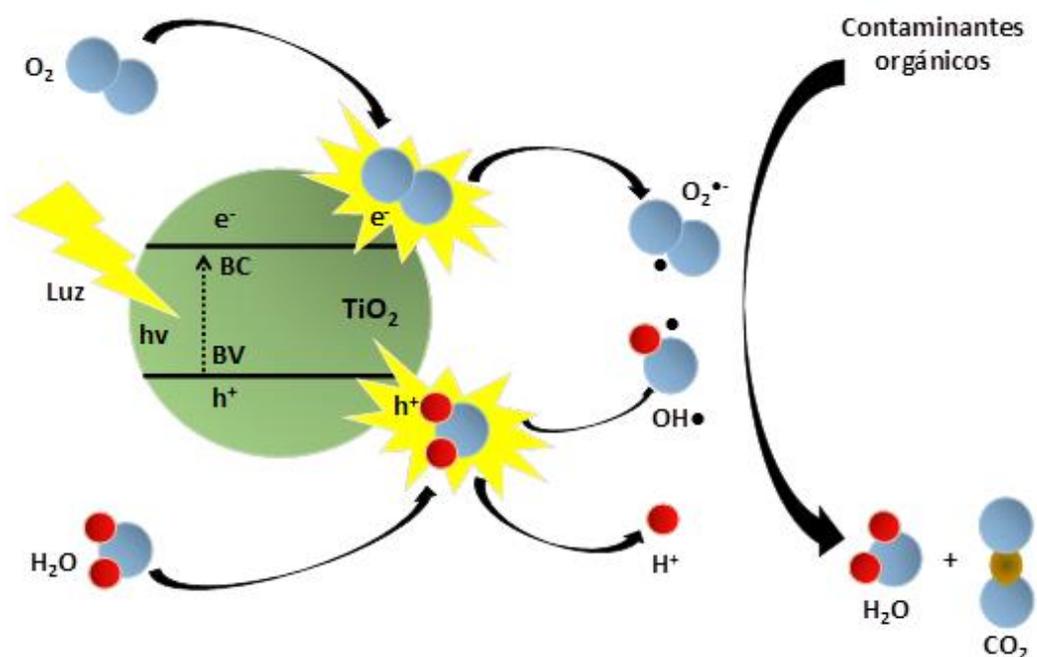
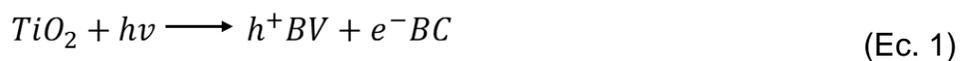
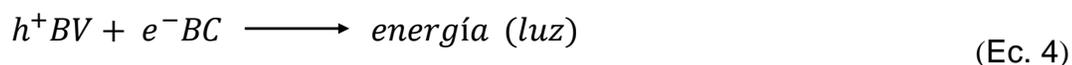


Figura 1.2. Esquema representativo de la activación fotocatalítica del TiO<sub>2</sub> [34] [46].

Los pares  $e^- h^+$  que no logran reaccionar en la superficie se recombinan y esto disminuye su rendimiento fotocatalítico [47]. Este es uno de los mayores problemas al utilizar nanopartículas de  $TiO_2$ . En el proceso de recombinación, el electrón excitado de la BC se regresa a la BV sin haber reaccionado, y esto disipa la energía en forma de luz (Ec 4) [32]. Por tal motivo es necesario buscar la forma factor que haga más lento el proceso de recombinación para mejorar su actividad fotocatalítica [44].



Los parámetros básicos que determinan la habilidad de un semiconductor para su aplicación como fotocatalizador son su capacidad de absorción de la luz visible o ultravioleta y de generar el par electrón-hueco, su estabilidad química contra corrosión en soluciones acuosas y que sea de fácil obtención y de bajo costo [32].

Para obtener un material que cumpla con estas características anteriores es necesario tener en cuenta las propiedades estructurales y morfológicas, así como el tamaño, textura como área específica, volumen y diámetro del poro.[44], [48].

## 1.5. Síntesis de titanatos de hidrógeno

Las nanoestructuras a base de  $TiO_2$  tienen un gran potencial como fotocatalizadores. La síntesis de TNT se logra mediante diferentes métodos entre los que se pueden citar: métodos químicos, síntesis hidrotérmal, método sol-gel y métodos asistidos por plantillas [35], [38], [49].

El método hidrotérmal destaca de los demás por ser sencillo, de bajo costo y tiempos cortos de síntesis. El término hidrotérmal se refiere a las reacciones

heterogéneas en presencia de solventes acuosos o mineralizadores en condiciones de presión y temperaturas elevadas, y esto permite la disolución y recristalización de materiales que son insolubles en condiciones normales. Hay tres pasos de reacción importantes para el método hidrotermal, 1) generación de los nanotubos de titanato alcalinos, 2) sustitución de iones alcalinos por protones y 3) reacciones de deshidratación por calor [50].

En una síntesis típica hidrotermal, el precursor  $\text{TiO}_2$  se disuelve en una solución acuosa concentrada de  $\text{NaOH}$ , se coloca después en un horno de microondas a una temperatura entre  $110\text{-}150\text{ }^\circ\text{C}$ . En este paso se forman nanotubos tubulares cristalizados. Finalmente se realiza un lavado con soluciones acuosas diluidas con agua [20], [40], los nanotubos de titanatos de hidrógeno se forman en fase anatasa con diámetros uniformes de  $8\text{-}10\text{ nm}$ , área superficial de  $200\text{-}400\text{ m}^2/\text{g}$  y longitud de  $50\text{ a }1000\text{ nm}$  [51].

En resumen, este proceso de síntesis es muy simple, sin embargo, cada paso incluye la elección del precursor, la condición hidrotérmica (temperatura, concentración de reactivos y tiempo de exposición) además del lavado posterior a la síntesis (tiempo de lavado, concentración de ácido) que controla la estructura (morfología y cristalografía) y las propiedades físico-química de los TNT. Los titanatos que se forman son:  $\text{H}_2\text{Ti}_5\text{O}_{11}\bullet\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{TiO}_5\bullet\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{Ti}_4\text{O}_9\bullet\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$  y  $\text{Na}_x\text{H}_{2-x}\text{Ti}_3\text{O}_7$ . [52]. Kasunga et al [53] introdujeron síntesis de nanotubos de titania por el método hidrotermal. Sin embargo, la caracterización exacta de los titanatos de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{Ti}_3\text{O}_7\cdot\text{H}_2\text{O}$ , fue hecha por Du et al [54].

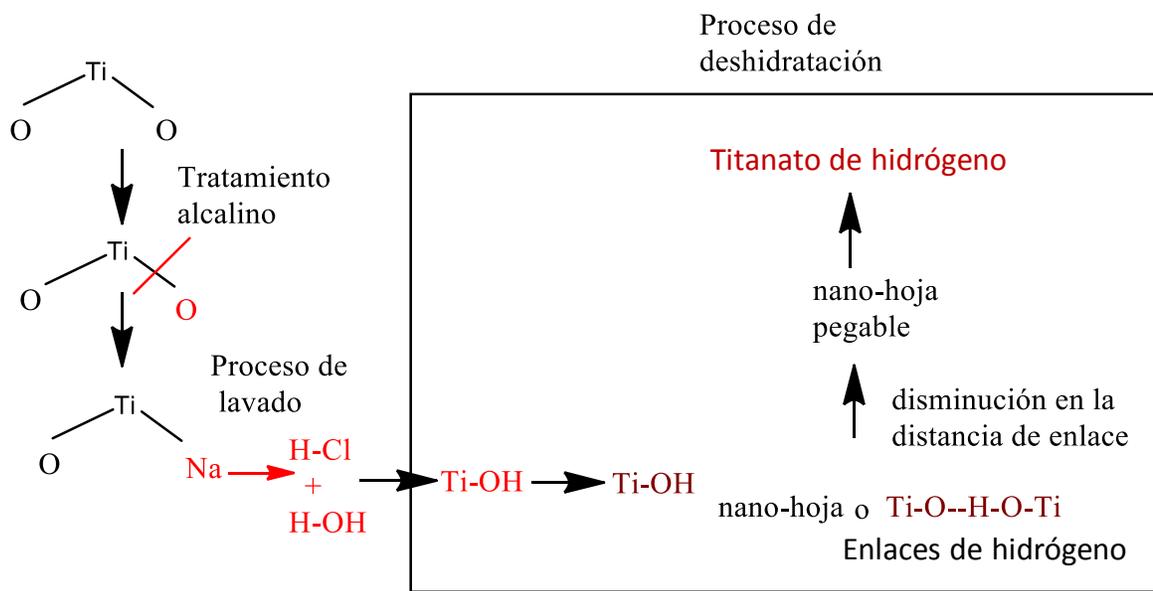
Los titanatos sintetizados por el proceso hidrotermal tienen estructuras con las siguientes propiedades en común: (1) cuatro picos típicos característicos en XDR, situados a  $2^\circ\theta = 10, 24, 28$  y  $48$ , (2) un pico muy débil a  $2^\circ\theta = 10$  correspondiente a una distancia entre capas  $d_{100}$  de  $0.7\text{-}0.8\text{ nm}$ , (3) las capas del plano (100) que consisten en octaedros de  $\text{TiO}_6$  que comparten bordes y esquinas que forman estructuras de capas planas en forma de zigzag y (4) átomos de hidrógeno intercambiables situados en estas cavidades de capa intermedia con iones de metal alcalino [20].

La ventaja de los TNT es que presenta un rango menor de recombinación de pares electrón-hueco, a diferencia de las nanopartículas a base de  $\text{TiO}_2$  [52].

### 1.5.1. Mecanismo de síntesis de TNT

La formación de los TNT se realiza mediante el uso de precursores de  $\text{TiO}_2$ , que reaccionan en soluciones de  $\text{NaOH}$ . Cuando algunos de los enlaces  $\text{Ti-O-Ti}$ , se interrumpen por la adición de  $\text{NaOH}$ , algunos iones de  $\text{Ti}^+$  se intercambian con iones de  $\text{Na}^+$  para formar enlaces de  $\text{Ti-O-Na}$  [55].

De acuerdo con (Kasuga 1998) [56], implementaron el tratamiento de lavado ácido después del proceso hidrotérmal como un paso importante para la formación de los titanatos de tri-titanato. El uso de ácido permite eliminar los iones  $\text{Na}^+$  de las muestras y formar nuevos enlaces  $\text{Ti-O-Ti}$ . En los enlaces los iones  $\text{Na}^+$  son desplazados por iones  $\text{H}^+$  y forman enlaces  $\text{Ti-OH}$  en el proceso de lavado [55], [56], además, se genera repulsión electrostática en los enlaces  $\text{Ti-O-Na}$  lo que permite que se pueda formar la estructura del tubo [55], [56]. El lavado con agua desionizada y ácido son pasos importantes para la formación de los TNT con alta actividad. Sin embargo en algunos reportes sostienen que el tratamiento hidrotérmico es el paso de mayor relevancia en comparación con el proceso de lavado en el mecanismo de formación de los nanotubos [57], [58]. El mecanismo de formación de los nanotubos de titanato de hidrógeno se muestra en la Figura 1.3.



**Figura 1.3.** Esquema representativo del mecanismo de formación de titanato de hidrógeno por el método hidrotermal [50].

Para tener un mejor rendimiento fotocatalítico es necesario controlar la morfología de los nanotubos por medio de los parámetros de la síntesis. A través de la morfología tubular es donde ocurre la transferencia de las especies reactivas. Este comportamiento se origina por que los nanotubos presentan una amplia área de superficie específica en comparación con las partículas de titanio cuasi esféricas [59].

### 1.5.2. Nanotubos modificados

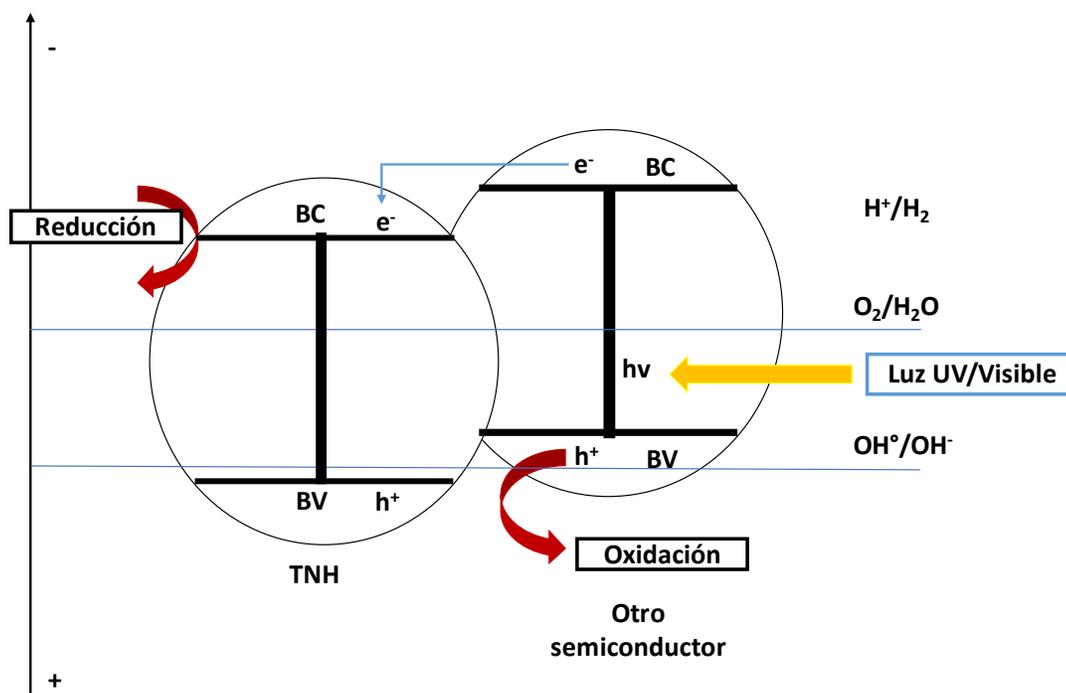
Los nanotubos son fotocatalizadores eficaces cuando están expuestos a la luz UV, sin embargo para utilizarse como agentes antimicrobianos tendrían que ser reactivos bajo luz visible [20], [60], [61]. La luz UV daña los ácidos nucleicos (ADN y ARN) de las células. Para que los TNT sean reactivos bajo luz visible, se realiza mediante la modificación superficial con metales nobles u otros semiconductores [20], [32], [60].

La modificación de los TNT también evita la recombinación del par electrón-hueco, con lo que se logra una mayor eficiencia en las reacciones fotocatalíticas. Se cree que lo que retarda a la recombinación del par electrón-hueco es la carga de metales en la superficie de los TNT. El metal disperso en los TNT acelera la transferencia interfacial de los electrones foto-inducidos al sistema externo [44], [62]–[64].

Las nanopartículas metálicas de Ag, Au y Pt depositadas en la superficie, pueden trabajar como trampas de electrones para mejorar las reacciones fotocatalíticas, siempre y cuando las partículas sean de tamaño nanométrico [20]. Además esto aumenta la actividad antimicrobiana incluso sin radiación [65].

Es importante considerar el tipo de metal a utilizar, la naturaleza del contaminante (actividad antimicrobiana) y el medio en el que se efectuara la reacción [66].

Otra alternativa para la modificación como se mencionó anteriormente es con materiales semiconductores. Estos son eficaces para evitar la recombinación y extender el rango de adsorción en la región del visible, que reduce su energía de banda prohibida [63]. El electrón que es fotogenerado en el semiconductor de banda más pequeña cuando pasa a la BC, puede pasarse a la BC de TNT [26]. Materiales como CdS, BiOI y  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ , son semiconductores que tienen una energía de banda prohibida menor que la que tienen los TNT [67]. La plata y compuestos a base de Ag se han utilizado aplicaciones fotocatalíticas y como agentes antimicrobianos.



**Figura 1.4.** Esquema representativo del acoplamiento de dos semiconductores cuando son irradiados [63].

En la Figura 1.4, está el esquema de la transferencia de electrones y los huecos fotogenerados entre TNT y otro semiconductor. La transferencia depende de la diferencia entre la BC y los potenciales de la banda de valencia de los semiconductores [68].

## 1.6. Nanopartículas de plata

Uno de los materiales más prometedores para modificar los TNT para mejorar su actividad fotocatalítica y antimicrobiana son las nanopartículas de plata (NPsAg). Las diversas formas químicas de la plata se han utilizado como agentes antimicrobianos sin que presenten toxicidad a humanos ni animales. Además presentan una probabilidad mucho menor de causar resistencia en comparación a los antibióticos [69], y muestran alta toxicidad contra una amplia gama de microorganismos patógenos [70]. Las NPsAg no solo interactúan con la superficie

de la membrana sino que también pueden penetrar al interior de la célula y generar de especies reactivas de oxígeno (ERO) [71].

La Ag en soluciones acuosas puede liberar iones  $\text{Ag}^+$  y estos pueden interrumpir con las biomoléculas de los microorganismos y dañarlas [69]. Además, los iones Ag interactúan con los grupos tiol inactivando las proteínas de las células [72] [71].

Desde la Antigua Grecia se ha usado la plata como agente antimicrobiano donde de utilizaban monedas de plata en los fondos de los vasos para evitar infecciones. El primer reporte donde mencionan las propiedades antimicrobianas de la plata fue para tratamientos oculares y publicado en 1880. El nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) se aplicaba diluido para tratar ceguera en recién nacidos. También se utilizó la sulfadiazina de plata para tratar quemaduras y heridas [73], [74]. En la actualidad se han desarrollado dispositivos médicos recubiertos con NPsAg (catéteres de plástico) que evitan la formación de biopelículas de microorganismos patógenos.

La actividad antimicrobiana de las NPsAg se da por la forma, tamaño y a una concentración menor de  $75 \mu\text{g/mL}$  inhiben generalmente el crecimiento bacteriano. Sin embargo, es sorprendente que hasta el momento el mecanismo de acción de las NPsAg sobre los microorganismos no se conoce aun cuando existe una gran cantidad de trabajos publicados acerca de la inactivación de microorganismos con plata metálica y iones de plata [75], [76]. Sin embargo, se ha propuesto que las NPsAg pueden unirse a la superficie de la membrana celular alterando la permeabilidad y el transporte de protones que afecta directamente la respiración. También pueden penetrar al interior de las células y generar ERO. Las NPsAg de tamaños nanométricos presentan mayor efecto bactericida que las de gran tamaño, debido al área superficial disponible para interactuar [76]. Sharma y colaboradores mencionan que las NPsAg son de mayor eficiencia que los iones  $\text{Ag}^+$  como agentes antimicrobianos, porque las NPsAg son más reactivas por sus propiedades catalíticas y fotocatalíticas [69].

Sin embargo, el uso directo de NPsAg no es viable debido a que las NPs con tamaño menores de 200 nm tienden a agregarse naturalmente. Presentan además baja estabilidad en soluciones acuosas y esto hace poco práctica su aplicación.

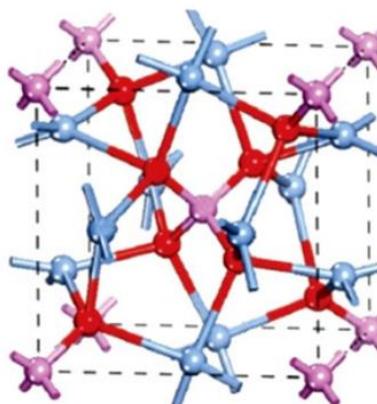
Para resolver este problema, se pueden soportar en otros materiales como en  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , zeolitas entre otros. De todos los materiales mencionados el  $\text{TiO}_2$  ha mostrado ser el más eficiente para las aplicaciones antes mencionadas [71]. El acoplamiento de NPsAg en los TNT, hace que la recombinación sea más lenta, ya que las NPsAg por su tamaño pueden promover la separación del par electrón-hueco generados en la reacción de fotocatalisis y mejora la capacidad fotocatalítica de los compuestos. Otra de las ventajas de estos compuestos es que su espectro de absorción de la luz se extiende hacia la región del visible, esto se debe a la plata que actúa como trampa de electrones en el espacio de la banda prohibida, además de la Ag nanométrica presenta resonancia de plasmón de superficie. Además la incorporación de las NPsAg proporciona una mayor actividad antimicrobiana [77].

## 1.7. Fosfato de plata

El fosfato de plata ( $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ ) es un material semiconductor, que ofrece una alternativa viable a la fotocatalisis [78]. Es de color amarillo, debido a la absorción de la luz en la región del visible con una longitud de onda menor a 530 nm [79], [80].

La excelente actividad fotocatalítica bajo luz visible que presenta el  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  se debe a su estructura con  $\text{PO}_4^{3-}$ . El  $\text{PO}_4^{3-}$  es responsable de la distorsión en los tetraedros de  $\text{AgO}_4$  mediante una fuerte polarización del  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  (Figura 1.5). Los grupos fosfatos negativos atraen y rechazan a los electrones y mejoran la separación de cargas. El  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  presenta una energía de banda prohibida de 2.43 eV [78].

El  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  tiene propiedades antimicrobianas bajo la luz visible y libera iones plata. La actividad antimicrobiana del  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  se ha probado con bacterias gram-negativas (*E. coli*) y con levaduras patógenas (*Candida spp*). El  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  a concentraciones entre 0.1 – 0.2 mg/mL tienen actividad antimicrobiana del 84-99% [45], [79], [81].



**Figura 1.5.** Celda unitaria del  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  que presenta una estructura cúbica centrada en el cuerpo (CCC), donde los átomos azules representan la plata, los morados el fosfato y los rojos el oxígeno y la CCC está formada por  $\text{PO}_4$  [76], [78].

Sin embargo, el  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  es inestable, debido a la fotoreducción bajo luz visible. Por tal motivo es necesario incorporarlo en otros materiales para poder utilizarlo en fotocatalisis [10].

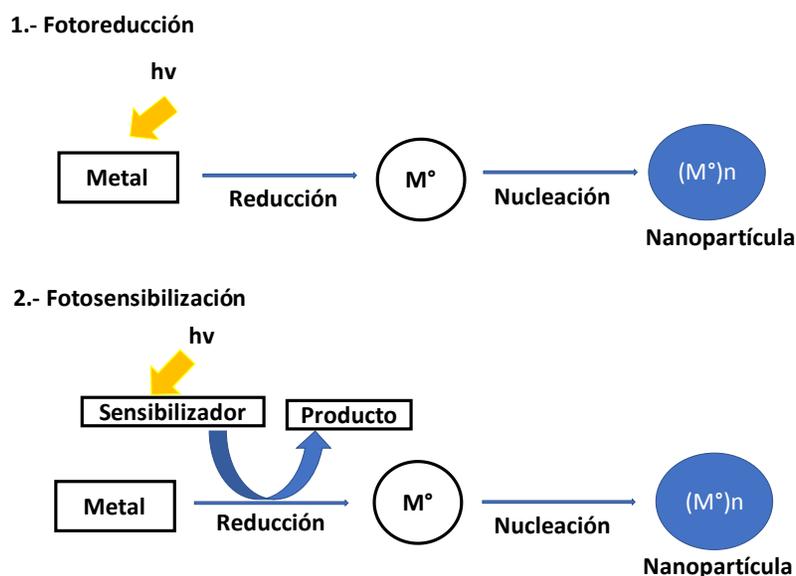
Trabajos anteriores presentan fotocatalizadores de  $\text{TiO}_2$  funcionalizado con  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ , con actividad fotocatalítica para degradar colorantes orgánicos. Además de presentar actividad antimicrobiana.

