

**EVALUACIÓN DEL EFECTO TÓXICO DE LAS NANOPARTICULAS DE PLATA
EN LAS PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS Y MICROBIALES
DE UN SUELO ARCILLOSO**

CINDY MILENA POVEDA CÉSPEDES

**UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA
ESCUELA DE INGENIERÍAS Y ADMINISTRACIÓN
FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL
BUCARAMANGA**

2015

**EVALUACIÓN DEL EFECTO TÓXICO DE LAS NANOPARTICULAS DE PLATA
EN LAS PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS Y MICROBIALES DE UN SUELO
ARCILLOSO**

CINDY MILENA POVEDA CÉSPEDES

**Proyecto de grado presentado como requisito para optar al título de
ingeniera ambiental.**

Director:

SANDRA NATALIA CORREA TORRES

Ingeniera Ambiental

**UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA
ESCUELA DE INGENIERÍAS Y ADMINISTRACIÓN
FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL
BUCARAMANGA**

2015

Septiembre 07 de 2015

CINDY MILENA POVEDA CÉSPEDES

“Declaro que esta tesis (o trabajo de grado) no ha sido presentada para optar a un título, ya sea en igual forma o con variaciones, en esta o cualquier otra universidad” Régimen Discente

DEDICATORIA

A Dios por guiarme siempre de su mano y regalarme tantas bendiciones en mi vida para alcanzar cada meta que me propongo y por llenarme de sabiduría y paciencia para afrontar los retos que se me presentan y alcanzar este peldaño tan importante en mi vida profesional.

La culminación de esta etapa de mi vida es dedicada principalmente a mi madre y a mi tía por su ayuda incondicional y desinteresada, por sus grandes esfuerzos realizados para brindarme la oportunidad de estudiar mi carrera soñada, por sus consejos y apoyo en momentos difíciles, por su paciencia, dedicación y comprensión para lograr hacer de mí la persona que hoy en día soy, pero sobre todo por tanto amor que me brindan día a día.

A mi mamá, Sandra Lucía Céspedes Novoa y a mi tía Nelly Novoa Moncada de todo corazón infinitas gracias por el tiempo dedicado en hacerme una persona de bien y por brindarme la oportunidad de ser profesional. A mis hermanos que son mi motor para seguir alcanzando sueños, a mi cuñada por darme la mayor bendición que ha llegado a mi vida, mi hermosa sobrina, y a mi Salomé que me llena de fuerzas y motivos para seguir hacia adelante, ni un paso atrás.

CINDY MILENA POVEDA CÉSPEDES

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la vida, la salud y las fuerzas necesarias para sobre ponerme a situaciones difíciles, y por guiarme por el mejor camino.

A la Universidad Pontificia Bolivariana Seccional Bucaramanga por todas sus enseñanzas y brindarme el mejor conocimiento, los cuales me sirvieron de base para la realización de este proyecto, en especial Sandra Natalia Correa Torres quien con su colaboración y dedicación fue pieza fundamental en la finalización de este proyecto.