## 1.8. Métodos de preparación de nanopartículas soportadas

Existen varios métodos para depositar metales en la superficie de los TNT. Uno de los métodos es por fotoquímica [82] de NPsAg, AgO, Cu o Pt. Otro es la incorporación de precursores de óxidos metálicos como Bi, Rh y  $\text{WO}_3$  en la

superficie de los nanotubos mediante la adición directa durante la reacción hidrotermal in situ de Fe, Cr, Ce y Sn. [20].

El método fotoquímico consiste en el depósito/reducción de nanopartículas metálicas por medio de luz UV. Este método se puede clasificar en dos tipos, 1) foto-físicos (de arriba hacia abajo) que se realiza mediante la división de metales a granel hasta formar pequeñas partículas, 2) fotoquímicos (de abajo hacia arriba) este método genera NPs a partir del metal de valencia cero ( $M^0$ ) que se obtienen por medio de precursores moleculares o iónicos que se da por la formación de  $M^0$  en condiciones que evitan su precipitación. Estos se forman por la fotoreducción directa de una fuente metálica (sal metálica o completo) o por fotosensibilización por medio de una fuente de luz como las lámparas de mercurio de alta presión de 125 W. Aquí los iones metálicos se reducen cuando se usan productos intermedios que se generan por fotoquímica, como moléculas excitadas y radicales [26], [76], [82], [83].



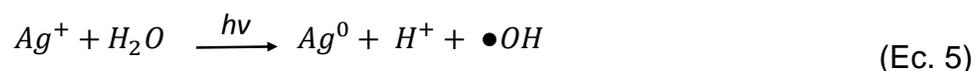
**Figura 1.6.** Esquema representativo del método de síntesis fotoquímica, 1) síntesis directa, 2) síntesis por medio de sensibilizadores [82].

En el proceso de fotorreducción directa el  $M^0$  se obtiene mediante la excitación directa de luz UV de una fuente metálica. La ventaja de este método es

que no necesita agentes reductores y por tal motivo se puede usar en diversos medios incluyendo películas y cristales entre otros [82].

La fotosensibilización con semiconductores consiste en el precursor metálico, el semiconductor (soporte) y eliminadores de huecos. La foto-irradiación se realiza en solución con estos compuestos: iones metálicos y el semiconductor de soporte. La foto-absorción de los semiconductores produce huecos y electrones. Los iones metálicos que se absorben en la superficie capturan los electrones fotogenerados y así se reducen en la interfaz Figura 1.6 [82].

El mecanismo de foto-reducción directa que forma NPsAg por medio del solvente (agua) y por el precursor metálico (iones plata) tomados del  $\text{AgClO}_3$  es el siguiente [84] (Ec.5).



La combinación de NPsAg y  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  en la superficie de los nanotubos dará como resultado nuevas funciones como: 1) la disminución de  $E_g$  para que los TNT puedan ser activos en la región del visible, 2) reducción de la recombinación del par electrón-hueco, 3) una mayor actividad antimicrobiana.

## II. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Todos los químicos utilizados en este trabajo fueron de grado reactivo. Como precursor para los TNT se utilizó dióxido de titanio comercial (P25) Degussa que contiene (75% anatasa y 25% rutilo), hidróxido de sodio (NaOH) CTR. Para la síntesis de nanopartículas de fosfato de plata y plata, se utilizó nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) Sigma-Aldrich y fosfato de sodio dihidratado ( $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}_2\text{O}$ ) Aldrich.

### 2.1. Síntesis hidrotermal de titanatos de hidrógeno

La síntesis hidrotermal de TNT se llevó a cabo con dióxido de titanio (P25) como precursor, agua destilada como disolvente y (NaOH) como mineralizador según lo reportado por [22]. La mezcla se preparó con 2 g de P25 y 60 mL de una solución de NaOH 10 M y se llevó a un volumen final de 80 mL con agua destilada. Posteriormente la mezcla se dispersó en un baño ultrasónico por 10 min para eliminar los agregados y después se agitó durante 10 min a temperatura ambiente. La mezcla se colocó en un recipiente de teflón y se calentó mediante irradiación con microondas en un reactor de microondas (Eyela MWO 1000 Wave Magic) a  $150^\circ\text{C}$  durante 6 horas a 700 rpm, con una potencia de 180 W. El material se enfrió a temperatura ambiente y se lavó varias veces con agua desionizada posteriormente se llevó a pH 3 con HCl 5 N. Se lavó con agua desionizada hasta obtener pH 7. El polvo resultante se filtró al vacío y se secó a  $100^\circ\text{C}$ , durante 12 horas. Los nanotubos obtenidos se nombraron como TNT. Se realizaron dos lotes diferentes de TNT.

### 2.2. Síntesis de partículas de $\text{Ag}_3\text{PO}_4$

Las partículas de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  se prepararon por el método de precipitación por intercambio de iones simple. Se prepararon dos soluciones una de  $\text{AgNO}_3$  0.15 M

y otra de  $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}\cdot\text{H}_2\text{O}$  0.15 M en agua desionizada. Las dos soluciones se colocaron en baño ultrasónico durante 10 min para dispersar el material. La solución de  $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}\cdot\text{H}_2\text{O}$  se mantuvo en el baño ultrasónico mientras que la solución de  $\text{AgNO}_3$  se añadió gota a gota hasta obtener una coloración amarilla. Los polvos resultantes se lavaron varias veces con agua desionizada para eliminar cualquier rastro de material sin reaccionar y finalmente se secó a  $70^\circ\text{C}$ .

### **2.3. Foto-depósito de nanopartículas de plata**

El foto-depósito de NPsAg se realizó por medio de una solución de  $\text{AgNO}_3$  en 50 mL de etanol a tres diferentes concentraciones (0.5, 1, y 3% en peso) a esta solución se le agrego 1 g de TNT. La suspensión se agitó durante 5 minutos y después se colocó en baño ultrasónico por otros 5 minutos para asegurar la desagregación completa de las partículas precursoras. Posteriormente la suspensión se agitó durante 1 hora y a la par se irradió con una lámpara UVC de 17 W (TecnoLite G15T8, 254 nm,  $1168 \text{ W/cm}^2$ ). Después la suspensión se filtró con un filtro de polipropileno hidrófilo (Pall,  $0.2 \mu\text{m}$ ). Los sólidos se secaron completamente durante una noche en un horno a  $80^\circ\text{C}$ . Los materiales obtenidos se les asigno el nombre de AgXTNT, donde X denota diferentes contenidos de plata en % en peso.

### **2.4. Foto-depósito de partículas de fosfato de plata**

El foto-depósito de partículas de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  en los TNT se realizó siguiendo la misma metodología que para la del foto-depósito de NPsAg. Las concentraciones de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  fueron de 3, 5 y 10% en peso. Los materiales obtenidos se les asignó el nombre de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4\text{XTNT}$ , donde X indica las diferentes cantidades de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  contenidas sobre los nanotubos en % en peso.

## 2.5. Técnicas de caracterización

Los nanotubos funcionalizados y sin funcionalizar se caracterizaron por medio de microscopía electrónica de barrido y transmisión. Las imágenes en modo HRTEM y HAADF se obtuvieron con un microscopio FEI Tecnai F30 equipado con una pistola de emisión de campo de tungsteno operado a 300 keV. Los espectrogramas UV-Vis-DRS se obtuvieron con una esfera de integración. Los patrones de difracción de rayos X se obtuvieron usando un difractómetro de rayos X Bruker Discover con radiación de Cu K $\alpha$  de 1.5406 Å, operado a 35 kV y 25 mA. La adsorción-desorción de N<sub>2</sub> se realizó en el equipo NOVA 3 con muestras previamente desgasificadas a 150°C. El método Brunauer-Emmett-Teller (método BET) se utilizó para calcular el área superficial específica.

### 2.5.1. Difracción de rayos X (XRD)

Para determinar las fases cristalinas de los materiales sintetizados se utilizó un difractómetro de Rayos-X SmarLab Rigaku con una longitud de onda de radiación incidente  $\lambda=1.54$  Å (CuK $\alpha$ ) a 35 kV y 25 mA. El barrido se realizó de 5 a 70°, desde el ángulo de difracción ( $2\theta$ ). La indexación de los planos cristalográficos fue mediante la base de datos Joint Committee of Powder Diffraction Standards (JCPDS). Las direcciones de difracción se determinaron por la ley de Bragg [85].

La Ec. 6 muestra las condiciones para que tenga lugar una interferencia constructiva del haz que forma un ángulo  $\theta$  con la superficie del cristal:

$$n\lambda = 2 d \text{ sen } \theta \quad (\text{Ec. 6})$$

Donde:

$n$  = número entero que representa el orden de la difracción

$d$  = distancia interplanar del cristal

### **2.5.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

Para observar la morfología de los materiales, así como la dispersión de los materiales depositados en los TNT, se empleó un microscopio electrónico de barrido FEI-FIB Dual Beam Helios Nanolab 600. Se obtuvieron imágenes con electrones secundarios y retrodispersados. Las imágenes por electrones secundarios se producen a partir de la emisión de los electrones de valencia de los átomos de la muestra. Estos son de muy baja energía (<50 eV) y solo logran salir de la muestra los que se encuentran mayoritariamente en la superficie con lo que se obtiene una imagen de apariencia tridimensional.

Las imágenes producidas por electrones retrodispersados, poseen mayor energía que los secundarios, por tanto, proporcionan más información de regiones más profundas de la muestra. La intensidad de emisión de los electrones retrodispersados depende del número atómico medio de los átomos de la muestra. De esta manera los átomos más pesados producen mayor cantidad de electrones retrodispersados. Por tanto, las áreas con elementos pesados aparecen brillantes en la imagen, de acuerdo con la composición química de la muestra.

Además de imágenes sobre la morfología de la muestra se puede obtener un microanálisis químico semicuantitativo con, un detector de rayos X (EDS). Este detector es el que recibe los rayos X procedentes de cada uno de los puntos de la superficie sobre los que pasa el haz de electrones. Como la energía de cada rayo X es característica de cada elemento, podemos obtener información analítica cualitativa de áreas de tamaño determinadas de la superficie. Es por esto que esta técnica se conoce como microanálisis por EDS.

### **2.5.3. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)**

Se determinó la morfología de las estructuras obtenidas y la determinación de la composición química por espectroscopia de dispersión de energía (EDS). Se usaron imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía

electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) que se obtuvieron con un microscopio electrónico de transmisión HR-TEM FEI Tecnai F30 (300 keV). Para el análisis de las muestras biológicas con *E. coli* las muestras se recubrieron con un baño de oro (Cressington Sputter coater 108 Auto) durante 90 segundos con una intensidad de 40 mA. Esto para permitir la conducción de electrones sobre la muestra.

#### **2.5.4. Espectroscopia de UV-Visible de reflectancia difusa (ERD)**

Para caracterizar el comportamiento electrónico que presentan los materiales se analizaron espectros de UV-Vis de reflectancia difusa. Se determinó la energía de banda prohibida ( $E_g$ ) por medio del estudio de la pendiente en la curva de absorción, donde se presenta una caída exponencial. Para realizar este análisis se usó un espectrofotómetro UV-Visible (Cary 5000 UV-Vis-NIR, Agilent Technologies) de reflectancia difusa. Las mediciones para la absorción óptica se escanearon en el rango de 200 nm a 800 nm (ultravioleta y región del visible) y se utilizó una esfera de integración. Los espectros se analizaron en términos de las intensidades de  $F(R)$  como función de energía de longitud de onda (eV).

#### **2.5.5. Fisisorción de $N_2$**

Para determinar el área superficial, tamaño y volumen del poro de las muestras se realizó con un equipo Quanta Chrome NOVAe. Las muestras tuvieron un pretratamiento de desgasificación a 120 °C durante 5 horas. Las isothermas se obtuvieron en un rango de presión relativa de 0.05-0.3  $P/P_0$ .

El método BET lo desarrollaron Brunauer, Emmet y Teller, se utiliza para interpretar la isoterma de adsorción y se utilizó para calcular los los datos obtenidos.

La fisisorción se realiza cuando un gas no polar, principalmente nitrógeno, se pone en contacto con un sólido desgasificado. Cuando se ponen en contacto el gas con la superficie del sólido se produce un equilibrio entre moléculas adsorbidas y moléculas en fase gaseosa que dependen de la presión del gas y la temperatura. Las isothermas se generan por la relación entre las moléculas y la presión a temperatura constante [85], [86].

## **2.6. Reacciones evaluadas**

### **2.6.1. Reacción de degradación de eosina amarillenta con AgXTNT y $\text{Ag}_3\text{PO}_4\text{XTNH}$**

Se usó eosina amarillenta (LeMont Productos Químicos, Indicator grade) como compuesto modelo para determinar la actividad fotocatalítica de los materiales sintetizados. Se mezclaron 20 mg de fotocatalizador en 200 mL de eosina a una concentración de 10 ppm. Los materiales se dispersaron ultrasónicamente en un vaso de precipitado, y se colocó en un reactor casero de borosilicato de 250 mL de capacidad. La mezcla se mantuvo en agitación en oscuridad para lograr el equilibrio adsorción-desorción. Después de 1 h el reactor se expuso a irradiación mientras se mantenían en agitación constante. La lámpara utilizada para los materiales AgXTNT fue de luz visible (lámpara halógena Philips, bloque UV Halotone, 50 W) y para el caso de los materiales  $\text{Ag}_3\text{PO}_4\text{XTNT}$  se utilizó una lámpara de luz visible (lámpara LED 3 W).

La velocidad de degradación de la fotoactividad se registró midiendo la intensidad de la banda de absorción principal de Eosina (517 nm) en función del tiempo de irradiación. Se tomaron muestras cada 15 min durante 3 horas. Las muestras se filtraron con un filtro de nailon de 0.45  $\mu\text{m}$  y después se analizaron en un espectrofotómetro UV-Vis-NIR Agilente Technologies Cary 5000.

## **2.6.2. Reacción antimicrobiana de AgXTNT con *E.coli*.**

### **2.6.2.1. Crecimiento con *E. coli*.**

La determinación de la actividad antimicrobiana de AgXTNT con *E. coli* se midió mediante ensayos de viabilidad de las bacterias después de la exposición con NPs. Se midió la densidad óptica del cultivo, cuentas viables cuantificadas por unidades formadoras de colonias (UFC) en placa y ensayos de viabilidad en líquido. Para determinar el número de células de un cultivo se mide la densidad óptica y se correlaciona con el número de células. La densidad óptica se midió en un espectrofotómetro Shimatzu a 600 nm [87]. La viabilidad de un cultivo celular en presencia de agentes antimicrobianos se determinó de la siguiente manera. Al cultivo de células expuestas a los agentes antimicrobianos se les hizo diluciones seriadas y se pusieron 100 µl de estas diluciones en cajas de medio LB con agar. El número de células se cuenta y se compran con un cultivo no tratado. [88]. La actividad antimicrobiana de AgXTNT se determinó con *E. coli*. TOP10 Se inoculó una cepa de *E. coli* en medio Luria Bertani (LB) y se incubó por 14 hr a 30°C con agitación constante a 180 rpm. Al día siguiente, se midió la densidad óptica del cultivo a 600 nm. El cultivo se centrifugó a 4500 rpm durante 10 min. El sobrenadante se descartó y las bacterias se re-suspendieron en medio M91X y se ajustaron a una concentración de  $1 \times 10^9$  células/mL a una densidad óptica de 1 a 600 nm. En todos los experimentos se utilizó AgXTNT.

### **2.6.2.2. Evaluación antimicrobiana con AgXTNT de *E. coli***

La evaluación fotocatalítica de AgXTNT, TNT y NPsAg en *E. coli* se realizó en placas de cultivo de 24 pozos con agitación magnética constante (350 rpm). Los cultivos fueron irradiados con luz visible con una lámpara halógena (Smart halógeno 65 W, Panasonic Corporation). A los cultivos se les agregó 1 mg/mL de los diferentes catalizadores, AgXTNT, TNT y NPsAg. Se tomaron alícuotas de 100 µL a los 5, 15, 30, 45 y 60 min. Después se realizaron diluciones en serie 1:10 y se

platearon 100  $\mu$ L en cajas de LB agar. Las cajas se incubaron durante 14 hr a 30°C. Al día siguiente se contaron las UFC.

### 2.6.2.3. Caracterización morfológica de *E. coli*

Para determinar cómo los materiales probados afectan la morfología de *E. coli* se hizo mediante microscopía electrónica de barrido. Se recolectaron las células a intervalos de tiempo en los que fueron evaluados durante la reacción fotocatalítica. Las células se fijaron en glutaraldehído al 3% en una solución buffer de fosfato de sodio (PBS), 100 mM, a pH 7.4, y se incubaron a 4°C durante 1 h. Las muestras se lavaron cuatro veces con PBS. Posteriormente, las células se fijaron en una solución buffer de OsO<sub>4</sub> al 1% durante 2 h a 4°C y se lavaron 4 veces. Las muestras se deshidrataron progresivamente con etanol con concentraciones de 30, 40, 50, 60, 70, 80, 95 y 100%. Las células se incubaron durante 10 min en cada concentración para finalmente lavar nuevamente dos veces más con etanol absoluto al 100% en lapsos de 15 min. El proceso de secado del punto crítico se realizó en un Tousimis Samdri-PVT-3D. Las muestras secas se montaron y se recubrieron con oro pulverizado en un aparato Cressington Model 108 auto y se examinaron en un microscopio FEI Quanta 250 SEM. El microscopio electrónico de barrido se ajustó a 25 kV, punto 4.5 y WD 10 mm, tomando las micrografías con un Everhart Thornley Detector (ETD).

La ultraestructura de *E. coli* se observó y evaluó por microscopía electrónica de transmisión. Para esta técnica las células se fijaron y posteriormente se deshidrataron progresivamente en etanol absoluto en diferentes concentraciones hasta 100%. Después, la pre-inclusión se realizó en LRW: etanol absoluto 1:1 por 2 horas y LRW puro durante toda la noche. Las células fijadas se incrustaron en cápsulas de gelatina y se polimerizaron a 50 °C durante 48 h. Se obtuvieron secciones ultrafinas con un ultra micrótopo y se colocaron en FCF-100 Cu y se concentraron con acetato de uranilo al 2% durante 10 min, seguido de citrato de plomo al 2% durante 5 min. Finalmente, las muestras se examinaron en un

microscopio electrónico de transmisión JEM-200 CX (JEOL) a 100 kV y equipado con una cámara digital (SIA, Alemania).

### **2.6.3. Reacción antifúngica de $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ XTNT en *C. glabrata*.**

#### **2.6.3.1. Crecimiento de *C. glabrata***

Las cepas de *C. glabrata* se cultivaron en medio rico YPD: extracto de levadura 10 g/L, peptona 20 g/L, uracilo 25 mg/L, glucosa 2%. Para medio sólido se agregó al YPD agar al 2%. Se inocularon cultivos y se incubaron a 30°C con agitación. El número de células se determinó midiendo la densidad óptica a 600 nm con un espectrofotómetro Shimadzu. Al día siguiente se tomó una alícuota de 5  $\mu\text{L}$  y se creció en medio fresco YPD y se incubó durante 48 hr (células en fase estacionaria). El cultivo se ajustó a una densidad óptica de 600 nm que es igual a  $1 \times 10^7$  células/mL.

#### **2.6.3.2. Evaluación antifúngica de *C. glabrata* con TNT**

Para determinar la actividad antifúngica de los TNT, se colocó 1 mL de células en fase estacionaria con 1 mg de TNT. Se incubaron en placas de cultivo celular de 24 pozos con agitación constante a 30°C. Se tomaron muestra de 100  $\mu\text{L}$  cada 15 min y se realizaron diluciones seriadas 1:10 con agua destilada estéril. Se platearon 100  $\mu\text{L}$  de las diluciones  $10^3$  y  $10^4$ . Las cajas se incubación a 30°C durante 24 horas. Al día siguiente se contaron las UFC.

En la Tabla 2.1, se muestran los experimentos realizados con TNT, donde los TNT fueron tomados como control.

**Tabla 2.1.** Condiciones de experimentos para la evaluación antimicrobiana de TNT en *C. glabrata*..

Experimento	Condición
1	TNT + Luz
2	Luz
3	TNT en Oscuridad
4	Oscuridad

Para los experimentos que fueron irradiados, se utilizó una lámpara de luz led color azul de 3 W.

## **2.7. Ensayo de sensibilidad a $Ag_3PO_4$ y cálculo de MIC50 con *C. glabrata***

Los cultivos en fase estacionaria de diferentes cepas se diluyeron en medio YPD fresco en presencia y ausencia de  $Ag_3PO_4$  para obtener una suspensión de células a una concentración de  $1 \times 10^7$  cel/mL. Se colocaron por triplicado 300  $\mu$ L de cada suspensión celular en una caja de 100 pozos Honeycomb. Las cajas se incubaron en el equipo Bioscreen a 30°C con agitación constante y se midió la densidad óptica cada 30 min durante 10 horas a 600 nm.

Los valores de MIC50 para cada cepa se calcularon como se describió previamente utilizando el programa GraphPadPRISM. MIC50 es la concentración que produce una inhibición del crecimiento celular del 50%.

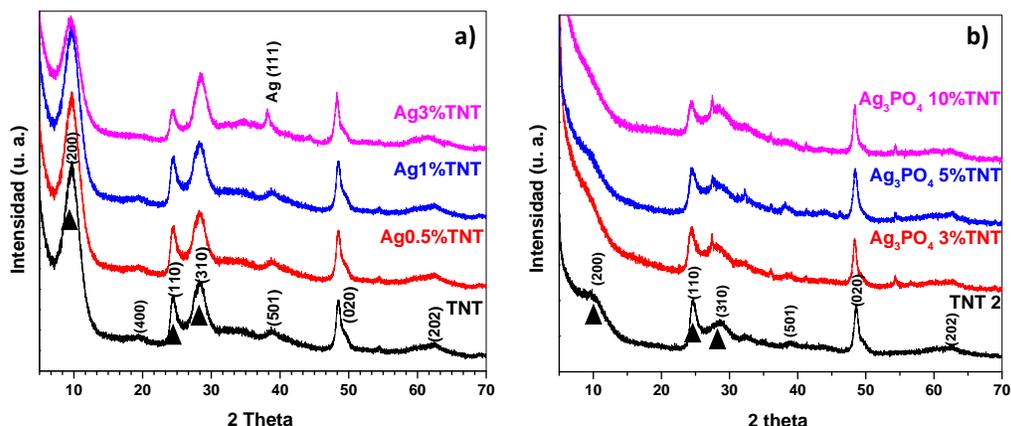
### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Difracción de rayos X

La técnica de difracción de rayos X se usó para identificar las fases cristalinas de los materiales sintetizados en este trabajo.

En la Figura 3.1, se presentan los patrones de difracción de rayos X para los TNT sintetizados por el método hidrotermal y los TNT funcionalizados con NPsAg y  $\text{Ag}_2\text{PO}_4$  a diferentes porcentajes. Se observan los picos de reflexión  $9.77^\circ$ ,  $24.5^\circ$ ,  $28.48^\circ$  y  $48.02^\circ$  que son característicos de la estructura ortorrómbica de  $\text{H}_2\text{Ti}_2\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$  asignadas por el patrón de difracción de la carta (JCPDS 41-0192) [89], con valores de parámetros de red de  $a=2.998$ ,  $b=3.784$ ,  $c=18.030$  (Figura 3.1a). Estos materiales de acuerdo con el difractograma muestran baja cristalinidad. El pico de reflexión de  $9.77^\circ$  está relacionado con la distancia entre capas de los nanotubos [90]. Los picos a  $24.5^\circ$ ,  $28.48^\circ$  y  $48.02^\circ$  son característicos de los materiales 1D, además estos picos son indicativos del proceso de sustitución del  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  debido al proceso de lavado. También se exhiben los mismos picos característicos para la estructura ortorrómbica  $\text{H}_2\text{Ti}_2\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (Figura 3.1b). Sin embargo, en estos últimos difractogramas presentan reducción de la intensidad en la reflexión a  $2\theta = 9.77^\circ$ . Esto puede ser consecuencia del lavado con HCl ya que Tomoko et al , mencionan que cuando se realiza el lavado de los TNT con HCl y el pH disminuye a menos de 3 se observa la reducción de la intensidad de esta reflexión en los difractogramas [91].

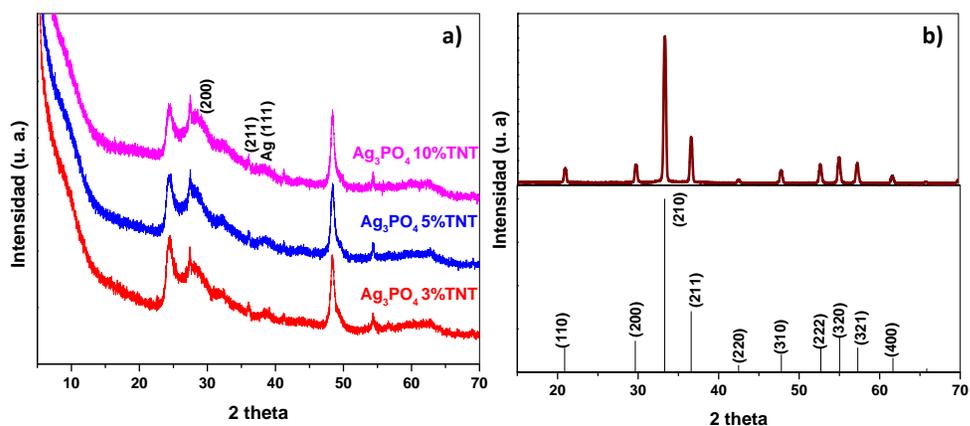
Otro de los factores de la baja intensidad y el ancho de los picos puede deberse a la presencia de enlaces Na-OH, ya que en el tratamiento con lavados ácidos, no se pudo controlar la cantidad de iones  $\text{Na}^+$  que son remplazados con iones  $\text{H}^+$ . y que debido a esto es posible la formación de diversos tipos de titanatos. Por tal motivo es necesario eliminar los iones  $\text{Na}^+$  para mejorar la estabilidad y la cristalinidad [53].



**Figura 3.1.** Patrón de difracción de rayos-X, a) TNT y AgXTNT, b) TNT y  $\text{Ag}_3\text{PO}_4\text{XTNT}$  los triángulos denotan los picos característicos de los TNT  $9.77^\circ$ ,  $24.05^\circ$  y  $27.82^\circ$  [51].

Para los TNT funcionalizados con NPsAg3%, se puede observar que presentan las fases principales de la plata metálica (JCPDS 04-0783). Para los TNT funcionalizados al 0.5 y 1% de Ag, no se identificó ningún pico característico de plata metálica debido a la baja cantidad de Ag (Figura 3.1a). Esto podría deberse, al tamaño nanométrico de las partículas de plata altamente dispersadas sobre la estructura de los TNT.

Para los TNT funcionalizados a diferentes porcentajes de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  (Figura 3.2a), se observan reflexiones para el  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  que concuerdan con el patrón estándar (JCPDS 06-0505), además de la reflexión que nos indica la presencia de plata metálica.

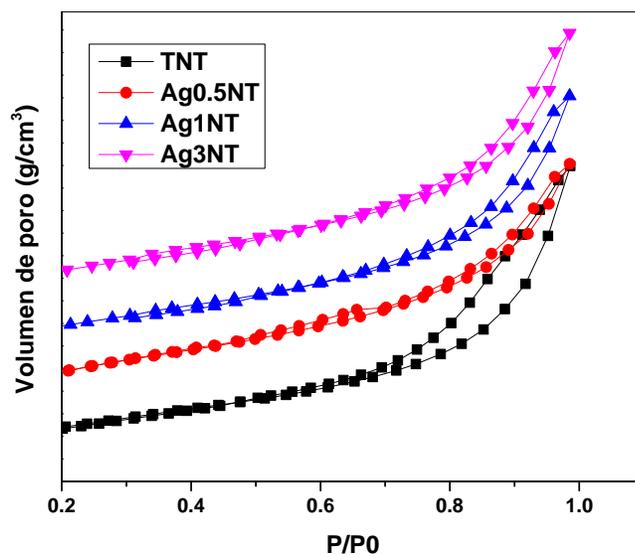


**Figura 3.2.** Patrón de difracción de rayos X, a)  $\text{Ag}_3\text{PO}_4\text{XTNT}$ , b) partículas de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ .

Los patrones de difracción de rayos X de las estructuras de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  muestran los picos reflejados que coinciden con la fase cristalina del patrón estándar de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  (JCPDS 06-0505), (Figura 3.2) [80], con estructura cristalina cúbica centrada en el cuerpo (CCC). Los parámetros de red son de:  $a=6.013$ ,  $b=6.013$ ,  $c=6.013$ .

### 3.2. Fisorción de Nitrógeno

Mediante la técnica de fisorción de nitrógeno se obtuvieron las isothermas de adsorción-desorción de nitrógeno para cada TNT y funcionalizados  $\text{AgXTNT}$  (Figura 3.3).



**Figura 3.3.** Isotermas de adsorción-desorción de TNT sintetizados por el método hidrotérmico y TNT funcionalizados con NPsAg.

Los materiales sintetizados y funcionalizados con diferentes porcentajes de plata presentan una isoterma tipo IV. La isoterma tipo IV es característica de materiales mesoporosos particularmente de sólidos formados por poros de tamaño y forma uniforme de acuerdo a la clasificación de la IUPAC, (Figura 3.3) [19], [20], [22].

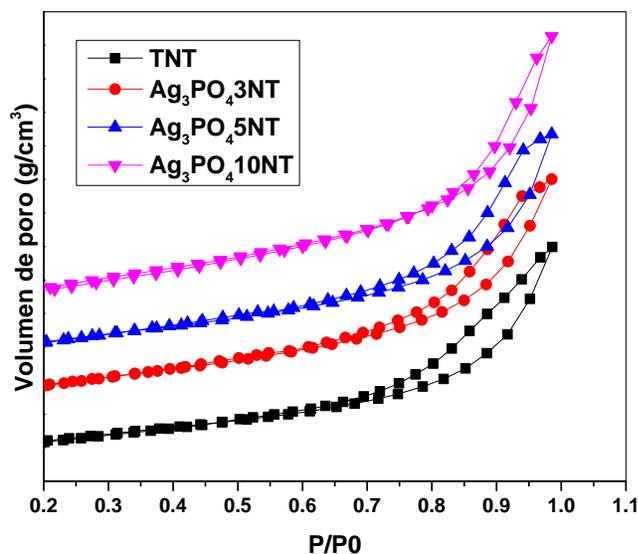
Esta técnica también permitió determinar el área superficial específica de volumen y diámetro de poro de cada material, (Tabla 3.1).

**Tabla 3.1.** Área superficial, volumen y diámetro de poro de los materiales AgXTNT y TNT

Material	Área superficial BET (m <sup>2</sup> /g)	Volumen de poro (g/cm <sup>3</sup> )	Diámetro de poro (nm)
TNT	266.209	4.887 <sup>-01</sup>	3.958
Ag 0.5%TNT	244.873	4.513 <sup>-01</sup>	3.945
Ag1%TNT	208.253	4.549 <sup>-01</sup>	3.945
Ag 3%TNT	201.611	4.899 <sup>-01</sup>	3.954

Los materiales modificados con Ag presentan áreas superficiales reducidas o menores en comparación con los TNT. Respecto al volumen y al diámetro los valores son similares respecto a los TNT.

De manera similar se realizaron pruebas de fisisorción para  $\text{Ag}_3\text{PO}_4\text{XTNT}$  (Figura 3.4).



**Figura 3.4.** Isothermas de adsorción-desorción de TNT sintetizados por el método hidrotérmal y TNT funcionalizados con  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ .

Estos materiales presentaron isotermas tipo IV, característicos de los materiales mesoporosos de acuerdo a la IUPAC [19], [20], [22].

En la Tabla 3.2, se presentan los valores calculados del área superficial específica, volumen y diámetro de poro.

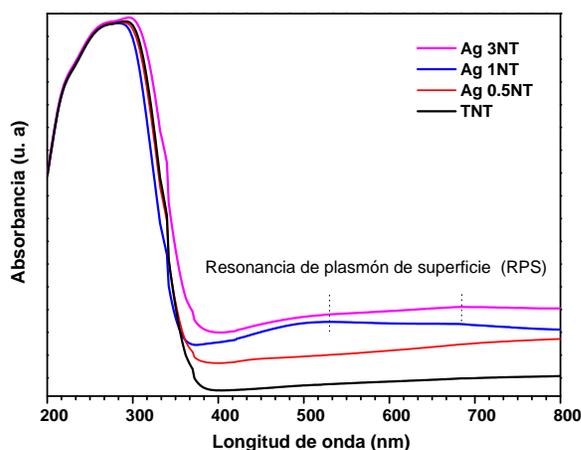
**Tabla 3.2.** Área superficial, volumen y diámetro de poro de los materiales  $\text{Ag}_3\text{PO}_4\text{XTNT}$  y TNT

Material	Área superficial BET ( $\text{m}^2/\text{g}$ )	Volumen de poro ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )	Diámetro de poro (nm)
TNT	215.148	$5.023^{-01}$	3.950
$\text{Ag}_3\text{PO}_4$ 3%TNT	251.495	$5.886^{-01}$	3.454
$\text{Ag}_3\text{PO}_4$ 5%TNT	267.249	$5.84^{-01}$	3.474
$\text{Ag}_3\text{PO}_4$ 10%TNT	294.113	$5.898^{-01}$	3.400

A diferencia de los materiales funcionalizados con NPsAg en los cuales se encontró que disminuía su área superficial al aumentar la cantidad de NPsAg, los materiales modificados con  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  presentan áreas superficiales mayores en comparación con los TNT. Con respecto al volumen y al diámetro de poro los valores son muy similares a los TNT.

### 3.3. Espectroscopia UV-Vis de Reflectancia Difusa

El análisis a partir de UV-Vis (RD), permite determinar la energía de banda prohibida ( $E_g$ ). Para la estimación de  $E_g$  a partir de los espectros de UV-Vis, se extrapoló una línea recta desde la curva de absorción al eje de abscisas, cuando  $\alpha$  es igual a cero, (Figura 3.5).

**Figura 3.5.** Espectro UV-Vis RD de  $\text{AgXTNT}$ , sintetizados por el método hidrotérmal.

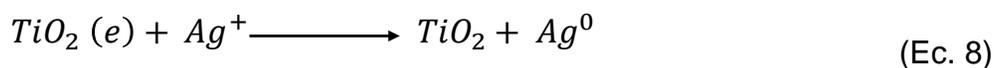
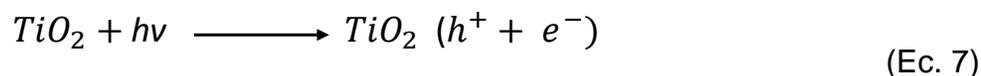
Los espectros de los nanotubos muestran la banda de absorción por debajo de 350 nm (Figura 3.5). Después de la deposición con NPsAg, los espectros presentan otra banda alrededor de 500 nm. Esta banda es característica de las NPsAg presente por su resonancia de plasmón de superficie (RPS).

Este fenómeno ocurre cuando las oscilaciones colectivas de los electrones se encuentran libres en la banda de conducción. Estas excitaciones colectivas de los electrones se encuentran libres en estructuras metálicas en la interfaz metal/dieléctrico. La resonancia se produce cuando la longitud de onda de un haz incidente es mayor que el diámetro de la partícula [92].

La banda de plasmón de superficie aparece en los TNT que fueron funcionalizados con NPsAg. Esto indica que las partículas de plata depositas son metálicas. La  $Ag^+$  se reduce a  $Ag^0$  después de la irradiación con la lámpara de mercurio de 235 nm en el proceso de foto-depósito.

En la Tabla 3.3, se muestran los valores de energía de banda prohibida de los TNT, y TNT funcionalizados con NPsAg.

Cuando los nanotubos se irradian bajo luz UV, estos experimentan separación de carga. Después la superficie adsorbida del  $AgNO_3$  captura los electrones fotogenerados y se reducen en la superficie de los TNT formando Ag metálica, (Ec. 7 y Ec. 8) [93].



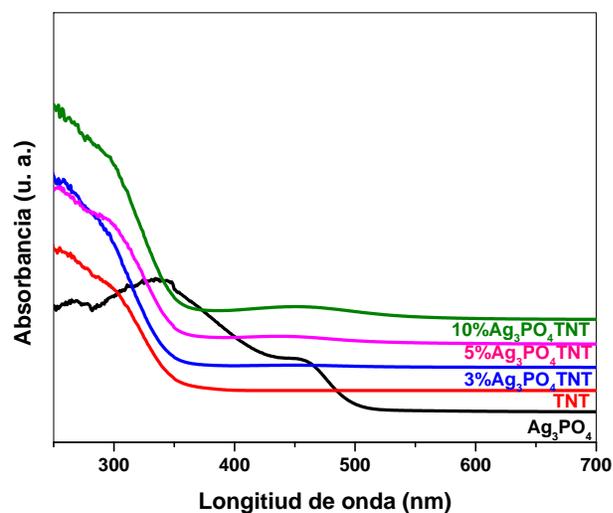
El  $E_g$  de los TNT es de 3.35 eV y para Ag3%TNT es de 3.3. eV, en promedio. La resonancia de plasmón de superficie de NPsAg mejora la absorción de la luz visible.

En la Tabla 3.3, se muestran los valores de  $E_g$  para los materiales TNT y AgXTNT.

**Tabla 3.3.**  $E_g$  para los materiales sintetizados por el método hidrotermal TNT y AgXTNT.

Material	$E_g$ (eV)
TNT	3.3.
Ag0.5%TNT	3.38
Ag1%TNT	3.45
Ag3%TNT	3.31

Se determinó el espectro UV-Vis DRS y obtuvimos la energía de banda prohibida de los TNT,  $Ag_3PO_4$  y  $Ag_3PO_4XTNT$  (Figura 3.6).



**Figura 3.6.** Espectro UV-Vis RD de TNT,  $Ag_3PO_4$  y  $Ag_3PO_4XTNT$ , sintetizados por el método hidrotermal.

La pendiente que se encuentra aproximadamente a 380 nm es de los TNT y presenta una  $E_g$  de 3.2 eV. El  $Ag_3PO_4$  mostró una absorbancia a 480 nm y esto indica que es reactivo con luz visible [80].

La Tabla 3.4, muestra los valores de  $E_g$  para los materiales TNT,  $Ag_3PO_4$  y  $Ag_3PO_4XTNT$ .

**Tabla 3.4.**  $E_g$  para los materiales sintetizados por el método hidrotermal TNT y  $Ag_3PO_4XTNT$

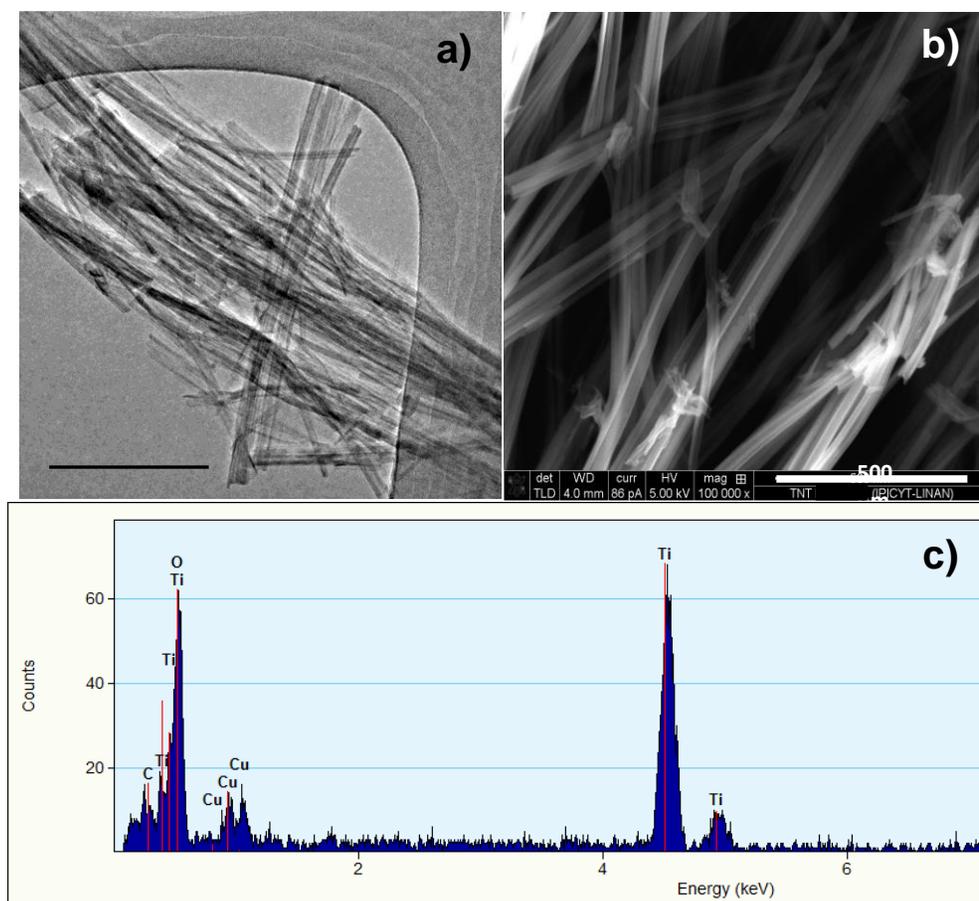
Material	$E_g$ (nm)
TNT	3.19
$Ag_3PO_4$	2.26
$Ag_3PO_4$ 3%TNT	3.22
$Ag_3PO_4$ 5%TNT	3.20
$Ag_3PO_4$ 10%TNT	3.17

Las energías de banda prohibida, para los TNT en ambas síntesis en encuentran en 3.3 y 3.19 eV respectivamente. Los valores de  $E_g$  de  $AgXTNT$  se encuentran en un rango de 3.3 – 3.45 eV. En el caso de  $Ag_3PO_410\%TNT$  se logró disminuir la energía de banda prohibida de 3.19 a 3.17 eV en comparación con los TNT sin funcionalizar. Estos datos indican que los materiales son reactivos bajo luz visible. El  $Ag_3PO_3$  presenta un  $E_g$  de 2.26 eV y es consistente con la propiedad de absorción de la luz para este material de acuerdo con lo reportado por otros autores [67], [80], [81], [94]

### 3.4. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) y de Barrido (MEB)

Los detalles morfológicos y microestructurales de los compuestos se examinaron mediante MEB y MET. La imagen HRTEM de TNT que fueron preparados por el método hidrotermal con lavados ácidos. De acuerdo con la

imagen podemos observar que los TNT presentan diámetros de 10 - 20 nm y longitud de 200 nm (Figura 3.7a y 3.7b).



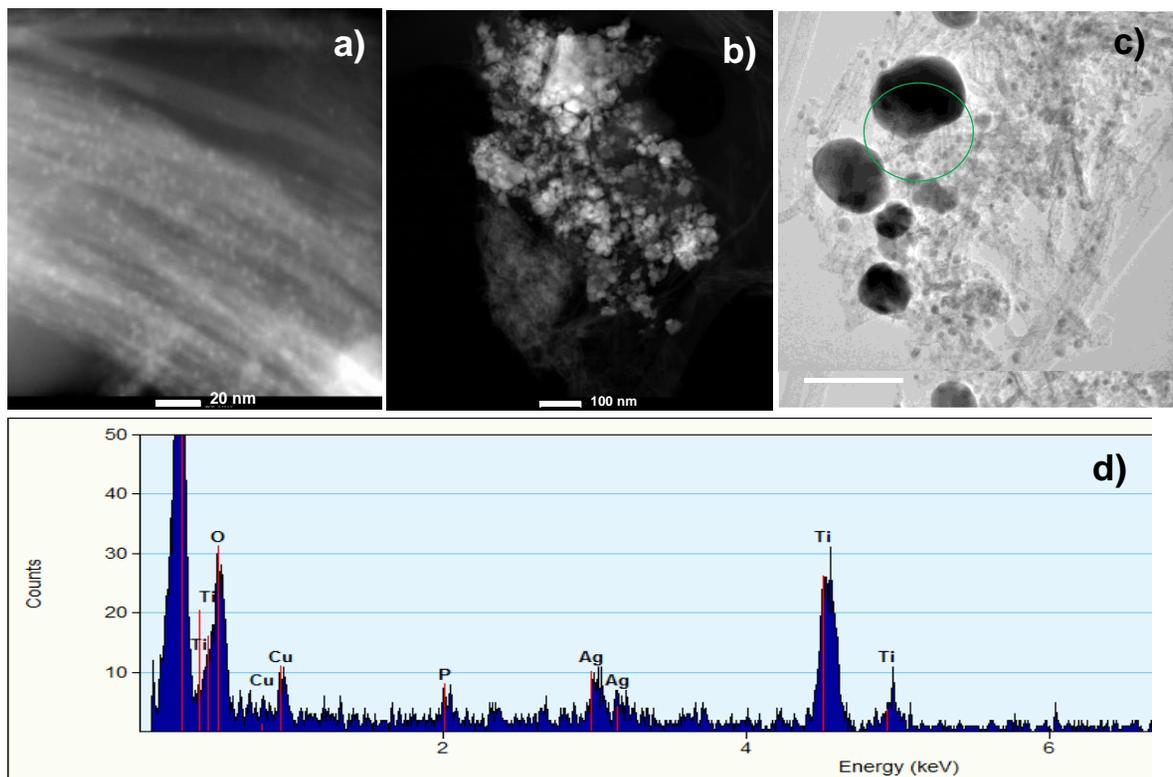
**Figura 3.7.** Imágenes a) HRTEM donde muestra la morfología de los TNT, b) MEB por electrones secundarios de la morfología de los TNT, c) espectro EDS de los TNT.

La Figura 3.7c muestra el espectro del análisis químico semicuantitativo de la composición química de los TNT, donde se observa la presencia de Ti y O, además de Cu de la rejilla.

Las imágenes HAADF y MEB por electrones retrodispersados, se observa la dispersión de las partículas de  $\text{Ag}_3\text{PO}$  y las  $\text{NPsAg}$ . La Figura 3.8a, muestra la imagen en HAADF, donde se observa la dispersión homogénea de las  $\text{NPsAg}$  sobre los TNT, además mediante esta técnica se logró identificar el tamaño de partícula de las  $\text{NPsAg}$  que fue de 1 a 5 nm. En la Figura 3.8b se observa los aglomerados

que presentaron los TNT sobre la superficie cuando fueron funcionalizados al 10% de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ . La Figura 3.8c muestra la imagen HRTEM de los TNT funcionalizados al 5% de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ , donde se observa poca homogeneidad ya que presenta diferentes tamaños de partícula y para comprobar la composición de estas se realizó un EDS donde se muestra la composición y hay presencia de Ti, O, Ag y P, (Figura 3.8d).