CINDY MILENA POVEDA CÉSPEDES

CONTENIDO

| | Pág. |
|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| RESUMEN GENERAL..... | ¡Error! Marcador no definido. |
| INTRODUCCIÓN..... | 14 |
| 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 16 |
| 2. ANTECEDENTES..... | 17 |
| 3. JUSTIFICACIÓN..... | 20 |
| 4. OBJETIVOS..... | 22 |
| 4.1 OBJETIVO GENERAL..... | 22 |
| 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 22 |
| 5. MARCO TEORICO..... | 23 |
| 5.1 GENERALIDADES DE LAS NANOPARTÍCULAS..... | 23 |
| 5.2 APLICACIONES DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AGNPS)..... | 24 |
| 5.3 PROPIEDADES DEL SUELO..... | 26 |
| 5.3.1 Propiedades físicas del suelo..... | 26 |
| 5.3.1.1 Textura..... | 27 |
| 5.3.1.2 Color..... | 28 |
| 5.3.1.3 Permeabilidad e infiltración..... | 29 |
| 5.3.2 Propiedades químicas del suelo..... | 30 |
| 5.3.2.1 Capacidad de intercambio catiónico..... | 30 |
| 5.3.2.2 pH..... | 31 |
| 5.3.2.3 Carbono orgánico del suelo..... | 31 |
| 5.3.3 Propiedades microbiológicas del suelo..... | 32 |
| 5.4 SÍNTESIS DE NANO-PARTÍCULAS DE PLATA..... | 34 |
| 5.4.1 Método biológico..... | 35 |
| 5.5 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE NANO-PARTÍCULAS METÁLICAS..... | 35 |
| 5.5.1 Espectrofotometría Ultravioleta Visible..... | 36 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.5.2 SEM microscopio electrónico de barrido | 36 |
| 6. METODOLOGÍA | 38 |
| 6.1 FASE I Determinación de las características físicas, químicas y microbiológicas del suelo en estudio. | 40 |
| 6.2 FASE II. Síntesis y caracterización de las nanopartículas de plata a partir de extractos vegetales, para su aplicación en el suelo arcilloso. | 44 |
| 6.3 FASE III. Análisis del efecto de las nanopartículas de plata sintetizadas en las propiedades físicas, químicas y microbiológicas del suelo arcilloso..... | 46 |
| 6.3.1 Realización del análisis microbiológico del suelo | 47 |
| 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 49 |
| 7.1 ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES FÍSICAS DEL SUELO INICIAL..... | 49 |
| 7.1.1 Textura del suelo inicial | 49 |
| 7.1.2 Color del suelo inicial | 50 |
| 7.2 ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES QUÍMICAS DEL SUELO INICIAL..... | 51 |
| 7.2.1 Capacidad de intercambio catiónico (CIC) del suelo inicia. | 51 |
| 7.3 ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES MICROBIOLÓGICAS INICIALES DEL SUELO | 54 |
| 7.4 CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA SINTETIZADAS A PARTIR DE EXTRACTOS VEGETALES | 56 |
| 7. 5 ANÁLISIS DEL EFECTO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN LAS PROPIEDADES FÍSICAS DEL SUELO | 59 |
| 7.5.1 Textura del suelo con nanopartículas | 59 |
| 7.5.2 Análisis del Color del suelo con nanopartículas | 61 |
| 7.6 EFECTO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN LAS PROPIEDADES QUÍMICAS DEL SUELO | 62 |
| 7.6.1 Efecto en el análisis de CIC en suelos con nanopartículas | 63 |
| 7.6.2 Efecto en el pH y Conductividad determinado en un suelo con nanopartículas | 64 |
| 7.6.3 Efecto en la cantidad de materia orgánica en un suelo en presencia de nanopartículas de plata..... | 65 |
| 7.7 EFECTO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN LAS PROPIEDADES MICROBIOLÓGICAS DEL SUELO | 67 |

8. CONCLUSIONES69
9. RECOMENDACIONES70
BIBLIOGRAFÍA.....71

LISTA DE FIGURAS

| | Pág. |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| Figura 1. Triángulo textural según clasificación del USDA | 28 |
| Figura 2. Metodología aplicada en la evaluación del efecto toxico de las nanopartículas de planta en las propiedades del suelo arcillosos. | 39 |
| Figura 3. Síntesis de nanopartículas de plata en la centrifugadora | 45 |
| Figura 4. Montaje de dosificacion del suelo con nanopartículas biosintetizadas de plata..... | 47 |
| Figura 5. Resultado obtenido del análisis del color inicial del suelo muestreado... | 50 |
| Figura 6 Siembra de colonias | 55 |
| Figura 7 Curva de absorbancia. Muestras 1. | 57 |
| Figura 8 Curva de absorbancia. Muestra 2. | 57 |
| Figura 9 Micrografía de muestra líquida de nanopartículas de plata biosintetizadas a partir de extractos de guayaba analizadas por microscopía electrónica de barrido SEM..... | 58 |
| Figura 10 Determinación del color de suelo Carta de colores de Munsell | 62 |

LISTA DE TABLAS

| | Pág. |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| Tabla 1. Clasificación de las partículas del suelo según el United States Department of Agriculture. | 27 |
| Tabla 2. Clasificación de resultados permeabilidad e infiltración..... | 29 |
| TABLA 3. Equipos utilizados en el laboratorio y sus usos..... | 38 |
| Tabla 4. Variables de análisis del efecto de las nanopartículas en el suelo | 46 |
| Tabla 5. Resultados de textura del suelo inicial en estudio | 49 |
| Tabla 6. Porcentaje de arena, arcillas y limo presentes en el suelo inicial. | 50 |
| Tabla 7. Resultados de CIC obtenidos para el suelos inicial | 51 |
| Tabla 8. Estimativo de la cantidad de cationes intercambiables en el suelo | 52 |
| Tabla 9. Resultados de los valores de pH del suelo inicial en estudio. | 52 |
| Tabla 10. Clasificación de los resultados del pH del suelo..... | 53 |
| Tabla 11. Resultados de la conductividad eléctrica del suelo inicial..... | 53 |
| Tabla 12. Interpretación de los valores de conductividad eléctrica para suelos | 54 |
| Tabla 13. Resultados obtenidos para materia orgánica del suelo inicial. | 54 |
| Tabla 14. Recuento de colonias representativas presentes en el suelo inicial. | 55 |
| Tabla 15. Análisis de composición elemental de las nanopartículas biosintetizadas por medio de extracto de guayaba. Resultado microscopia electrónica de barrido (SEM). | 59 |
| Tabla 16. Textura del suelo con nanopartículas de plata biosintetizadas con 24 h de contacto..... | 59 |
| Tabla 17. Textura del suelo con nanopartículas de plata biosintetizadas con 48 h de contacto..... | 60 |
| Tabla 18. Análisis de resultados de clases texturales de un suelo con 24 horas de contacto con nanopartículas. | 60 |
| Tabla 19. Análisis de resultados de clases texturales de un suelo con 48 horas de contacto con nanopartículas | 61 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 20. Intercambio Catiónico en un suelo arcilloso en presencia de nanopartículas de plata en solución..... | 64 |
| Tabla 21. Valores de pH en suelo con nanopartículas de plata. | 65 |
| Tabla 22. Valores de conductividad eléctrica en un suelo con nanopartículas de plata..... | 65 |
| Tabla 23. Materia orgánica para un suelo con nanopartículas de plata | 66 |
| Tabla 24. Clasificación de la cantidad de materia orgánica..... | 66 |
| Tabla 25. Porcentajes de crecimiento de colonias en suelo con nanopartículas ... | 67 |
| Tabla 26. Análisis Microbiológico del suelo con nanopartículas de plata..... | 68 |