Con los resultados obtenidos para los TNT funcionalizados con  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ , es necesario buscar un nuevo método de fotodeposito, ya que no hubo una dispersión homogénea sobre la superficie de estos, además de que varió el tamaño de partícula depositado y otros solo se aglomeraron en la superficie de los TNT.

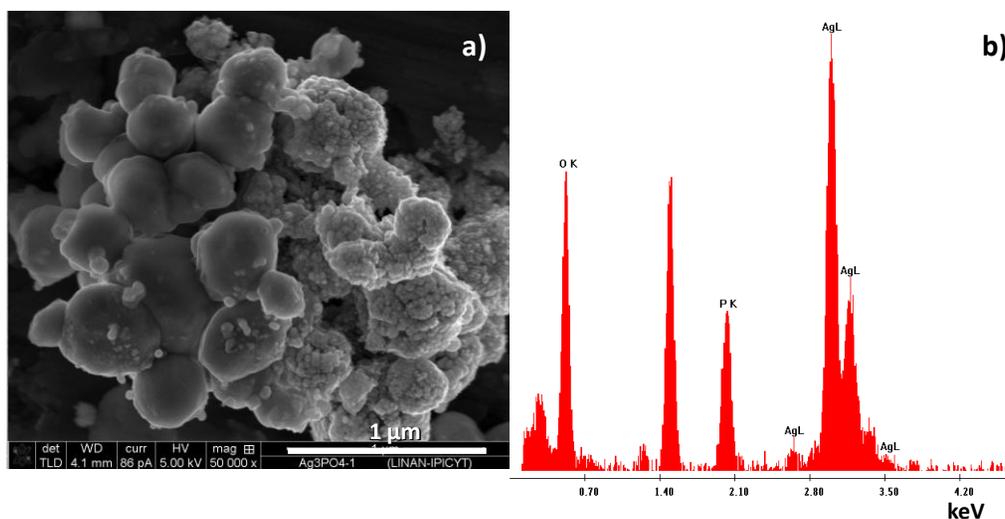


**Figura 3.8.** Imágenes de, HAADF del fotocatalizador  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ 10%TNT, b) HAADF del fotocatalizador  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ 10%TNT, c) HERTM del fotocatalizador  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ 5%TNT, d) espectro EDS de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ 5%TNT.

Para verificar el contenido de Ag en los TNT, se realizó espectroscopia de emisión óptica de plasma acoplado individualmente (ICP-OES) con un espectrómetro 730-ES de Varian INC. Se determinó que las cantidades fueron de 0.45, 0.92 y 2.45% en peso respectivamente para Ag 0.5%TNT, Ag 1%TNT y Ag 3%TNT.

En un experimento control las partículas de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  se prepararon por el método de precipitado de iones. De acuerdo con las imágenes MEB, la mayoría de las partículas mostraron una forma esférica irregulares con diámetros alrededor de 0.2 a 2  $\mu\text{m}$  (Figura 3.9) [80] [95]. Esto se debe a la presencia de  $\text{AgNO}_3$ . Los iones de  $\text{Ag}^+$  se encuentran libres en el sistema en concentraciones considerables y el proceso de crecimiento de los cristales de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  es directo e incontrolable y estas condiciones modulan el crecimiento como nucleación rápida y a diferentes planos de cristales de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ . Esto da como resultado la formación de esferas irregulares. Por tal motivo para mejorar la morfología y el tamaño de las partículas de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  es necesario el uso de precursores que liberen gradualmente los iones  $\text{Ag}^+$  y de esta forma controlar el crecimiento de los cristales para reducir su tamaño. Para mejorar la actividad fotocatalítica es necesario que los cristales tengan tamaño nanométrico con grandes áreas de superficie [94].

Por tal motivo es necesario buscar parámetros óptimos de síntesis para obtener nanopartículas de menor tamaño de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ , (Figura 3.9a).



**Figura 3.9.**  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ , a) imagen MEB en electrones secundarios, b) análisis químico por EDS.

Para comprobar la composición de las partículas sintetizadas se realizó el análisis EDS en el cual se identificaron los siguientes elementos Ag, P y O (Figura 3.9b).

### 3.5. Reacciones fotocatalíticas

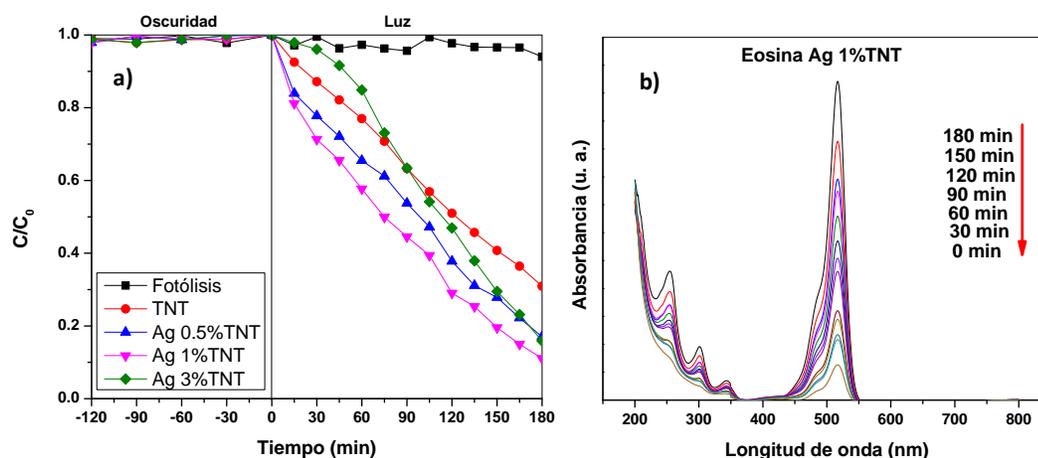
#### 3.5.1. Reacción de degradación de Eosina amarillenta con TNT y $\text{AgXTNT}$ .

La actividad fotocatalítica de los materiales sintetizados se evaluó mediante la fotodegradación de eosina amarillenta bajo irradiación de luz visible. La banda de absorción de eosina se encuentra a 517 nm (Figura 3.10b).

Se determinó que el compuesto  $\text{Ag1\%TNT}$  fue el mejor catalizador con que se logró la degradación de eosina al 89% en 3 horas. Se puede observar que la concentración de eosina decrece rápidamente desde los primeros 15 min de exposición a la luz visible (Figura 3.10a). La actividad de  $\text{Ag1\%TNT}$  es notablemente mayor en comparación con los TNT sin funcionalizar. Para comprobar la actividad de degradación de  $\text{Ag1\%TNT}$  se tomaron muestras cada 15 min para después analizarlos por el espectrofotómetro UV-Vis. En suma, estos

resultados indican que los Ag1%TNT, Ag0.5%TNT y Ag3%TNT pueden ser aplicados para la fotodegradación de colorantes orgánicos.

La funcionalización de los TNT con NPsAg mejoró notablemente la absorción óptica de la luz en la región del visible (Figura 3.10a).



**Figura 3.10.** Gráficas a) degradación de eosina amarillenta, b) adsorción del colorante eosina amarillenta con el fotocatalizador Ag1%TNT.

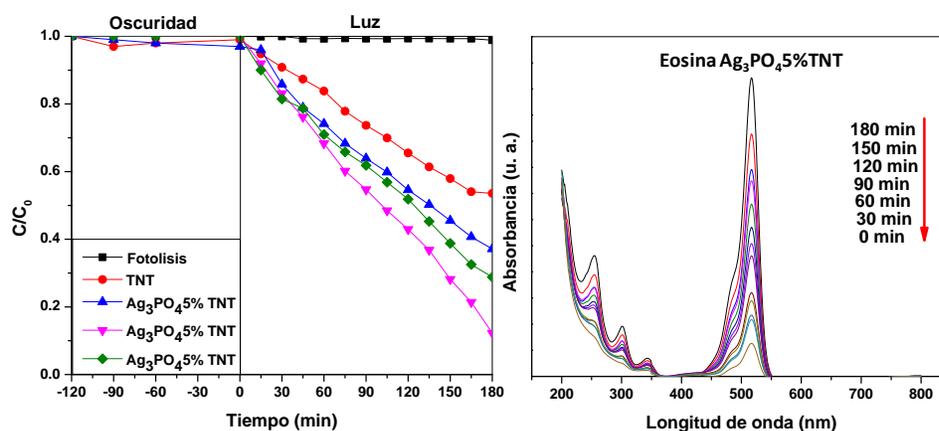
### 3.5.2. Reacción de degradación de Eosina amarillenta con TNT y $Ag_3PO_4XTNT$ .

El análisis de la actividad fotocatalítica de los materiales  $Ag_3PO_4XTNT$  se realizó con la fotodegradación de eosina amarillenta en solución acuosa bajo irradiación de luz visible. La fuente de iluminación fue una lámpara LED de color azul de 3 W. La absorbancia decrece y esto indica que la disminución de la concentración de eosina amarillenta es consecuencia de su degradación (Figura 3.11a). La banda de absorción de eosina se encuentra a 517 nm (Figura 3.11b).

El decremento de la concentración del colorante comienza desde los 15 min de exposición a la luz visible en presencia de los fotocatalizadores. El rendimiento fotocatalítico presentó una mejora evidente con la funcionalización con  $Ag_3PO_4$  en especial al emplear  $Ag_3PO_4$  5%TNT. Se alcanzó el 88% de fotodegradación de

eosina amarillenta antes de las 3 horas de exposición. Notoriamente los TNT funcionalizados presentan mayor actividad fotocatalítica que los TNT sin funcionalizar. Esto indica que, estos materiales son fotocatalizadores eficaces para la degradación de contaminantes orgánicos.

El  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  fue el mejor catalizador para la degradación de eosina amarillenta. Sin embargo, este compuesto no es estable. Cuando el  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  se irradia, la Ag que se encuentra presente en el compuesto se reduce por los electrones fotogenerados por la fuente de radiación. Esto sugiere que  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  no sería un fotocatalizador viable para usarse a largo plazo como se menciona [10].

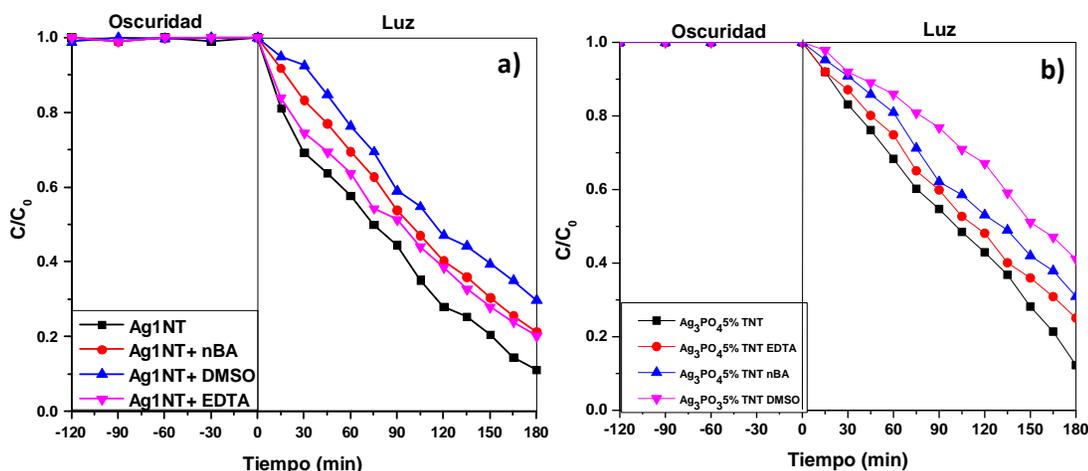


**Figura 3.11.** Gráficas a) degradación de eosina amarillenta, b) adsorción del colorante eosina amarillenta con el fotocatalizador  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  5% TNT.

Para poder determinar los huecos, radicales hidroxilo y superóxidos se realizaron experimentos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), n-butyl alcohol (nBA) y dimetilsulfóxido (DMSO) como agentes sacrificantes de radicales reactivos.

Se añadió 1 mM de cada eliminador por separado para cada experimento con el fin de determinar qué especie de oxígeno reactivo es el principal responsable de la fotodegradación del colorante [96], [97]. Entre los tres

eliminadores utilizados, la adición de EDTA y nBA disminuyó la fotogeneración de eosina del 89 al 80% para el caso de Ag1%TNT (Figura 3.12a) y para Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>5%TNT del 88 al 70% para nBA y del 88 al 78% para EDTA (Figura 2.12b). El rendimiento de EDTA es más efectivo al comienzo de la degradación para ambos casos. Estos datos sugieren que los huecos son los principales radicales responsables de la degradación seguido por los hidroxilos tanto para Ag1%TNT y Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>5%TNT.



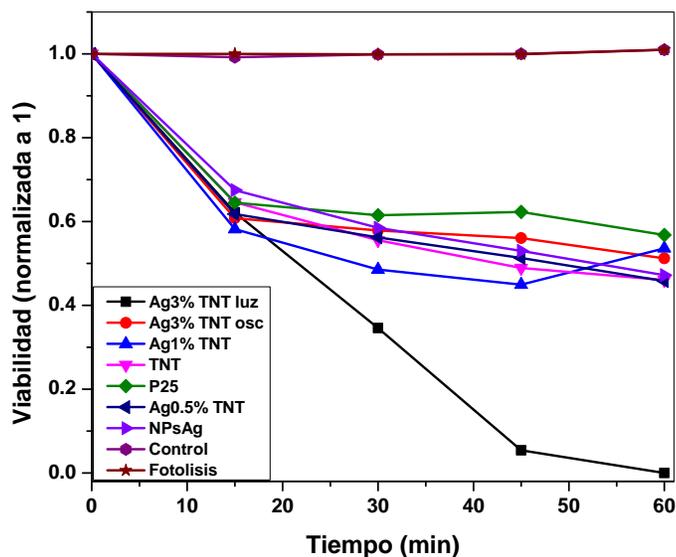
**Figura 3.12.** Degradación fotocatalítica de eosina con la adición de sacrificantes a) Ag1%TNT, b) Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>5%TNT para identificar especies de oxígeno reactivas responsables de la fotodegradación.

### 3.5.3. Evaluación de actividad antimicrobiana de AgXTNT en *E. coli*

Se evaluó la capacidad de los TNT funcionalizados con NPsAg y sin NPs para inhibición del crecimiento de *E. coli*. El número de células viables fue menor con Ag3%TNT cuando este material se irradió con luz visible. La pérdida de viabilidad se dio a partir desde los 20 min de exposición y a los 60 min se llegó al 100% de la pérdida de la viabilidad en comparación con los controles que fueron TNT, NPsAg y los TNT funcionalizados a concentraciones más bajas de plata, (Figura 3.13).

Estos datos indican que la funcionalización de los TNT con NPsAg inhibe eficientemente el crecimiento de *E. coli*. En esta prueba, el control negativo

únicamente consiste en células de *E. coli* a una concentración de  $1 \times 10^9$  cel/mL. Para comprobar si la luz con la que son irradiadas es o no un factor importante para la pérdida de viabilidad, se realizó la prueba de fotólisis, que consiste en tener la misma cantidad de células e irradiarlas con la misma lámpara que se utilizó para activar a los fotocatalizadores (lámpara de luz halógena).



**Figura 3.13.** Gráfica de viabilidad normalizado a 1 contra tiempo de exposición, donde 1 es igual a  $1 \times 10^9$  cel/mL de de *E. coli*.

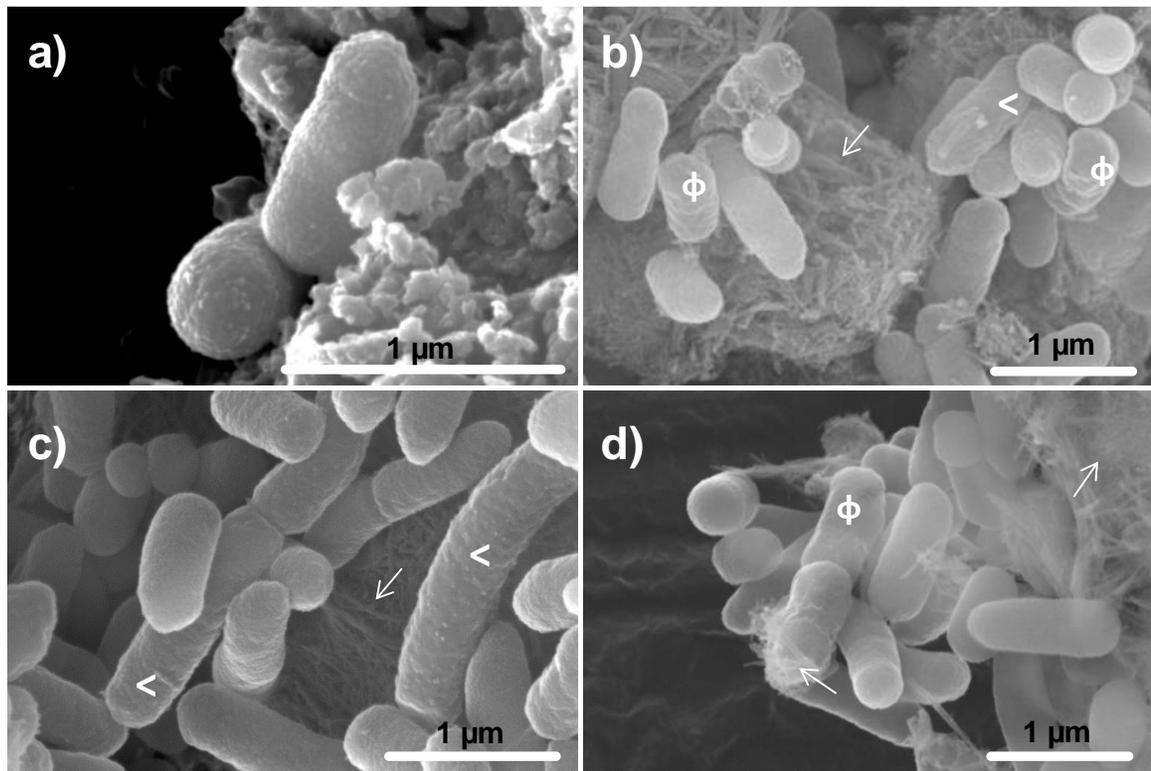
Estos resultados son muy similares a los de la literatura [7], [23], [24], [98], donde nanocompuestos mostraron una excelente actividad para inhibir el crecimiento de *E. coli*. De acuerdo con el informe de Kang et al [99], mediante el uso de nanotubos de CdS/Pt-TiO<sub>2</sub>, lograron la fotoinactivación de *E. coli*, alcanzando una viabilidad de pérdida celular del 80% en 120 min por la disrupción de la integridad oxidativa de la membrana celular debido a la toxicidad de los nanotubos de carbono y a la alteración morfológica en 2 horas [8], [12].

Hasta el momento el mecanismo antimicrobiano de la Ag no se ha demostrado por completo, sin embargo, muchos reportes de la literatura indican

que los iones de Ag tienen múltiples blancos dentro del microorganismo para inactivar diferentes funciones fisiológicas.

### **3.5.3.1. Morfología y estructura de *E. coli* por microscopía electrónica de barrido**

*E. coli* es una Enterobacteria Gram.negativa con morfología de bastón con dimensiones de 1.1-1.5  $\mu\text{m}$  y 2-6  $\mu\text{m}$ . Las células competentes de *E. coli* TOP10F son más pequeñas con dimensiones de 0.1-0.3  $\mu\text{m}$  y 0.7-1.2  $\mu\text{m}$ . Las imágenes MEB se tomaron a los 45 min de tratamiento, ya que hay pérdida de la mayoría de viabilidad en este punto (Figura 3.13). La muestra control sin tratamiento tiene formas densas de bastones rectos de tamaño aproximado de 1 a 1.2  $\mu\text{m}$  (Figura 3.14a). En cambio, las células expuestas a fotocátalisis con Ag3%TNT muestran células dañadas que en su mayoría perdió la forma de bastones y presentan ondulaciones en la superficie (Figura 3.14b). Sin embargo, algunas células mantienen la morfología normal, incluso después de los 60 min que fue el tiempo requerido para inhibir el crecimiento de *E. coli*. Las células expuestas Ag3%TNT en condiciones de oscuridad no presentaron daño y algunas aumentaron de tamaño, y solo un reducido número de células mostraron alteraciones morfológicas en comparación con las células control (Figura 3.14c) Las células expuestas a TNT no presentaron daño salvo el aumento del tamaño en una pequeña parte de la población en comparación con las células control (Figura 3.14d).



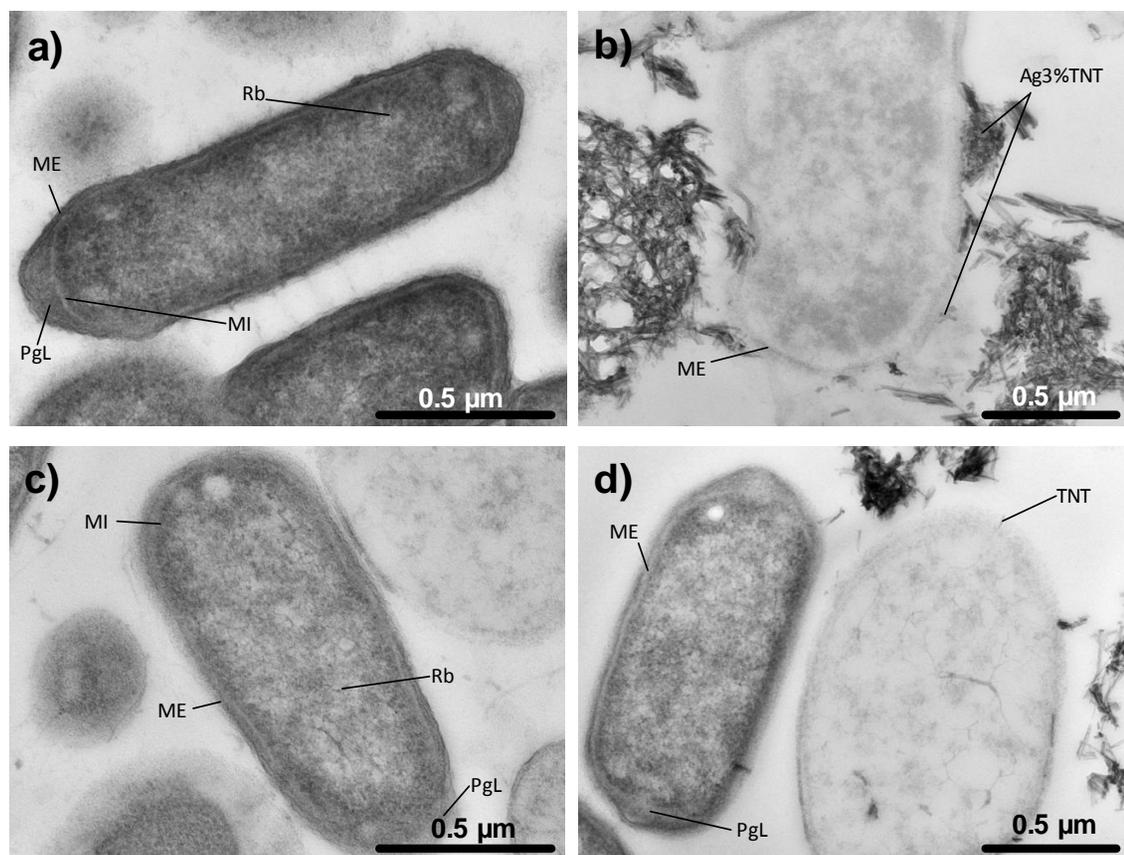
**Figura 3.14.** Evaluación morfológica de *E. coli* después de 45 min con diferentes tratamientos por MEB, A) control, B) Ag3%TNT luz, C) Ag3%TNT en condiciones de oscuridad y D) TNT.

Para continuar con la caracterización de la morfología, las células se observaron mediante microscopía electrónica de transmisión. El control sin tratamiento de *E. coli* muestra células con forma de bastones rectos, una membrana externa y una membrana externa bien definida seguidas de una capa de peptidoglicano limitada por una membrana interna y se pueden observar los ribosomas en el interior y el ADN (Figura 3.15a). En cambio, en presencia de Ag3%TNT, la bacteria aumentó en tamaño, la parte central del citoplasma disminuyó en densidad y hay poco ADN (Figura 3.15b).

Además, pocos cuerpos de inclusión se reorganizaron cerca de la membrana citoplasmática. La membrana externa perdió la forma del bastón y muestra vesículas. Algunas partes están totalmente alteradas. También la capa de peptidoglicano se hizo más ancha. Las células expuestas a Ag3%TNT en

ausencia de luz presentaron menor daño y se observa que muchas células muestran una morfología normal mientras que otras muestran daño (Figura 3.15c). Las células presentan daño ya que perdieron la integridad de la membrana externa de la célula y muestran un citoplasma vacío como con las células fotoactivadas (Figura 3.15d).

Células de *E. coli* expuestas a TNT presentaron daño menor, con daños similares a las células expuestas a Ag3%TNT, el citoplasma sufrió una reorganización con pérdida de casi todos los ribosomas y el ADN aparece en la periferia del citoplasma, algunas de las membranas externa se hincharon y en algunos casos presentaron daño más pronunciado. Además las fronteras de la célula se perdieron. La principal diferencia entre la fotoactivación con Ag3%TNT en presencia y ausencia de luz y los TNT es la cantidad de células afectadas. Imágenes similares de MET fueron reportadas [14] con cultivos de *E. coli*, donde las películas estudiadas indujeron modificaciones en la permeabilidad de la membrana, lo que promovió la muerte celular en 24 h.

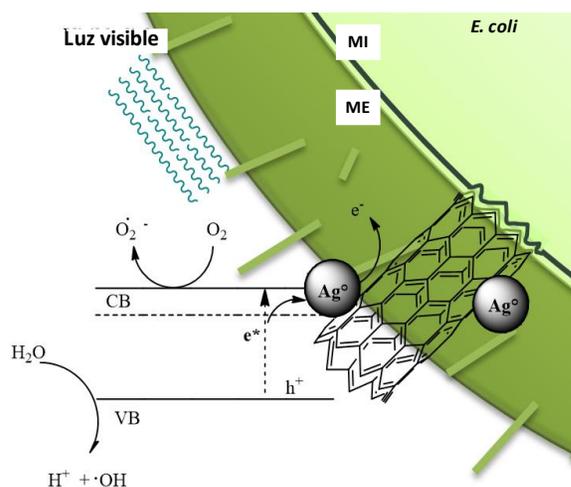


**Figura 3.15.** Evaluación morfológica por MET de *E. coli* después de 45 min, expuestos a diferentes tratamientos, a) control, b) Ag3%TNT, c) Ag3%TNT en condiciones de oscuridad y d) TNT.

Estos datos confirman el efecto sinérgico de los compuestos de titanato de plata sobre *E. coli*: (i) la generación de ERO por las propiedades de fotoactividad del titanato bajo irradiación [23], [24], [98]–[100], generó el daño a todas las células, con el cambio que sufrió la membrana, las células colapsadas y la formación de muchos agregados de células muertas, (Figura 3.15b), (ii) el efecto bactericida de los NPsAg, altamente dispersos en la superficie del titanato que dañaron la integridad de la membrana externa; las condiciones en oscuridad causaron la elongación del tamaño y la pérdida de densidad en la parte central en algunas células (Figura 3.15c), (iii) el efecto morfológico sobre *E. coli* debido a los TNT el daño se produjo a través de la reorganización del citoplasma, donde el centro perdió casi todos los ribosomas y el ADN como un material denso en la

periferia del citoplasma [101]. La morfología aguda de los nanotubos de titanato dañó la pared celular donde la penetración probablemente causó un daño más grave a la membrana externa y la membrana citoplasmática (Figura 3.15d).

La presencia de NPsAg sobre la superficie del nanotubo evita eficazmente la recombinación del par electrón-hueco. Esto permite la absorción de la luz visible al tener interacciones  $\text{Ag}^0$  y  $\text{Ag}^+$ . El comportamiento sinérgico fotocatalítico de los compuestos de  $\text{Ag}/\text{TNT}$  puede beneficiar la inactivación fotocatalítica de *E. coli* principalmente por los huecos y el hidroxilo como los principales radicales reactivos responsables activados por la radiación de luz visible. La funcionalización superficial de los TNT con NPsAg puede crear niveles de energía adicionales entre la banda de conducción y la banda de valencia de  $\text{Ag}/\text{TNT}$ . Esto puede causar un desplazamiento hacia el rojo en el umbral de absorción del borde la banda (Figura 3.16).



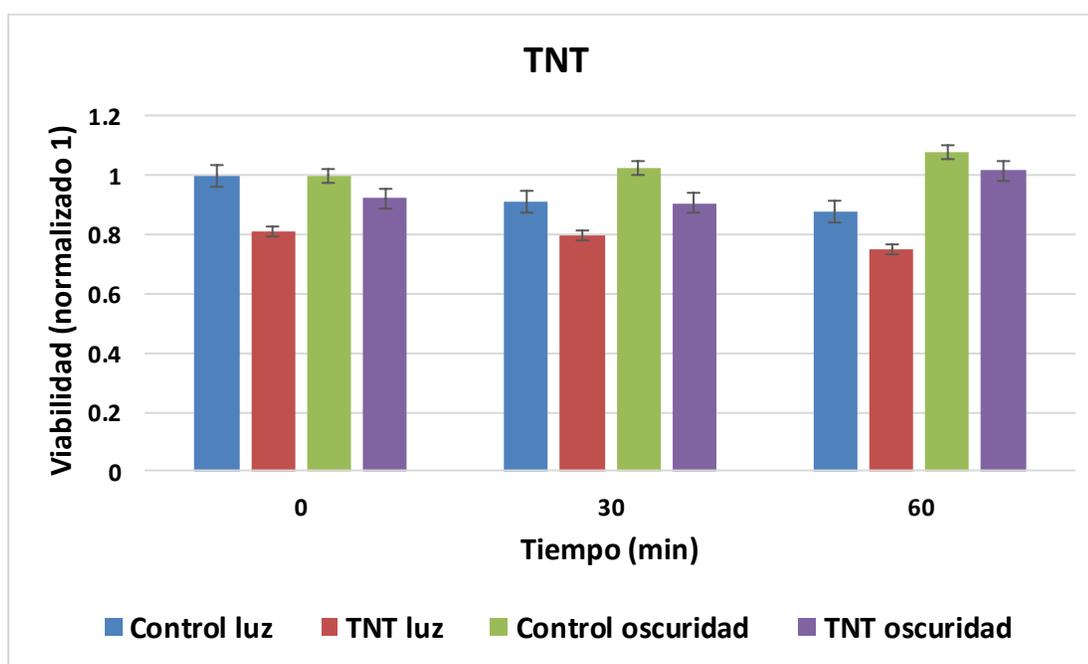
**Figura 3.16.** Representación esquemática de los procesos fotocatalíticos que permiten la inactivación fotocatalítica de *E. coli* por  $\text{Ag}/\text{TNT}$  irradiadas con luz visible: ME: membrana externa, MI: membrana interna, CB: banda de conducción y VB: banda de valencia.

Bajo la irradiación de luz visible los electrones de las NPsAg se excitan y pasan a la BC de las NPsAg mientras que los huecos generados en la BV de estas

pasan a la BV de los TNT. Es por esto que las NPs de metal funcionan como trampas de electrones para facilitar la transferencia a BC de los TNT.

### 3.5.4. Evaluación de actividad antifúngica de $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ XTNT en *C. glabrata*

Para determinar la actividad antifúngica de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ , realizamos pruebas con *C. glabrata* en medio YPD con TNT en presencia y ausencia de luz (Figura 3.17).

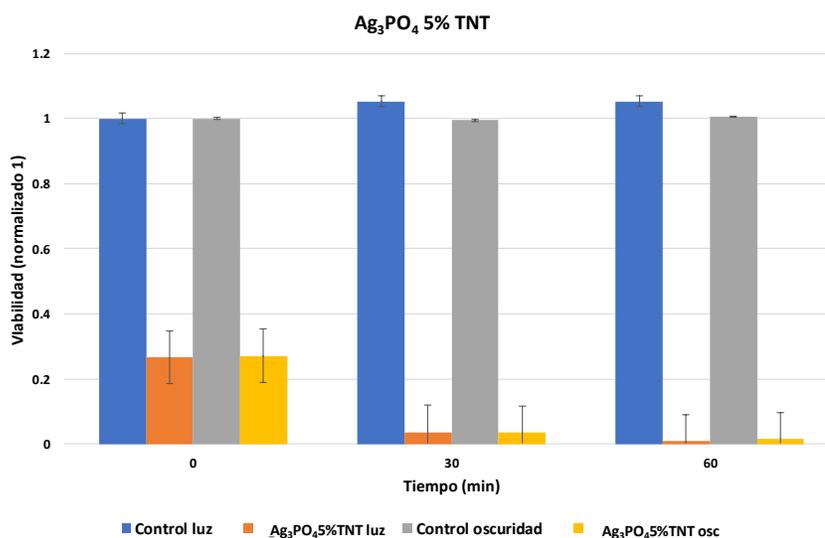


**Figura 3.17.** Gráfica de viabilidad normalizado a 1 donde 1 es igual a  $2 \times 10^7$  cel/mL de actividad antimicrobiana de TNT sobre *C. glabrata*

Este experimento se realizó para comprobar la actividad antimicrobiana de los TNT sin modificar. Los resultados indican que no hubo efecto antifúngico con los TNT con *C. glabrata*. Sin embargo, hay una ligera reducción en la viabilidad en presencia de TNT con luz (Figura 3.17).

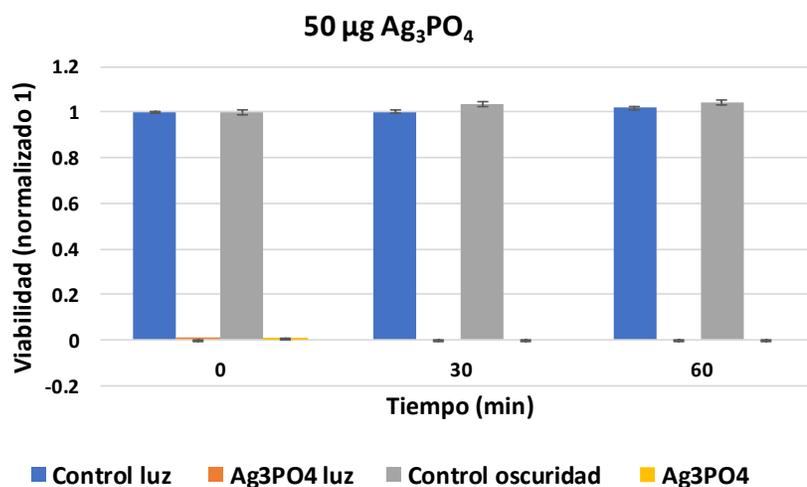
Posteriormente se realizaron las pruebas de sensibilidad con los TNT funcionalizados al 5% de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ . Se realizaron las pruebas de sensibilidad con

los TNT funcionalizados al 5% con  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ , se eligió este catalizador debido a que contiene menor cantidad de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  utilizada para inhibir el crecimiento de *Botrytis cinérea* [95], ya que hasta el día de hoy no hay reportes sobre la inhibición *C. glabrata* con  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ .



**Figura 3.18.** Gráfica de viabilidad normalizado a 1 donde 1 es igual a  $2 \times 10^7$  UFC/mL, de *C. glabrata* expuesta a  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  5% TNT con y sin irradiación.

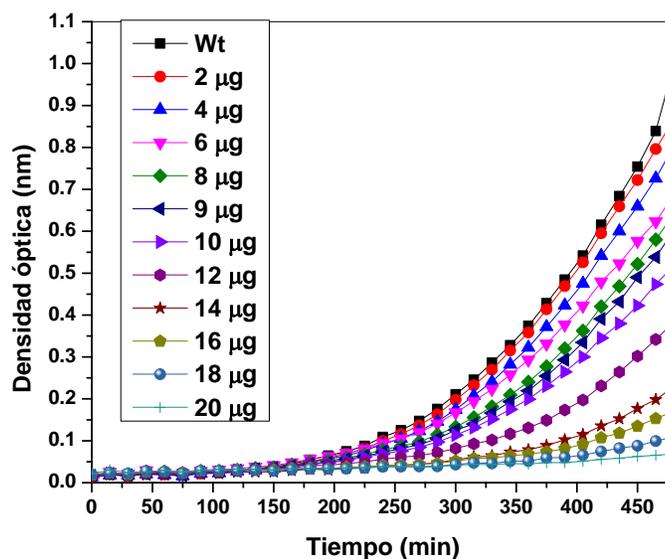
Desde los primeros 30 min hay pérdida de la viabilidad de *C. glabrata* con el fotocatalizador  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  5% TNT en presencia y ausencia de luz. Para determinar si la actividad de este material se debe únicamente al  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  se analizó la misma cantidad de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  que contiene el  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  5% TNT que se utilizó en el experimento anterior (1 mg), que es igual a 50  $\mu\text{g}$  de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  (Figura 3.19).



**Figura 3.19.** Gráfica de viabilidad normalizado a 1 donde 1 es igual a  $2 \times 10^7$  células/mL, de *C. glabrata* expuesta a  $50 \mu\text{g}$  de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  con y sin irradiación.

Los datos muestran que la pérdida de viabilidad se debe al  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  en presencia y ausencia de luz (Figura 3.19).

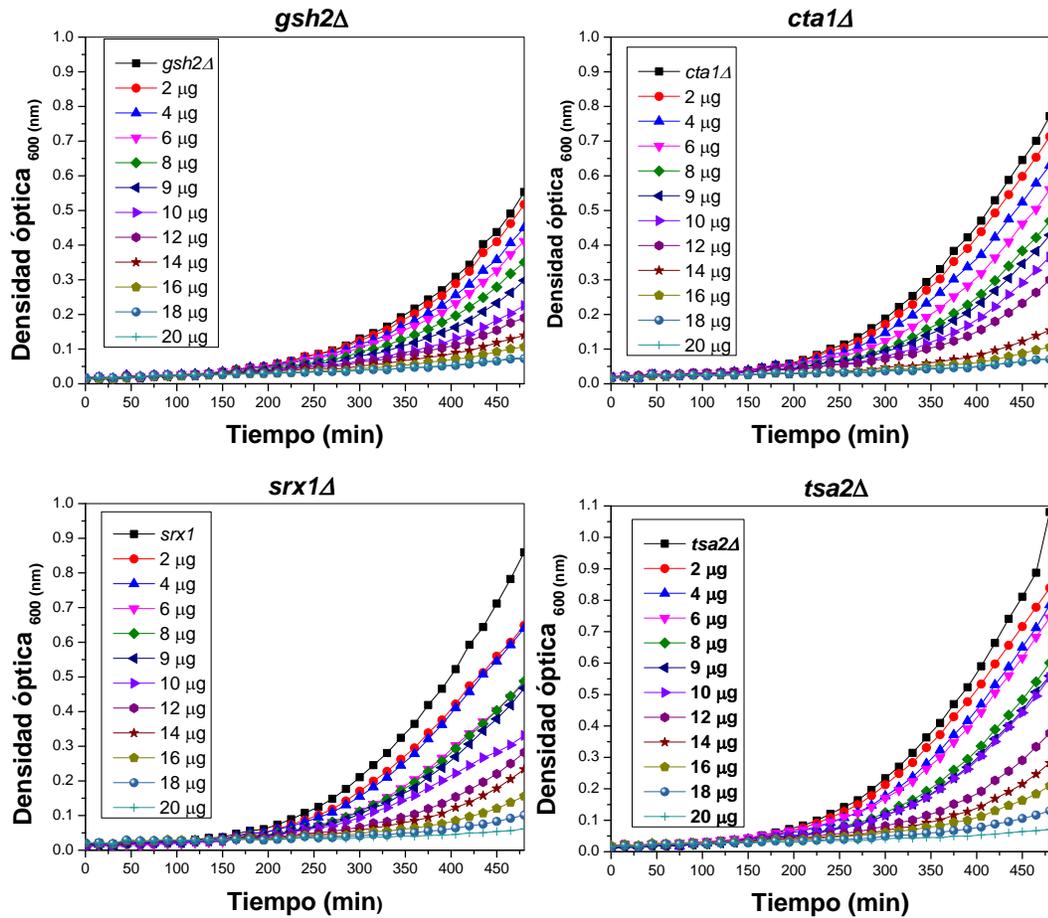
Con base en estos resultados se procedió a buscar la concentración media inhibitoria (MIC50) de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ . El experimento se realizó en oscuridad.



**Figura 3.20.** Gráfica de crecimiento de *C. glabrata* a diferentes concentraciones de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  a 1 densidad óptica de 600 nm.

Los resultados indican que la concentración media inhibitoria para *C. glabrata* fue de  $10.04 \mu\text{g/mL}$ . Esto muestra que con dicha concentración de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  se inhibe el crecimiento al 50% de la población durante 10 horas de exposición (Figura 3.20).

Estos datos indican que el  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  presenta actividad antifúngica en *C. glabrata* con una concentración de  $20 \mu\text{g/mL}$ . El  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  previamente se ha reportado como un agente generador de estrés oxidante [95],[102] por lo que decidimos analizar la respuesta en cepas mutantes de *C. glabrata* en genes que codifican para enzimas de la respuesta a estrés oxidante como: mutante nula en catalasa (*cta1Δ*), mutante nula en sulfiredoxina (*srx1Δ*), mutante nula en tiroredoxina peroxidasa (*tsa2Δ*) y mutante nula glutatión sintetasa (*gsh2Δ*) (Figura 3.21). Donde la cepa *gsh2Δ* es más sensible a la presencia de metales.



**Figura 3.21.** Gráfica de densidad óptica a 600 nm donde 1 D.O es igual a  $2 \times 10^7$  UFC/mL de se muestras diferentes cepas mutantes de *C. glabrata*, expuestas a diferentes concentraciones de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  para obtener el MIC50.

El MIC50 de las cepas de *C. glabrata* mutantes se muestra en la Tabla 3.5.

**Tabla 3.5.** Concentración media inhibitoria de las diferentes cepas mutantes de *C. glabrata*.

Cepa	MIC50 ( $\mu\text{g}$ )
Wt	10.04
<i>tsa2</i> $\Delta$	10.01
<i>srx1</i> $\Delta$	9.782
<i>cta1</i> $\Delta$	9.218
<i>gsh2</i> $\Delta$	8.942

De acuerdo a la Tabla 3.5, podemos observar que la MIC50 de las cepas mutantes y la silvestre (Wt) son muy similares. Sin embargo, la cepa mostro mayor sensibilidad a  $Ag_3PO_4$ . Fue la cepa *gsh2Δ* con un MIC50 de 8.942  $\mu g/mL$ .

## IV. CONCLUSIONES

El método hidrotermal asistido por microondas generó nanotubos de titanato de hidrógeno en 6 horas a 150 °C. La metodología empleada es económica, requiere de menor gasto energético y el tiempo de síntesis es más corto en comparación con lo reportado en la literatura.

Los nanotubos sintetizados fueron de 4 capas, con un diámetro de 10 nm. El área superficial para los TNT funcionalizados con NPsAg fue de 266.209 m<sup>2</sup>/g mientras que los TNT funcionalizados con Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> fue de 215.148 m<sup>2</sup>/g. Por último, el Eg para los dos TNT estuvo en un rango de 3.3 a 3.19 eV.

La degradación de 10 ppm de eosina amarillenta bajo radiación visible se logró en 3 horas alcanzando un porcentaje de degradación del 89% con el catalizador Ag1%TNT mientras que con el Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>5%TNT se encontró que degrada el colorante a 88% en 3 horas. La mejora de la fotoactividad de los TNT al funcionalizarlos con NPsAg y Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> es debida a la reducción de la recombinación el par hueco- electrón.

De acuerdo con las pruebas realizadas con Ag1%TNT, Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>5%TNT y los sacrificantes DMSO, EDTA y nBA, podemos decir que los materiales son más sensible a OH y h<sup>+</sup>.

Se logró inhibir el crecimiento de *E. coli* en 1 hora, con el uso de Ag3%TNT en presencia de luz visible. Mediante las microscopías MEB y MET y usando protocolos de preparación reproducibles se determinó que la generación fotoasitida de especies reactivas de oxígeno además de un daño a la membrana externa de *E. coli* son los causantes de la inhbiición.

Las características de las particulas Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> no permitieron una funcionalización análoga a la NPsAg sobre la superficie de los TNT, sin embargo, si se logró fotodepositar nanopartículas de Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> que mostraron actividad fotocatalítica.

Los TNT no presentaron actividad antifúngica en presencia ni ausencia de luz con *C. glabrata*. Esto podría deberse a que *C. glabrata* presenta resistencia a los TNT. El  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  presentó actividad antifúngica con *C. glabrata*. Además, el MIC50 de este material para las cepas mutantes como para la silvestre fue entre 10 y 9  $\mu\text{g}$ .

## Perspectivas

- Evaluar las propiedades de AgXTNT como agentes oxidantes en *C. glabrata* y en las diferentes cepas mutantes.
- Evaluar la actividad antimicrobiana del  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  en *Escherichia coli*.
- Evaluar mecanismo antifúngico de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  en *C. glabrata* por microscopia electrónica de barrido y de transmisión.
- Establecer una metodología de síntesis para obtener fosfato de plata en tamaño manométrico.
- Establecer una metodología para el depósito de nanopartículas de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  sobre los TNT.
- Establecer una metodología de síntesis para obtener fosfato de plata en tamaño manométrico, menor a 50 nm.

---

## REFERENCIAS

- [1] A. Markowska-Szczupak, K. Ulfig, and A. W. Morawski, "The application of titanium dioxide for deactivation of bioparticulates: An overview," *Catal. Today*, vol. 169, no. 1, pp. 249–257, 2011.
- [2] W. H. Belloso, "Historia de los antibióticos," *Rev. Hosp. Ital. Buenos Aires*, vol. 29, no. 2, pp. 102–111, 2009.
- [3] J. B. Kaper, J. P. Nataro, and H. L. T. Mobley, "Pathogenic *Escherichia coli*," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 2, no. 2, pp. 123–140, 2004.
- [4] A. Maule, "Survival of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 in soil, water and on surfaces.," *Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.*, vol. 88, no. 29, p. 71S–78S, 2000.
- [5] E. B. Solomon, S. Yaron, and K. R. Matthews, "Transmission of *Escherichia coli* O157 : H7 from Contaminated Manure and Irrigation Water to Lettuce Plant Tissue and Its Subsequent Internalization Transmission of *Escherichia coli* O157 : H7 from Contaminated Manure and Irrigation Water to Lettuce Plant T," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 68, no. 1, pp. 5–9, 2002.
- [6] N. Musee, M. Thwala, and N. Nota, "The antibacterial effects of engineered nanomaterials: implications for wastewater treatment plants," *J. Environ. Monit.*, vol. 13, no. 5, p. 1164, 2011.
- [7] T. Tong *et al.*, "Effects of Material Morphology on the Phototoxicity of Nano-TiO<sub>2</sub> to Bacteria," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 47, no. 21, pp. 12486–12495, 2013.
- [8] S. Amarnath, M. A. Hussain, V. Nanjundiah, and A. K. Sood, "Beta-Galactosidase Leakage from *Escherichia coli* Points to Mechanical Damages Likely Cause of Carbon Nanotube Toxicity," *Soft Nanosci. Lett.*, vol. 2012, no. July, pp. 1–5, 2012.
- [9] S. Thabet, F. Simonet, M. Lemaire, C. Guillard, and P. Cotton, "Impact of photocatalysis on fungal cells: Depiction of cellular and molecular effects on *Saccharomyces cerevisiae*," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 80, no. 24, pp. 7527–7535, 2014.
- [10] H. Yu, G. Cao, F. Chen, X. Wang, J. Yu, and M. Lei, "Enhanced photocatalytic performance of Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> by simultaneous loading of Ag nanoparticles and Fe(III) cocatalyst," *Appl. Catal. B Environ.*, vol. 160–161, no. 1, pp. 658–665, 2014.
- [11] J. Lee and Kaletunc, Gonul, "Evaluation of the Heat Inactivation of *Escherichia coli* and *Lactobacillus plantarum* by Differential Scanning Calorimetry," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 68, no. 11, pp. 5379–5386, 2002.
- [12] O. Akhavan, M. Abdolhad, Y. Abdi, and S. Mohajerzadeh, "Silver nanoparticles within vertically aligned multi-wall carbon nanotubes with open tips for antibacterial purposes," *J. Mater. Chem.*, vol. 21, no. 2, pp. 387–393, 2011.
- [13] K. Ninomiya, M. Arakawa, C. Ogino, and N. Shimizu, "Inactivation of *Escherichia coli* by sonoelectrocatalytic disinfection using TiO<sub>2</sub> as electrode," *Ultrason. Sonochem.*, vol. 20, no. 2, pp. 762–767, 2013.

- [14] C. Văcăroiu *et al.*, "The effect of thermal treatment on antibacterial properties of nanostructured TiO<sub>2</sub>(N) films illuminated with visible light," *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 25, no. 1, pp. 27–31, 2009.
- [15] F. Hossain, O. J. Perales-Perez, S. Hwang, and F. Román, "Antimicrobial nanomaterials as water disinfectant: Applications, limitations and future perspectives," *Sci. Total Environ.*, vol. 466–467, pp. 1047–1059, 2014.
- [16] L. Zhao *et al.*, "Antibacterial nano-structured titania coating incorporated with silver nanoparticles," *Biomaterials*, vol. 32, no. 24, pp. 5706–5716, 2011.
- [17] V. Rodríguez-González, S. O. Alfaro, L. M. Torres-Martínez, S. H. Cho, and S. W. Lee, "Silver-TiO<sub>2</sub> nanocomposites: Synthesis and harmful algae bloom UV-photoelimination," *Appl. Catal. B Environ.*, vol. 98, no. 3–4, pp. 229–234, 2010.
- [18] Q. Li *et al.*, "Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications," *Water Res.*, vol. 42, no. 18, pp. 4591–4602, 2008.
- [19] Y. Zhang *et al.*, "Titanate and titania nanostructured materials for environmental and energy applications: a review," *RSC Adv.*, vol. 5, no. 97, pp. 79479–79510, 2015.
- [20] N. Liu, X. Chen, J. Zhang, and J. W. Schwank, "A review on TiO<sub>2</sub>-based nanotubes synthesized via hydrothermal method: Formation mechanism, structure modification, and photocatalytic applications," *Catal. Today*, vol. 225, pp. 34–51, 2014.
- [21] R. B. Sadu, D. H. Chen, A. S. Kucknoor, Z. Guo, and A. J. Gomes, "Silver-Doped TiO<sub>2</sub>/Polyurethane Nanocomposites for Antibacterial Textile Coating," *Bionanoscience*, vol. 4, no. 2, pp. 136–148, 2014.
- [22] V. Rodríguez-González, S. Obregón-Alfaro, L. M. Lozano-Sánchez, and S. W. Lee, "Rapid microwave-assisted synthesis of one-dimensional silver-H<sub>2</sub>Ti<sub>3</sub>O<sub>7</sub> nanotubes," *J. Mol. Catal. A Chem.*, vol. 353–354, pp. 163–170, 2012.
- [23] S. Zhang *et al.*, "Nanocrystal Cu<sub>2</sub>O-loaded TiO<sub>2</sub> nanotube array films as high-performance visible-light bactericidal photocatalyst," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 96, no. 5, pp. 1201–1207, 2012.
- [24] F. J. Zhang, M. L. Chen, and W. C. Oh, "Photoelectrocatalytic properties and bactericidal activities of silver-treated carbon nanotube/titania composites," *Compos. Sci. Technol.*, vol. 71, no. 5, pp. 658–665, 2011.
- [25] Y. Wang *et al.*, "Enhanced photocatalytic bacteriostatic activity towards: Escherichia coli using 3D hierarchical microsphere BiOI/BiOBr under visible light irradiation," *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 15, no. 5, pp. 666–672, 2016.
- [26] H. Zhang, G. Chen, and D. W. Bahnemann, "Photoelectrocatalytic materials for environmental applications," *J. Mater. Chem.*, vol. 19, no. 29, p. 5089, 2009.
- [27] P. L. F. Jr, J. A. Vazquez, J. D. Sobel, and P. L. Fidel, "*Candida glabrata*: Review of Epidemiology , Pathogenesis , and Clinical Disease with Comparison to *C . albicans* *Candida glabrata*: Review of Epidemiology , Pathogenesis , and Clinical Disease with

- Comparison to *C. albicans*,” vol. 12, no. 1, pp. 80–96, 1999.
- [28] J. M. Torres-Rodríguez, “*Candida glabrata*: UN PATÓGENO EMERGENTE,” *Control Calid. SEMC*, pp. 1–7, 1923.
- [29] W. E. Trick, S. K. Fridkin, J. R. Edwards, R. A. Hajjeh, and R. P. Gaynes, “Secular Trend of Hospital- Acquired Candidemia among Intensive Care Unit Patients in the United States during 1989–1999,” *Clin. Infect. Dis.*, vol. 35, no. 5, pp. 627–630, 2002.
- [30] M. A. Pfaller and D. J. Diekema, “Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem,” *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 20, no. 1, pp. 133–163, 2007.
- [31] D. W. Warnock, J. Burke, N. J. Cope, E. M. Johnson, N. a von Fraunhofer, and E. W. Williams, “Fluconazole resistance in *Candida glabrata*,” *Lancet*, vol. 2, no. 8623, p. 1310, 1988.
- [32] S. Singh, H. Mahalingam, and P. K. Singh, “Polymer-supported titanium dioxide photocatalysts for environmental remediation: A review,” *Appl. Catal. A Gen.*, vol. 462–463, pp. 178–195, 2013.
- [33] C. Moseke, F. Hage, E. Vorndran, and U. Gbureck, “TiO<sub>2</sub> nanotube arrays deposited on Ti substrate by anodic oxidation and their potential as a long-term drug delivery system for antimicrobial agents,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 258, no. 14, pp. 5399–5404, 2012.
- [34] A. Ibhaddon and P. Fitzpatrick, “Heterogeneous Photocatalysis: Recent Advances and Applications,” *Catalysts*, vol. 3, no. 1, pp. 189–218, 2013.
- [35] M. Cantarella, R. Sanz, M. A. Buccheri, L. Romano, and V. Privitera, “PMMA/TiO<sub>2</sub> nanotubes composites for photocatalytic removal of organic compounds and bacteria from water,” *Mater. Sci. Semicond. Process.*, vol. 42, pp. 58–61, 2016.
- [36] V. Ravishankar Rai and a. Jamuna Bai, “Nanoparticles and their potential application as antimicrobials,” *Formatex*, pp. 197–209, 2011.
- [37] H. Zhang, L. Cao, W. Liu, and G. Su, “Applied Surface Science A new ion exchange behavior of protonated titanate nanotubes after deprotonation and the study on their morphology and optical properties,” vol. 259, pp. 610–615, 2012.
- [38] H. H. Ou and S. L. Lo, “Review of titania nanotubes synthesized via the hydrothermal treatment: Fabrication, modification, and application,” *Sep. Purif. Technol.*, vol. 58, no. 1, pp. 179–191, 2007.
- [39] J. Podporska-Carroll, E. Panaitescu, B. Quilty, L. Wang, L. Menon, and S. C. Pillai, “Antimicrobial properties of highly efficient photocatalytic TiO<sub>2</sub>nanotubes,” *Appl. Catal. B Environ.*, vol. 176–177, pp. 70–75, 2015.
- [40] D. V. Bavykin, J. M. Friedrich, and F. C. Walsh, “Protonated titanates and TiO<sub>2</sub> nanostructured materials: Synthesis, properties, and applications,” *Adv. Mater.*, vol. 18, no. 21, pp. 2807–2824, 2006.
- [41] S. Lincic, P. Christopher, and D. B. Ingram, “Plasmonic-metal nanostructures for efficient conversion of solar to chemical energy,” *Nat. Mater.*, vol. 10, no. 12, pp. 911–921, 2011.

- [42] M. Sökmen, D. W. Allen, F. Akkaş, N. Kartal, and F. Acar, "Photo-degradation of some dyes using Ag-loaded titaniumdioxide," *Water. Air. Soil Pollut.*, vol. 132, no. 1–2, pp. 153–163, 2001.
- [43] Y. G. Adewu-Yi, "Sonochemistry in environmental remediation. 2. Heterogeneous sonophotocatalytic oxidation processes for the treatment of pollutants in water," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 39, no. 22, pp. 8557–8570, 2005.
- [44] A. Wold, "Photocatalytic properties of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>)," *Chem. Mater.*, vol. 5, no. 3, pp. 280–283, 1993.
- [45] D. J. Martin *et al.*, "Efficient visible driven photocatalyst, silver phosphate: performance, understanding and perspective," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 44, no. 21, pp. 7808–7828, 2015.
- [46] P. V. Kamat, "Photochemistry on Nonreactive and Reactive (Semiconductor) Surfaces," *Chem. Rev.*, vol. 93, no. 1, pp. 267–300, 1993.
- [47] A. Mills and S. Le Hunte, "An overview of semiconductor photocatalysis," *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 108, no. 1, pp. 1–35, 1997.
- [48] C. C. Tsai, J. N. Nian, and H. Teng, "Mesoporous nanotube aggregates obtained from hydrothermally treating TiO<sub>2</sub> with NaOH," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 253, no. 4, pp. 1898–1902, 2006.
- [49] A. Activity, S. Yadav, and G. Jaiswar, "Review on Undoped/Doped TiO<sub>2</sub> Nanomaterial; Synthesis and Photocatalytic and Antimicrobial Activity Shweta Yadav," pp. 1–14, 2016.
- [50] C. L. Wong, Y. N. Tan, and A. R. Mohamed, "A review on the formation of titania nanotube photocatalysts by hydrothermal treatment," *J. Environ. Manage.*, vol. 92, no. 7, pp. 1669–1680, 2011.
- [51] C. C. Tsai and H. Teng, "Structural features of nanotubes synthesized from NaOH treatment on TiO<sub>2</sub> with different post-treatments," *Chem. Mater.*, vol. 18, no. 2, pp. 367–373, 2006.
- [52] L. B. Arruda, C. M. Santos, M. O. Orlandi, W. H. Schreiner, and P. N. Lisboa-Filho, "Formation and evolution of TiO<sub>2</sub> nanotubes in alkaline synthesis," *Ceram. Int.*, vol. 41, no. 2, pp. 2884–2891, 2015.
- [53] T. Kasuga, "Formation of titanium oxide nanotubes using chemical treatments and their characteristic properties," *Thin Solid Films*, vol. 496, no. 1, pp. 141–145, 2006.
- [54] G. H. Du, Q. Chen, R. C. Che, Z. Y. Yuan, and L. M. Peng, "Preparation and structure analysis of titanium oxide nanotubes," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 79, no. 22, pp. 3702–3704, 2001.
- [55] X. Chen and S. S. Mao, "Titanium dioxide nanomaterials: Synthesis, properties, modifications and applications," *Chem. Rev.*, vol. 107, no. 7, pp. 2891–2959, 2007.
- [56] T. Kasuga, M. Hiramatsu, A. Hoson, T. Sekino, and K. Niihara, "Formation of Titanium Oxide Nanotube," *Langmuir*, vol. 14, no. 12, pp. 3160–3163, 1998.
- [57] D. V. Bavykin, V. N. Parmon, A. A. Lapkin, and F. C. Walsh, "The effect of hydrothermal conditions on the mesoporous structure of TiO<sub>2</sub> nanotubes," *J. Mater. Chem.*, vol. 14, no. 22,

- p. 3370, 2004.
- [58] H. Search, C. Journals, A. Contact, M. Iopscience, and I. P. Address, "Formation of crystallized titania nanotubes and their transformation into nanowires," vol. 1935, pp. 9–15, 1935.
- [59] J. C. Colmenares, R. Luque, J. M. Campelo, F. Colmenares, Z. Karpiński, and A. A. Romero, "Nanostructured photocatalysts and their applications in the photocatalytic transformation of lignocellulosic biomass: An overview," *Materials (Basel)*, vol. 2, no. 4, pp. 2228–2258, 2009.
- [60] L. Sun *et al.*, "Ultrasound aided photochemical synthesis of Ag loaded TiO<sub>2</sub> nanotube arrays to enhance photocatalytic activity," *J. Hazard. Mater.*, vol. 171, no. 1–3, pp. 1045–1050, 2009.
- [61] E. Albitar, M. A. Valenzuela, S. Alfaro, G. Valverde-Aguilar, and F. M. Martínez-Pallares, "Photocatalytic deposition of Ag nanoparticles on TiO<sub>2</sub>: Metal precursor effect on the structural and photoactivity properties," *J. Saudi Chem. Soc.*, vol. 19, no. 5, pp. 563–573, 2015.
- [62] H. M. Sung-Suh, J. R. Choi, H. J. Hah, S. M. Koo, and Y. C. Bae, "Comparison of Ag deposition effects on the photocatalytic activity of nanoparticulate TiO<sub>2</sub> under visible and UV light irradiation," *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 163, no. 1–2, pp. 37–44, 2004.
- [63] R. Dagherir, P. Drogui, and D. Robert, "Modified TiO<sub>2</sub> For Environmental Photocatalytic Applications: A Review," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 52, no. 10, pp. 3581–3599, 2013.
- [64] B. Ohtani, K. Iwai, S. Nishimoto, and S. Sato, "Role of Platinum Deposits on Titanium ( IV ) Oxide Particles : Structural and Kinetic Analyses of Photocatalytic Reaction in Aqueous Alcohol and Amino Acid Solutions," *Society*, vol. 101, no. Iv, pp. 3349–3359, 1997.
- [65] M. Hoseinnejad, S. M. Jafari, and I. Katouzian, "Inorganic and metal nanoparticles and their antimicrobial activity in food packaging applications," *Crit. Rev. Microbiol.*, vol. 44, no. 2, pp. 161–181, 2018.
- [66] F. Han, V. S. R. Kambala, M. Srinivasan, D. Rajarathnam, and R. Naidu, "Tailored titanium dioxide photocatalysts for the degradation of organic dyes in wastewater treatment: A review," *Appl. Catal. A Gen.*, vol. 359, no. 1–2, pp. 25–40, 2009.
- [67] Y. Mo, F. Chen, Y. Yang, J. Song, Q. Xu, and Y. Xu, "Fabrication and photocatalytic activity of Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-TiO<sub>2</sub> heterostructural nanotube arrays," *J. Wuhan Univ. Technol. Sci. Ed.*, vol. 31, no. 2, pp. 236–241, 2016.
- [68] Y. Bessekhoud, D. Robert, and J. V. Weber, "Bi<sub>2</sub>S<sub>3</sub>/TiO<sub>2</sub> and CdS/TiO<sub>2</sub> heterojunctions as an available configuration for photocatalytic degradation of organic pollutant," *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 163, no. 3, pp. 569–580, 2004.
- [69] D. Chudobova *et al.*, "Complexes of silver(I) ions and silver phosphate nanoparticles with hyaluronic acid and/or chitosan as promising antimicrobial agents for vascular grafts," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 7, pp. 13592–13614, 2013.

- [70] "New York Science Journal 2013;6(12) <http://www.sciencepub.net/newyork> Phytotoxicity of silver nanoparticles on," vol. 6, no. 12, pp. 148–156, 2013.
- [71] X. Hou *et al.*, "Synthesis of Ag ion-implanted TiO<sub>2</sub> thin films for antibacterial application and photocatalytic performance," *J. Hazard. Mater.*, vol. 299, pp. 59–66, 2015.
- [72] Q. L. Feng, J. Wu, G. Q. Chen, F. Z. Cui, T. N. Kim, and J. O. Kim, "A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 52, no. 4, pp. 662–668, 2000.
- [73] J. J. Buckley, A. F. Lee, L. Olivi, and K. Wilson, "Hydroxyapatite supported antibacterial Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> nanoparticles," *J. Mater. Chem.*, vol. 20, no. 37, p. 8056, 2010.
- [74] S. M. Fox, C. L., and Modak, "Mechanism of Silver Sulfadiazine Action on Burn Wound Infections Mechanism of Silver Sulfadiazine Action on Burn Wound Infections," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 5 (6), no. 6, pp. 582–588, 1974.
- [75] M. Rai, A. Yadav, and A. Gade, "Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials," *Biotechnol. Adv.*, vol. 27, no. 1, pp. 76–83, 2009.
- [76] V. K. Sharma, R. A. Yngard, and Y. Lin, "Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 145, no. 1–2, pp. 83–96, 2009.
- [77] M. Y. Lan, C. P. Liu, H. H. Huang, and S. W. Lee, "Both Enhanced Biocompatibility and Antibacterial Activity in Ag-Decorated TiO<sub>2</sub> Nanotubes," *PLoS One*, vol. 8, no. 10, pp. 4–11, 2013.
- [78] Z. Yi *et al.*, "An orthophosphate semiconductor with photooxidation properties under visible-light irradiation," *Nat. Mater.*, vol. 9, no. 7, pp. 559–564, 2010.
- [79] O. Monfort, E. Dworniczek, and G. Plesch, "Photocatalytic and Antimicrobial Properties of Silver Phosphate, Hydroxyapatite and Their Composites," pp. 177–192, 2016.
- [80] Y. Bi, H. Hu, S. Ouyang, G. Lu, J. Cao, and J. Ye, "Photocatalytic and photoelectric properties of cubic Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> sub-microcrystals with sharp corners and edges," *Chem. Commun.*, vol. 48, no. 31, p. 3748, 2012.
- [81] K. Baďurová, O. Monfort, L. Satrapinsky, E. Dworniczek, G. Gościński, and G. Plesch, "Photocatalytic activity of Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> and some of its composites under non-filtered and UV-filtered solar-like radiation," *Ceram. Int.*, vol. 43, no. 4, pp. 3706–3712, 2017.
- [82] M. Sakamoto, M. Fujistuka, and T. Majima, "Light as a construction tool of metal nanoparticles: Synthesis and mechanism," *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.*, vol. 10, no. 1, pp. 33–56, 2009.
- [83] J. M. Campelo, D. Luna, R. Luque, J. M. Marinas, and A. A. Romero, "Sustainable preparation of supported metal nanoparticles and their applications in catalysis," *ChemSusChem*, vol. 2, no. 1, pp. 18–45, 2009.
- [84] H. Hada, Y. Yonezawa, A. Yoshida, and A. Kurakake, "Photoreduction of silver ion in aqueous and alcoholic solutions," *J. Phys. Chem.*, vol. 80, no. 25, pp. 2728–2731, 1976.
- [85] Universidad Nacional de la Plata, "Técnicas de Caracterización. Conceptos Generales.

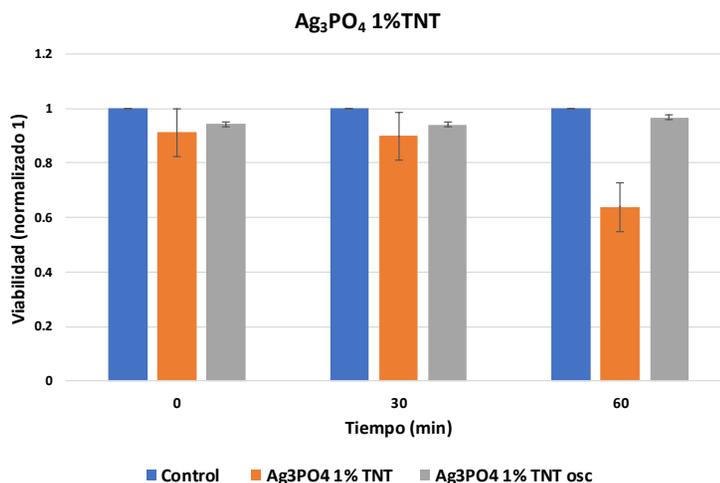
- Capítulo IV,” *Sedici*, pp. 1–21, 2012.
- [86] F. Zaera and Z. Ma, *Characterization of Heterogeneous Catalysts*, no. December 2014. 2006.
- [87] J. T. Seil and T. J. Webster, “Antimicrobial applications of nanotechnology: Methods and literature,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 7, pp. 2767–2781, 2012.
- [88] A. Camacho, M. Giles, A. Ortegón, M. Palao, B. Serrano, and O. Velázquez, “Cuenta en placa de bacterias,” *Técnicas para el Análisis Microbiológico Aliment.*, pp. 1–10, 2009.
- [89] T. T.-T. and T. H., “Structural features of nanotubes synthesized from NaOH treatment on TiO<sub>2</sub> with different post-treatmentss,” *Chem. Mater.*, vol. 18, no. 4, pp. 367–373, 2006.
- [90] V. C. Ferreira, M. R. Nunes, A. J. Silvestre, and O. C. Monteiro, “Synthesis and properties of Co-doped titanate nanotubes and their optical sensitization with methylene blue,” *Mater. Chem. Phys.*, vol. 142, no. 1, pp. 355–362, 2013.
- [91] H. K. Seo *et al.*, “A study on the structure/phase transformation of titanate nanotubes synthesized at various hydrothermal temperatures,” *Sol. Energy Mater. Sol. Cells*, vol. 92, no. 11, pp. 1533–1539, 2008.
- [92] S. Raza *et al.*, “Blueshift of the surface plasmon resonance in silver nanoparticles studied with EELS,” *Nanophotonics*, vol. 2, no. 2, pp. 131–138, 2013.
- [93] P. He, M. Zhang, D. Yang, and J. Yang, “Preparation of Au-loaded TiO<sub>2</sub> by photochemical deposition and ozone photocatalytic decomposition,” *Surf. Rev. Lett.*, vol. 13, no. 1, pp. 51–55, 2006.
- [94] W. Yao, B. Zhang, C. Huang, C. Ma, X. Song, and Q. Xu, “Synthesis and characterization of high efficiency and stable Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> visible light photocatalyst for the degradation of methylene blue and rhodamine B solutions,” *J. Mater. Chem.*, vol. 22, no. 9, p. 4050, 2012.
- [95] A. Po, “INORGANIC CHEMISTRY FRONTIERS Integrated nanotechnology for synergism and degradation of fungicide SOPP using micro / nano-,” *Inorg. Chem. Front.*, 2016.
- [96] N. K. Eswar, P. C. Ramamurthy, and G. Madras, “Novel synergistic photocatalytic degradation of antibiotics and bacteria using V–N doped TiO<sub>2</sub> under visible light: the state of nitrogen in V-doped TiO<sub>2</sub>,” *New J. Chem.*, vol. 40, no. 4, pp. 3464–3475, 2016.
- [97] N. K. Eswar, P. C. Ramamurthy, and G. Madras, “High photoconductive combustion synthesized TiO<sub>2</sub> derived nanobelts for photocatalytic water purification under solar irradiation,” *New J. Chem.*, vol. 39, no. 8, pp. 6040–6051, 2015.
- [98] K. Cendrowski *et al.*, “Antibacterial performance of nanocrystallined titania confined in mesoporous silica nanotubes,” *Biomed. Microdevices*, vol. 16, no. 3, pp. 449–458, 2014.
- [99] Q. Kang *et al.*, “A ternary hybrid CdS/Pt-TiO<sub>2</sub> nanotube structure for photoelectrocatalytic bactericidal effects on Escherichia Coli,” *Biomaterials*, vol. 31, no. 12, pp. 3317–3326, 2010.
- [100] S. L. Warnes, V. Caves, and C. W. Keevil, “Mechanism of copper surface toxicity in *Escherichia coli* O157:H<sub>7</sub> and *Salmonella* involves immediate membrane depolarization followed by slower rate of DNA destruction which differs from that observed for Gram-

positive bacteria,” *Environ. Microbiol.*, vol. 14, no. 7, pp. 1730–1743, 2012.

- [101] G. Carré *et al.*, “TiO<sub>2</sub> photocatalysis damages lipids and proteins in *Escherichia coli*,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 80, no. 8, pp. 2573–2581, 2014.
- [102] B. Liu *et al.*, “Environmental Science Nano with enhanced antifungal activity against *graminearum* and mechanism insight †,” *Environ. Sci. Nano*, 2016.

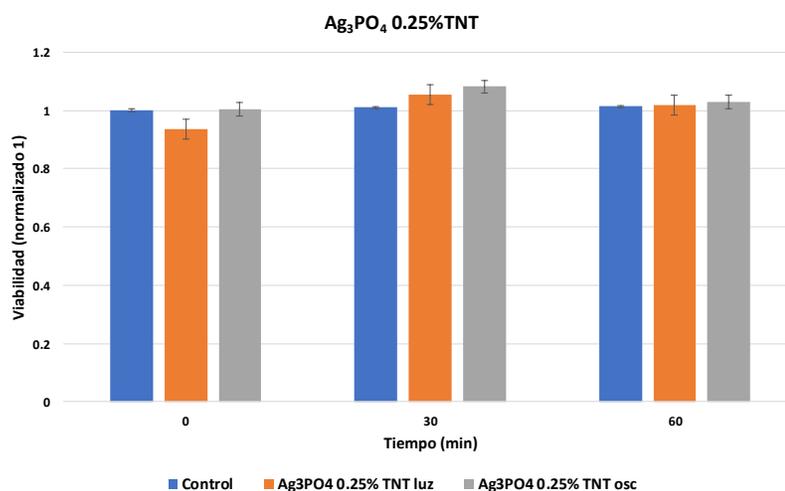
## Anexos

Se realizaron otros experimentos para probar la actividad agónica de los titanatos funcionalizados con menor cantidad de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  y funcionalizados con NPsAg en *C. glabrata*.



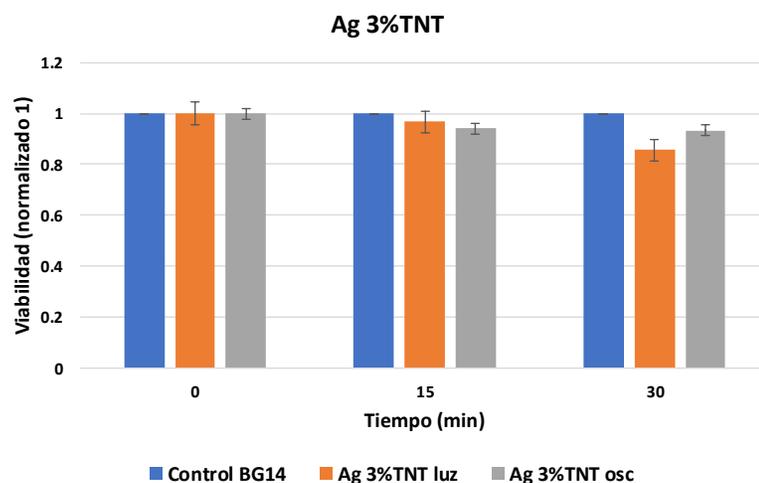
**Figura A.1.** Gráficas de viabilidad de *C. glabrata* expuesta a  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ 1%TNT bajo irradiación de luz visible.

La Figura A.1, muestra la pérdida de viabilidad de *C. glabrata* cuando es expuesta a  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ 1%TNT irradiado con luz visible.



**Figura A.2.** Gráficas de viabilidad de *C. glabrata* expuesta a  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ 0.25%TNT bajo irradiación de luz visible.

La Figura A.2, muestra que el  $\text{Ag}_3\text{PO}_4 0.5\% \text{TNT}$  no presenta inhibición en *C. glabrata* cuando es irradiada bajo luz visible.



**Figura A.3.** Gráficas de viabilidad de *C. glabrata* expuesta a Ag3%TNT bajo irradiación de luz visible.

La Figura A.3, muestra la exposición de *C. glabrata* con Ag3%TNT, el mismo fotocatalizador empleado para la inhibición de *E. coli* en 1 h. Lo cual muestra que este material no es efectivo para *C. glabrata*.

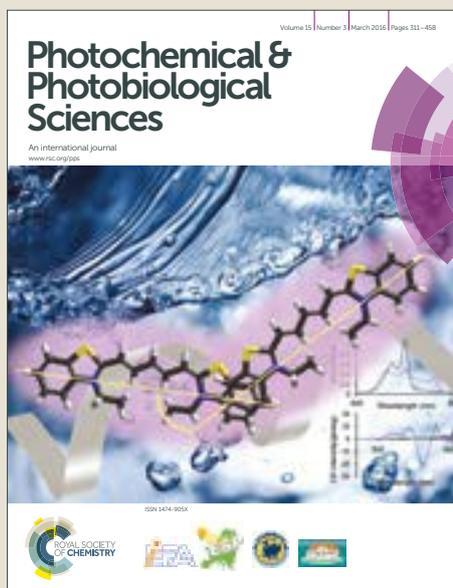


# Photochemical & Photobiological Sciences

Accepted Manuscript



This article can be cited before page numbers have been issued, to do this please use: O. A. Patrón-Soberano, B. P. Nuñez-Luna, S. Casas-Flores, A. De las Peñas, R. B. Domínguez-Espíndola and V. Rodríguez González, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2017, DOI: 10.1039/C6PP00237D.



This is an Accepted Manuscript, which has been through the Royal Society of Chemistry peer review process and has been accepted for publication.

Accepted Manuscripts are published online shortly after acceptance, before technical editing, formatting and proof reading. Using this free service, authors can make their results available to the community, in citable form, before we publish the edited article. We will replace this Accepted Manuscript with the edited and formatted Advance Article as soon as it is available.

You can find more information about Accepted Manuscripts in the [author guidelines](#).

Please note that technical editing may introduce minor changes to the text and/or graphics, which may alter content. The journal's standard [Terms & Conditions](#) and the ethical guidelines, outlined in our [author and reviewer resource centre](#), still apply. In no event shall the Royal Society of Chemistry be held responsible for any errors or omissions in this Accepted Manuscript or any consequences arising from the use of any information it contains.



## Journal Name

## ARTICLE

## Photoassisted inactivation of *Escherichia coli* bacteria by silver functionalized titanate nanotubes, $\text{Ag}/\text{H}_2\text{Ti}_2\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$

A. Patron-Soberano<sup>1</sup>, B. P. Núñez-Luna,<sup>2</sup> S. Casas-Flores<sup>1</sup>, A. De las Peñas<sup>1</sup>, R. B. Domínguez-Espíndola<sup>3</sup>, V. Rodríguez-González<sup>2\*</sup>

Received 00th January 20xx,  
Accepted 00th January 20xx

DOI: 10.1039/x0xx00000x

[www.rsc.org/](http://www.rsc.org/)

One-dimensional titanate nanotubes ( $\text{H}_2\text{Ti}_2\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) functionalized with silver nanoparticles (AgNPs) exhibited unique properties for the effective inactivation of the gram-negative *Escherichia coli* within 45 minutes under irradiation using a 65-W halogen lamp. The pathway of the photoassisted catalytic inactivation was examined by SEM and TEM using a reproducible biological protocol for sample preparations. The membrane integrity of the bacteria was damaged due to the oxidative stress caused by the reactive oxygen species, the bacteriostatic effect of the highly-dispersed-surface AgNPs (~5 nm) and the sharp nanotube penetration that induced the cell death.

### Introduction

*Escherichia coli* (*E. coli*) is a valuable model microorganism to study the persistence, evolution and inactivation of microorganisms in water sources, soil and on common surfaces such as stainless steel, wood, concrete and plastic.<sup>1-3</sup> *E. coli* is a gram-negative Enterobacter species that is widely distributed in water, food and mammals, where it naturally colonizes the colon, being pathogenic in some cases. Several *E. coli* strains cause diverse intestinal and extra intestinal diseases by means of virulence, which affects a wide range of cellular processes.<sup>1-2</sup>. Infections by *Escherichia coli* hazardous strains could happen through farming products and occur often from manure-contaminated soil and irrigation water. In cities, the infections may be originated from communal surfaces in public transport, supermarkets, schools, streets, or in public parks from feces of domestic animals. Also by means of old potable water system networks and by damaged wastewater drain systems, among others that affect the public health.<sup>1-3</sup>

Novel friendly nanotechnologies have been developed in order to study the deactivation of pathogenic microorganisms.<sup>4-5</sup> These microorganisms require environmental conditions in order to survive and reproduce, usually 37 °C, humid surfaces, aerobic conditions and food sources like carbohydrates,

proteins, and fats.<sup>6</sup> The thermal inactivation of *E. coli* is linked with the irreversible denaturation of membranes, ribosomes, and nucleic acids<sup>7</sup>, and the cell membrane rupture of the bacteria through a direct contact killing mechanism has been proposed for the annihilation of *E. Coli*.<sup>5</sup> On the other hand, electrochemical reactions have been conducted on the surface of aligned-multi-wall-carbon nanotubes decorated with AgNPs.<sup>8</sup> In sonoelectrocatalytic disinfection using  $\text{TiO}_2$  as electrode, the direct and indirect oxidation of *E. coli* cells takes place on the  $\text{TiO}_2$  surface in 60 min.<sup>9</sup> The irradiation of sol-gel  $\text{TiO}_2$ -N dense films has shown bactericidal activity in 24 h against *E. coli*.<sup>10</sup> The activity was correlated with the irradiation time, which also showed a detrimental effect due to the generated heat. The catalytic and photocatalytic inactivation of pathogenic microorganisms are adequate and promising techniques that can work under this conditions. The use of nanomaterials with high-surface-to-volume ratio, photoactive, hydrophilic and antibacterial properties has been widely explored.<sup>4-15</sup> Titanium dioxide-based nanomaterials have been the most studied for photoactive microorganism inactivation among other semiconductor oxides.<sup>4, 7-22</sup> The addition of silver or copper nanoparticles enhances the biocidal and bacteriostatic properties for a whole range of pathogenic microorganisms.<sup>12-14, 18-19, 22</sup> Titanate materials have structural similarities that are close to those of titanium dioxide, but with the advantage of sharp 1D morphologies such as nanofibers, nanowires, nanoribbons and nanotubes.<sup>16-17</sup> The layered nanomaterials ensure high surface-to-volume ratios, structural defects and oxygen vacancies that can be positive for the deactivation of harmful microorganisms. Protonated nanotubes are mainly synthesized by hydrothermal processes using  $\text{TiO}_2$  as precursor.<sup>4, 16-17</sup> There are some reports about using nanotubes or nanotube blocks based on  $\text{TiO}_2$  with the

<sup>a</sup> División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnología, San Luis Potosí, S. L. P., México.

<sup>b</sup> División de Materiales Avanzados, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnología, San Luis Potosí, S. L. P., México.

<sup>c</sup> Posgrado de Ingeniería Química Aplicadas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México.

E-mail: [vicente.rdz@ipicyt.edu.mx](mailto:vicente.rdz@ipicyt.edu.mx), vicenrg@hotmail.com Tel.: +52448342000 ext.: 7295.

## ARTICLE

## Journal Name

incorporation of AgNPs which exhibit a long-term antibacterial ability<sup>4-5, 12, 18, 22-24</sup> to inactivate and prevent the bacterial adhesion of pathogenic microorganisms.

In the present study, the pathway of *E. coli* inactivation by means of silver nanoparticles functionalized on titanate nanotubes used as photoactive catalysts is investigated. The damage and killing effects upon *E. coli* were observed and evaluated by SEM and TEM. N<sub>2</sub> physisorption, XRD and UV-vis-DRS were used to perform the physicochemical characterization of the AgNP/Titanate nanocomposites.

## Experimental

### Hydrothermal synthesis of H<sub>2</sub>Ti<sub>2</sub>O<sub>5</sub>·H<sub>2</sub>O

H<sub>2</sub>Ti<sub>2</sub>O<sub>5</sub>·H<sub>2</sub>O nanotubes were synthesized by a practical hydrothermal method in a microwave reactor (Eyela MWO-1000 Wave Magic) by following our earlier procedure.<sup>20</sup> The protonated titanate nanotubes were obtained in only 4 h under a maximal microwave radiation of 180 W at 150 °C. The precipitated materials were neutralized with a 5M HCl solution. Then, the resulting powders were filtered and dried for 10 h at 80 °C. The obtained powders were referred to as TNs.

### Catalysts

Photodeposition of silver nanoparticles was carried out into an ethanolic solution of AgNO<sub>3</sub>, keeping three loads (0.5, 1 and 3 wt. %), and 50 mg of either TNs or P25 (commercial TiO<sub>2</sub> from Evonik) were placed in a small glass reactor. The suspension was placed under vigorous stirring for 5 min and then in ultrasonic bath for 5 min to ensure the complete disaggregation of precursor particles. Afterwards, the slurry was maintained under magnetic stirring for 1 h and, at the same time, irradiated with a 17 W UVC lamp (TecnoLite G15T8, 254 nm, 1168 W/cm<sup>2</sup>). Then, the suspension was filtered by using a hydrophilic polypropylene filter (Pall, 0.2 μm) in a vacuum system. The solids were completely dried overnight in an oven at 80 °C. The obtained composites were referred to as AgXTNs, where X denotes different silver contents in wt. %.

The silver functionalized nanotubes (AgTNs) were characterized by means of a transmission electron microscope (TEM); the HRTEM and HAADF images were obtained with a FEI Tecnai F30 microscope equipped with a tungsten field emission gun operated at 300 keV. UV-vis-DRS molecular spectra were obtained using a UV-vis-NIR Agilent Technologies Cary 5000 spectrophotometer equipped with an integration sphere. X-ray diffraction patterns were obtained using a Bruker discover X-ray diffractometer with Cu Kα radiation of 1.5406 Å, operated at 35 kV and 25 mA. N<sub>2</sub> adsorption-desorption at -196 °C was carried out using a NOVA 3 instrument on previously out-gassed samples at 150 °C. The Brunauer-Emmett-Teller method (BET method) was used to calculate the specific surface area.

### *Escherichia coli*

*E. coli* was grown in LB medium for 24 h at 30 °C. The culture was centrifuged twice at 4500 rpm for 10 min, the supernatant discarded and bacterial pellets resuspended in M9 liquid medium and adjusted at a concentration of ~1 x10<sup>9</sup> CFU/mL. This concentration of *Escherichia coli* TOP10F strain was used for all the experiments.

### Photocatalytic deactivation of *Escherichia coli*

The photocatalytic deactivation experiment was carried out in 24 well-cell culture plates with constant magnetic stirring (350 rpm), irradiated with a halogen lamp (Smart halogen 65W, Panasonic Corporation) to provide visible light radiation in the presence of 1 mg/mL of photoactive silver-nanotubes. Identical conditions were set in all the experiments related to change the composite in order to test AgXTNs, TNs, P25 or AgNPs at the optimal concentration used for AgXTNs. After each treatment time (5, 15, 30, 45 and 60 min), 0.1 mL was taken for dilution and 0.1 mL was plated on LB. After 24 h of incubation at 30 °C, the colonies at each dilution and each time were visually identified and counted. The photocatalytic deactivation of *E. coli* was reported as colony forming units per milliliter (CFU/mL), which is a measure of viable bacterial cells.

### Photodegradation of Eosin Y dye

The photocatalytic degradation of Eosin Y dye (LeMont Productos Químicos, indicator grade) was achieved under visible radiation (Philips Halogen lamp, Halotone UV Block, 50 W). The test was performed in a borosilicate home-made reactor, with 250 mL of capacity. 20 mg of composites were added into the reactor containing 200 mL of a solution of 10 mg L<sup>-1</sup> of Eosin Y dye. Before the solution was exposed to visible radiation, the system was placed in the darkness for 60 min in order to achieve the adsorption-desorption equilibrium. The photoactivity degradation rate was recorded by measuring the intensity of the main absorption band of Eosin Y (517 nm) as a function of the irradiation time. At given time intervals, samples were extracted and filtered through a 0.45 μm nylon filter and then monitored with an UV-vis-NIR Agilent Technologies Cary 5000 spectrophotometer.

### Morphological *E. coli* characterization

*E. coli* was characterized by using SEM. Cell samples were collected at representative time intervals during deactivation. The pellets of bacteria were fixed in 3 % glutaraldehyde in a sodium phosphate buffer, 100 mM, at pH 7.4 and 4 °C for 1 h; the samples were washed four times with the buffer for 15 min each time. Afterwards, the samples were post-fixed with 1 % OsO<sub>4</sub> in buffer for 2 h at 4 °C and washed 4 times. The samples were progressively dehydrated with absolute ethanol from 30 to 100 % for 10 min with each concentration, and washed twice with 100 % absolute ethanol, each washing lasting 15 min. The critical point drying process was performed in a Tousimis Samdri-PVT-3D, and the dry samples were mounted and gold sputter coated in a Cressington apparatus Model 108 auto and examined in an FEI model Quanta 250

SEM. The SEM was adjusted at 25kV, spot 4.5 and WD 10 mm, taking the micrographs with an Everhart Thornley Detector (ETD).

The ultrastructure of *E. coli* was evaluated by TEM. The bacteria were fixed, post-fixed and progressively dehydrated with absolute ethanol until 100 % as previously described for SEM characterization. Then, the pre-inclusion was done in LRW:Absolute ethanol 1:1 for 2 h, and then in pure LRW overnight. The cell pellets were embedded in gelatine capsules and polymerized at 50 °C for 48 h. Ultrathin sections were obtained in a ultramicrotome (RMC) and placed in FCF -100 Cu and contrasted with 2 % uranyl acetate for 10 min, followed by 2 % lead citrate for 5 min. Finally, the samples were examined in a JEM-200 CX (JEOL) transmission electron microscope at 100 kV and equipped with a digital camera (SIA, Germany).

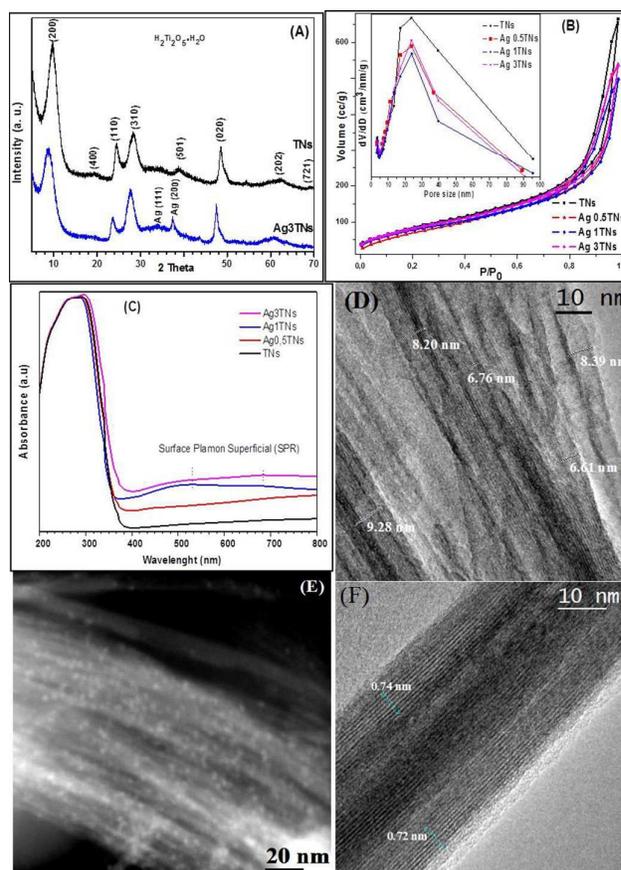
## Results and discussion

### Physicochemical characterization of $H_2Ti_2O_5 \cdot H_2O$

The XRD patterns show low crystallinity materials, and all the reflections can be ascribed to the orthorhombic phase of  $H_2Ti_2O_5 \cdot H_2O$  (JCPDS 47-0124) and metallic silver crystalline phases (JCPDS 04-0783), Fig. 1A. Titanic acid is the main crystalline phase in the nanocomposites. At low content of silver loads, no reflection peak characteristic of metallic silver was detected, presumably due to the nanometric size of the highly dispersed silver particles. For the 3 wt. % of AgNPs, two peaks ascribed to metallic silver were observed. Surface specific areas of the nanocomposites were 300  $m^2/g$  and only a loss of 15 % of area occurred when 3 wt. % of AgNPs were functionalized. The textural characteristics of the materials were those of mesoporous materials with a Type IV adsorption-desorption isotherm, common for layered materials, Fig 1B. The absorbed  $N_2$  volume decreased slightly as the silver load was increased due to the P/Po thin hysteresis range H2 with the thin region from low P/Po values (0.2) to high P/Po (0.95), according to the IUPAC classification<sup>16-17, 20</sup>. The pore size distribution inset in Fig. 1B shows the maximum pore size at 5 nm in an interval ranging from 2 to 10 nm. UV-vis spectra with surface procedures confirmed the presence of AgNPs (~5 nm) on the surface of one-dimensional nanostructures, see Fig. 1C-E, respectively, which is appropriate for visible excitation. The values of the energy band gap ( $E_g$ ) were calculated with the equation  $\alpha(h\nu)=A(h\nu-E_g)^{m/2}$ , where  $\alpha$  is the absorption coefficient,  $h\nu$  is the photon energy, A is a constant and  $m=2$  for a direct transition between the valence band and the conduction band. For the estimation of the  $E_g$  from the UV-vis spectra, a straight line was extrapolated from the absorption curve to the abscissa axis. When  $\alpha$  is zero,  $E_g=h\nu$ . The  $E_g$  energy of a silver titanate is 3.35 eV and 3.3 eV for Ag3NTs, on average. The surface plasmon resonance of AgNPs enhances the visible light absorption (Fig. 1C). The thickness of the  $H_2Ti_2O_5 \cdot H_2O$  nanotubes was found to be ~10 nm with four layers. Layered nanotubes have a tendency to agglomerate, forming bundles, as it can be seen in Fig. 1D-F. The as-synthesized nanotubes

presented sharp open-ended structures. The HAADF images show the highly dispersed AgNPs all over the titanate surface of the Ag3NTs composite, Fig 1E. The HRTEM image for the Ag0.5NTs shows an interlayer separation of ~ 0.73 nm of titanate nanotube, Fig 1F.

To verify the Ag content in the titanate nanotubes, inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES) with a 730-ES spectrometer from Varian Inc. was used. It was determined as 0.45, 0.92 and 2.45 wt. %, respectively.

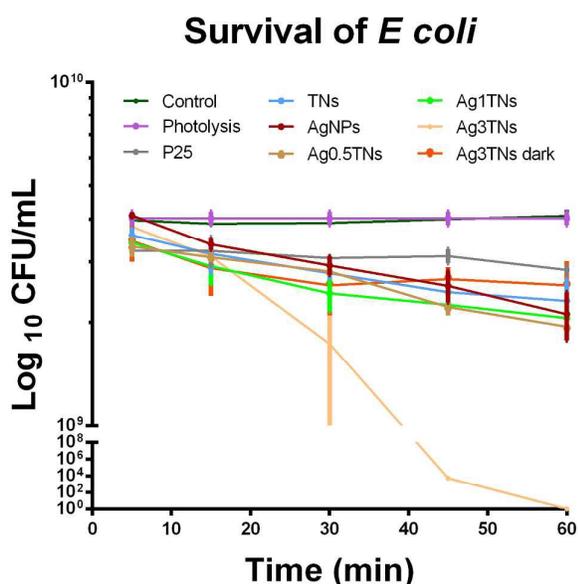


**Fig. 1** A) XRD patterns of TNs and Ag3NTs, B) Adsorption-desorption of  $N_2$  isotherms with inside pore size distribution, C) UV-vis spectra of AgXNTN composites and TNs, D-E) selected HRTEM and HAADF images of the Ag3NTN composite and F) HRTEM image of TNs.

### *E. coli* deactivation as a function of time by AgNT nanocomposites

The survival of *E. coli* in the plates was evaluated at 5, 15, 30, 45 and 60 min; the CFU/mL obtained at each time was plotted, obtaining the logarithmic decay of the bacterial growth, Fig. 2. The control test that consists only of *E. coli* colonies as a function of time guarantees the sterilization of the material. The radiation (60 W) without catalyst, identified as photolysis, showed negligible inactivation, suggesting that the halogen radiation had no influence on the fatal damage of *E. coli*, Fig. 2.

During the first 30 min of photocatalytic treatment, the photoinactivation was at a very low level in comparison with the control and Ag3TNs under dark conditions; after 15 min, a strong decrease in the CFU was observed. The complete photoinactivation was reached at 60 min; thereafter no cell growth in the plate was observed. The treatment with Ag3TNs under dark conditions and control without treatment did not show viability changes, Fig. 2. In order to clearly exhibit the inactivation differences, the plot shows a magnification from  $\text{Log}10^{-9}$  to  $\text{Log}10^{-10}$  interval in a graph of  $\text{Log CFU/mL}$  from  $10^0$  to  $10^{-10}$  that might be overestimated if it were plotted only from  $1 \times 10^{-9}$ . Although the control and photolysis were not affected, a small change was seen in each of the tested nanocomposites; it was only the Ag3TNs which achieved the total inactivation after 60 min (Fig. 2). The obtained results are in good agreement with the literature<sup>4, 21-23</sup>. The nanocomposites displayed excellent photo-activity and biocidal properties, which is in contrast with the report by Kang et al.<sup>24</sup> who by using an electrode of CdS/Pt-TiO<sub>2</sub> nanotubes achieved the photoelectro-inactivation of *E. coli* in 60 min. Carbon nanotubes showed biotoxicity against *E. coli* bacteria, achieving cell loss viability of 80 % in 120 min by the oxidative cellular membrane integrity disruption due to the toxicity of single wall carbon nanotubes (SWCNT) and to morphological alteration in 2 h.<sup>5,8</sup>

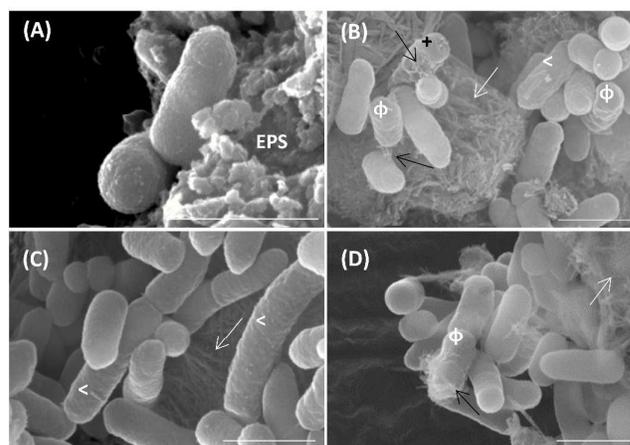


**Fig. 2** Logarithmic graph of CFU/mL versus time of *E. coli* after photocatalytic inactivation using AgXTN composites. (A) At different time (B) Behavior at 60 min.

#### Morphology and structure of *E. coli* by SEM

*Escherichia coli* is a gram-negative, rod-shaped enterobacter species with dimensions of 1.1–1.5  $\mu\text{m}$  and 2.0–6.0  $\mu\text{m}$ <sup>25</sup> and

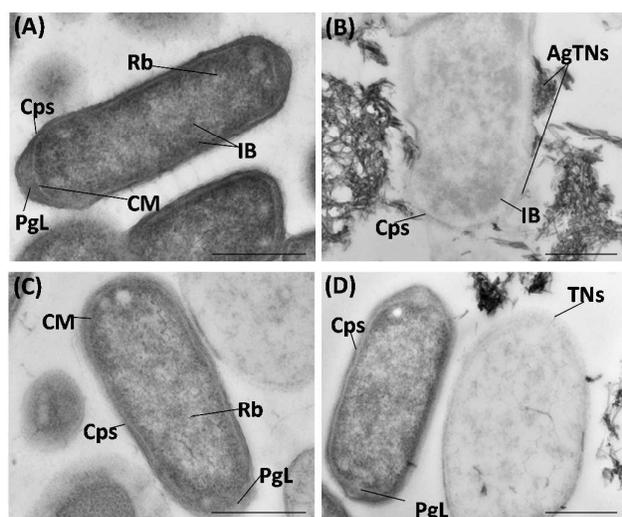
belongs to peritrichous bacteria. *Escherichia coli* TOP10F competent cells are smaller with dimensions of 0.1–0.3  $\mu\text{m}$  and 0.7–1.2  $\mu\text{m}$ . Fig. 3A shows control *E. coli* without treatment; the cells show dense straight rod shapes with EPS (Extracellular Polymeric Substances) secretions; Fig. 3B displays *E. coli* exposed to photoinactivation with the Ag3NT sample; the damage in the bacteria is shown by surface undulations, membrane depressions, EPS decreased and increased sizes; although most of the populations are dead, the morphology was never totally lost, even after 60 min of treatment, however, in this case, many cells collapsed (data not shown), Fig. 3C. *E. coli* was exposed to Ag3TNs under dark conditions and as expected, there was little damage; some bacteria increased their sizes and EPS secretions disappeared, but only few cells showed morphological alterations in their membranes or completely collapsed, Fig. 3D. Some cells exposed to titanate nanotube treatment suffered important damage in the capsule and cytoplasmic membrane.



**Fig. 3** Morphological evaluation of *E. coli* after 45min through different treatments (SEM): (A) Control, (B) Photoactivated silver titanate nanotubes, Ag3NTs, (C) Ag3TNs under dark conditions, (D) Titanate nanotubes only. EPS, Extracellular Polymeric Substances, + collapsed cells; the black arrow shows NTs; the white arrow shows aggregates of NTs; < elongation size cells; white  $\phi$  capsule damage. A-D bars represent 1  $\mu\text{m}$ .

Fig. 4A. Control of *E. coli* without treatment shows cells with straight rod shape, capsule, well-defined outer membrane followed by a peptidoglycan layer limited by a cytoplasmic membrane with plenty of ribosomes inside, inclusion bodies and DNA; Fig. 4B. *E. coli* deactivated with silver titanate nanotubes, Ag3NTs: the bacteria increased their sizes, the central part of the cytoplasm decreased in density, and as it can be seen, there is little DNA along the cell. Few inclusion bodies were reorganized near the cytoplasmic membrane. The capsule lost the rod shape and shows blebs: some parts are totally disrupted. Prior to total damage in the cell, the peptidoglycan layer became anomalously wide. Fig. 4C, *E. coli* exposed to silver titanate nanotubes without light were less damaged; many cells show normal morphology whereas others were damaged, the capsule of the cell lost its integrity,

and shows an empty cytoplasm like the photoactivated ones, Fig. 4D. In the case of the morphological effect of NTs on *E. coli*, the damage under this condition is similar to the photoactive performance of Ag3TNs; the cytoplasm suffered a reorganization with its center losing almost all ribosomes and DNA, with remains showing up at the periphery of the cytoplasm; some capsules swelled and, in some cases, with more pronounced damage, the frontiers of the cell were lost. The main difference between Ag3TN photoactivation versus Ag3TNs under dark conditions or only TN treatment is the number of affected cells. Similar TEM images were reported by Văcăroiu et al.,<sup>10</sup> using cultivated *E. coli*, where the investigated films induced modification in the membrane permeability, which promoted the cell death in 24 h.



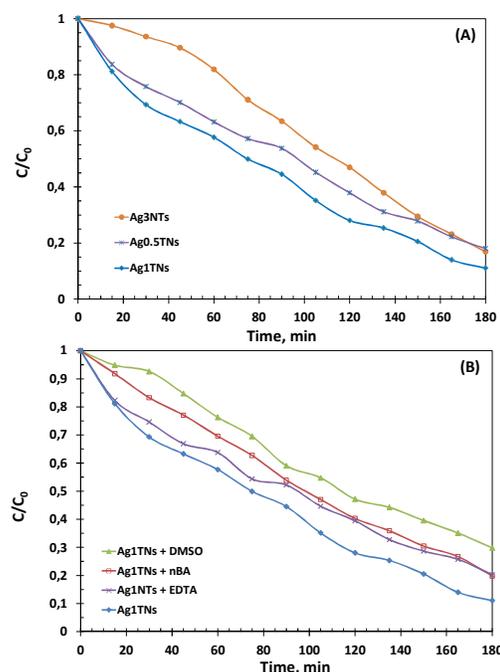
**Fig. 4** Morphological evaluation of *E. coli* after 45min through different treatments (TEM): (A) Control, (B) Photoactivated silver titanate nanotubes, Ag3TNs, (C) Ag3TNs under dark conditions, (D) Titanate nanotubes only. Cps, capsule; PgL, proteoglycan layer; CM, cytoplasm membrane; Rb, ribosome; IB, inclusion body; Ag3TNs, silver titanate nanotubes; TNs, titanate nanotubes, A-D bars represent 0.5  $\mu\text{m}$ .

These observations confirm the synergistic effect of silver-titanate composites on *E. coli*: (i) the generation of reactive oxygen species (ROS) by titanate photoactivity properties under irradiation that stresses the bacteria<sup>21-26</sup>, the damage in all the cells was observed by damage in the membrane, collapsed cells, inhibition of EPS and formation of many aggregates of dead cells, Fig 3B; (ii) the bacteriostatic effect of AgNPs, highly dispersed on the titanate surface that damaged the integrity of the capsule; the dark conditions caused the elongation of cell sizes and density loss in the central body of the cell in some cells, Fig 4B; (iii) the morphological effect of the sharp TNs on *E. coli*; the damage occurred through cytoplasm reorganization, where the center lost almost all ribosomes and DNA, remaining some dense material at the periphery of the cytoplasm<sup>27</sup>. The sharp morphology of the titanate nanotubes damaged the cell wall, where penetration

probably caused more serious damage in the capsule and cytoplasmic membrane, Fig 4D.

The results observed by Warnes et al.<sup>26</sup> about a noble metal surface toxicity in *E. coli* involved copper ionic species and the generation of reactive oxygen species, which resulted in immediate cytoplasmic membrane depolarization followed by respiration inhibition, DNA degradation and death.

The Ag1NT composite was identified to be the best catalyst for Eosin Y degradation, Fig 5A. Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), n butyl alcohol (nBA), and dimethyl sulphoxide (DMSO) were used as reactive radical scavengers for the determination of the influence of holes, hydroxyl and superoxide radicals, respectively. 1 mM of each scavenger was added separately for each experiment in order to determine which reactive oxygen species is most responsible for the dye photodegradation.<sup>28-29</sup> Among the three scavengers used, addition of EDTA and nBA decreased the visible photodegradation of Eosin Y to from 89 to 80 %, as shown in Fig. 5B; the performance of EDTA is more effective at the start of the degradation. This shows that holes are the main responsible reactive radicals followed by hydroxyl.



**Fig. 5.** Photocatalytic degradation of Eosin Y, (A) using AgXNT composites and (B) with the addition of scavenger experiments to identify responsible reactive oxygen species for the photodegradation.

The presence of low loads of AgNPs on the titanate nanotube surface efficiently prevents the electron-hole recombination, allowing the visible light absorption by having  $\text{Ag}^0$  and  $\text{Ag}^+$  interactions in addition to the bactericidal effect of AgNPs. The

## ARTICLE

## Journal Name

photocatalytic synergic behavior of composites can benefit the photocatalytic inactivation of *E. coli* mainly by holes and hydroxyl as major responsible reactive radicals activated by visible radiation<sup>30</sup>. The surface functionalization of AgNPs may create additional energy levels between the conduction band and valence edge of Ag3TNs that can cause a red-shift in the band edge absorption threshold, Fig 6.

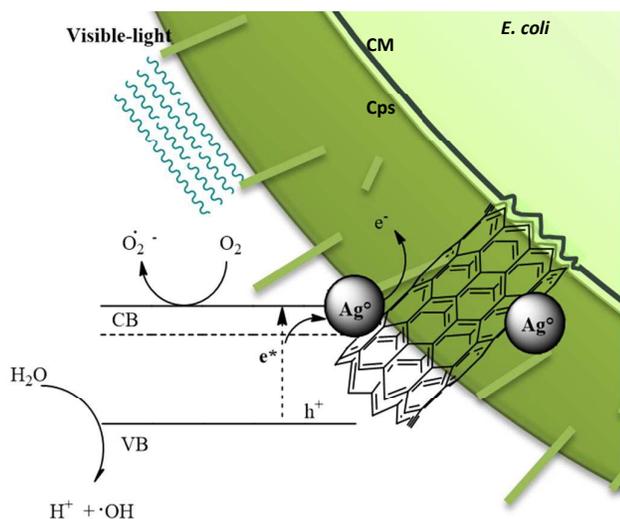


Fig. 6. Schematic representation of the photocatalytic processes that allow the photocatalytic inactivation of *E. coli* by Ag3TNs radiated with visible-light: Cps, capsule; CM, cytoplasm membrane.

The synergistic effect of silver titanate nanocomposites caused the annihilation of *E. coli* under direct contact with the cell as shown in the TEM images. Ag3TN morphologies caused the death of all cells by damaging the capsule and cytoplasmic membrane.<sup>14</sup> There is the formation of some inclusion bodies near the cytoplasmic membrane and large central areas of empty cells. The pathway discovered in this research work is in good agreement with the one previously reported by Saito et al.<sup>31</sup> who proposed that a TiO<sub>2</sub> semiconductor caused disorder in the cell permeability, achieving the decomposition of the cell wall and cell destruction. Later, Matsungana et al.<sup>32</sup> proposed the oxidation of the intracellular membrane by cell stress respiration that caused the cell death.

The photoactive properties of these nanocomposites promoted by 65-W halogen lamps enhanced enormously the bactericidal and morphological biotoxicity properties of the nanotubes functionalized with AgNPs on the titanate surface.

## Conclusions

The practical hydrothermal synthesis of titanate nanotubes and their functionalization with ~5 nm AgNPs allowed the irreversible deactivation of the gram-negative enterobacter *E.*

*coli*. in a nutritive medium. The high dispersion of AgNPs, mainly in the reduced state (Ag<sup>0</sup>) all over the titanate nanotubes, enhanced the charge separation to generate ROS species that stressed the bacteria. The sharp nanotube morphology favored the damage or penetration of the cell, accelerating the fatal inactivation of the *E. coli* under mild conditions, 65-W-halogen-lamp radiation, and without using any scavenger.

This practical synthesis of silver nanotube composites has promising green applications that can kill the human pathogenic microorganisms with visible radiation in approximately 45-60 min.

## Acknowledgements

We gratefully acknowledge M. C. B. Escoto-Rivera and Dr. H. Silva-Pereyra from LINAN-IPICYT for the HRTEM, and XRD material characterizations. The authors want to thank Dr. N. A. Ramirez-Pérez and Dr. N. Gómez-Hernandez for their technical help during the inactivation experiments. This work was supported by CB-2011/169597 and LINAN-0271911 CONACyT projects. R.B. Dominguez-Espíndola and B.P. Nuñez-Luna thank CONACyT for the granted scholarships.

## References

- 1 J. B. Kaper, J. P. Nataro and H.L.T. Mobley, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2004, **2**, 123-140.
- 2 A. Maule, *J. Appl. Microbiol., Symposium Suppl.*, 2000, **88**, 715-785.
- 3 E. B. Solomon, S. Yaron and K. R. Matthews, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, **68**, 397-400.
- 4 T. Tong, A. Shereet, J. Wu, C. T. T. Binh, J. J. Kelly, J. F. Gaillard and K. A. Gray, *Environ. Sci. & Technol.*, 2013, **47**, 12486-12495.
- 5 S. Amarnath, M. A. Hussain, V. Manjundiah and A. K. Sood, *Soft Nanosci. Lett.*, 2012, **2**, 41-45.
- 6 N. Musee, M. Thwalaa and N. Nota, *Environ. Monit.*, 2011, **13**, 1164-1183
- 7 J. Lee and G. Kaletunc, *Appl Environ Microbiol.* 2002, **68**, 5379-5386.
- 8 O. Akhavan, M. Abdolhad, Y. Abdi and S. Mohajezadeh, *J. Mater. Chem.*, 2011, **21**, 387-393.
- 9 K. Ninomiya, M. Arakawab, C. Oginoc, N. Shimizua, *Ultrason. Sonochem.* 2013, **20**, 762-767.
- 10 C. Văcăroiu, M. Enache, M. Gartner, G. Popescu, M. Anastasescu, A. Brezeanu, N. Todorova, T. Giannakopoulou, C. Trapalis, L. Dumitru, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2009, **25**, 27-31.
- 11 F. Hossain, O. J. Perales-Perez, S. Hwang and F. Román, *Sci. Total Environ.*, 2014, **466-467**, 1047-1059.
- 12 L. Zhao, H. Wang, K. Huo, L. Cui, W. Zhang, H. Ni, Y. Zhang, Z. Wu and P. K. Chu, *Biomaterials*, 2011, **32**, 5706-5716.
- 13 V. Rodríguez-González, S. Obregón-Alfaro, L.M. Torres-Martínez, S-H. Cho and S-W. Lee, *Appl. Catal. B: Environ.*, 2010, **98**, 229-234.
- 14 S. Thabet, F. Simonet, M. Lemaire, C. Guillard and P. Cottana, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2014, **80**, 7527-7535.
- 15 Y. Wang, L. Lin, F. Li, L. Chen, D. Chen, C. Yang and M. Huang, *Photochem. & Photobiol. Sci.*, 2016, **15**, 666-672.
- 16 Y. Zhang, Z. Jiang, J. Huang, L. Y. Lim, W. Li, J. Deng, D. Gong, Y. Tang, Y. Lai and Z. Chen, *RSC Adv.*, 2015, **5**, 79479-79510.

- 17 N. Liu, X. Chen, J. Zhang and J. W. Schwank, *Catal. Today*, 2014, **225**, 34-51.
- 18 R. B. Sadu, D. H. Chen, A. S. Kucknoor, Z. Guo and A. J. Gomes, *BioNanoSci.*, 2014, **4**, 136-148.
- 19 L. Wei, H. Wang, Z. Wanf, M.Yua and S. Chen, *RSC Adv.*, 2015, **5**, 74347-74352.
- 20 V. Rodríguez-González, S. Obregón-Alfaro, S. M. Lozano-Sánchez, S-W. Lee, *J Mol. Catal. A- Chem.* 2012, **353-354** 163-170.
- 21 S. Zhang, C. Liu, X. Liu, H. Zhang, P. Liu, S. Zhang, F. Peng and H. Zhao, *Appl. Microbiol Biotechnol.*, 2012, **96**, 1201-1207.
- 22 F. J. Zhang, M. L. Chen and W.C. Oh, *Composites Sci. Technol.*, 2011, **71**, 658-665.
- 23 K. Cendrowski, M. Peruzynska, A. Markoeska-Szczupak, X. Chen, A. Wajda, J. Lapczuk, M. Kurzawski, R. J. Kalenczuk, M. Drozdziak and E. Mijowska, *Biomed Microdevices*, 2014, **16**, 449-458.
- 24 Q. Kang, Q. Z. Lu, S. H. Liu, L. X. Yang, Ling. F. Wen, S. L. Luo and Q. Y. Cai, *Biomaterials*, 2010, **31**, 3317-3326.
- 25 Orskov, F., and Orskov, *Methods in Microbiology*, 1984, **14**.
- 26 S.L. Warnes, V. Caves, and W. Keevil, *Environ. Microbiol.* 2012, **14**, 1730-1743
- 27 G. Carréa, E. Hamonc, S. Ennahar, M Estner, M.-C. Lett, P. Horvatovich, J.-P. Gies, V. Keller, N. Keller and P. Andre, *Appl. Environ. Microbiol.* 2014, **80**, 2573-2581
- 28 N. KrishnaRao Eswar, P. C. Ramamurthya and G. Madras, *New J. Chem.*, 2016, **40**, 3464-3475
- 29 N. KrishnaRao Eswar, P. C. Ramamurthya and G. Madras, *New J. Chem.* 2015, **39**, 6040-6051
- 30 Y. Hou, X. Li, Q. Zhao, G. Chen, and C. L. Raston, *Environ. Sci. Technol.* 2012, **46**, 4042-4050
- 31 T. Saito, T. Iwase, J. Hoire and T. Morioka, *Biology*, 1992, **14**, 369-379.
- 32 T. Matsunaga, R. Tomoda, T. Nakajima and H. Wake, *FEMS Microbiol. Lett.*, 2006, **29**, 211-214.

## Graphical Abstract

**Photoassisted inactivation of *Escherichia coli* bacteria by silver functionalized titanate nanotubes, Ag/H<sub>2</sub>Ti<sub>2</sub>O<sub>5</sub>·H<sub>2</sub>O**

A. Patron-Soberano<sup>1</sup>, B. P. Núñez-Luna,<sup>2</sup> S. Casas-Flores<sup>1</sup>, A. De las Peñas<sup>1</sup>, R. B. Domínguez-Espíndola<sup>3</sup>, V. Rodríguez-González<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>*División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnología, San Luis Potosí, S. L. P., México.*

<sup>2</sup>*División de Materiales Avanzados, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnología, San Luis Potosí, S. L. P., México.*

<sup>3</sup>*Posgrado de Ingeniería Química Aplicadas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México.*

*E-mail: vicente.rdz@ipicyt.edu.mx, vicensrg@hotmail.com Tel.: +52448342000 ext.: 7295.*