RESUMEN GENERAL DE TRABAJO DE GRADO

TITULO: EVALUACIÓN DEL EFECTO TÓXICO DE LAS NANOPARTICULAS DE PLATA EN LAS PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS Y MICROBIALES DE UN SUELO ARCILLOSO

AUTOR(ES): CINDY MILENA POVEDA CÉSPEDES

FACULTAD: Facultad de Ingeniería Ambiental

DIRECTOR(A): SANDRA NATALIA CORREA TORRES

RESUMEN

El presente trabajo es el resultado de la evaluación del efecto tóxico de las nanopartículas de plata en las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas de un suelo arcilloso. El trabajo se realizó en tres etapas: en la primera etapa se realizó el muestreo y la caracterización del suelo donde se determinó las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas del suelo arcilloso, identificando que el suelo es francoarcilloso con un color marrón pardo, con un CIC en un nivel medio, un pH fuertemente ácido, conductividad no salina y un porcentaje de materia orgánica alto. La parte microbiológica permitió observar la presencia de bacterias por el método de siembra en superficie en donde se observó un promedio de 138 unidades formadoras de colonia; en la segunda etapa se sintetizó y caracterizó las nanopartículas de plata a partir de extractos vegetales por las técnicas de UV-Vis y SEM. Por último se analizó el efecto de las nanopartículas de plata sintetizadas en las propiedades físicas, químicas y microbiológicas del suelo variando la concentración (0.135 y 0.27 g/ml) y los tiempos de contacto (24 y 48 horas). En la formación de nanopartículas se confirmó presencia de plata a una longitud de onda de 408 a 412 nm por UVVis y por SEM. Respecto a la aplicación de nanopartículas de plata en el suelo se observó cambios en la textura del suelo, se disminuyó la capacidad de intercambio catiónico, al igual que el pH y la conductividad, y una disminución de la materia orgánica. La evaluación microbiológica final demostró reducción de unidades formadoras de colonias desde un 20% en la menor concentración de nanopartículas hasta de un 91% en la mayor concentración de nanopartículas aplicadas al suelo.

PALABRAS CLAVES:

nanopartícula, textura, pH, materia orgánica, longitud de onda, concentración.

V° B° DIRECTOR DE TRABAJO DE GRADO

GENERAL SUMMARY OF WORK OF GRADE

TITLE: TOXIC EFFECT EVALUATION SILVER NANOPARTICLES IN PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES AND MICROBIAL OF A CLAY SOIL

AUTHOR(S): CINDY MILENA POVEDA CÉSPEDES

FACULTY: Facultad de Ingeniería Ambiental

DIRECTOR: SANDRA NATALIA CORREA TORRES

ABSTRACT

This work is the result of the evaluation of the toxic effect of silver nanoparticles on the chemical makeup and microbiological properties of clay soil. The work was done in three stages: The first stage was sampling and identifying the chemical makeup and microbiological properties of the clay soil. The soil is clay loam with a dark Brown color, an average level of CIC, a strong acidic PH level, nonconductive, a high level of salinity, and a high percentage of organic matter. The microbiological properties allowed us to observe the presence of 138 bacterial colonies. In the second stage silver nanoparticles were synthesized from plant extracts by the techniques UVVIS and SEM. Finally, the effect of synthesized silver nanoparticles was analyzed over 24 and 48 hours in the physical, chemical and microbiological properties of the soil by varying the concentration of the silver nanoparticles (0.135 and 0.27 g / ml). In the formation of silver nanoparticles, the presence of a wavelength of 408 to 412 nm was confirmed by the techniques UVVIS and SEM. Regarding the application of silver nanoparticles in the soil, changes in soil texture were observed, the capacity of cation exchange, a decrease in PH and in organic matter. The final evaluation showed a reduction in bacterial colonies from 20% in the lowest concentration and up to 91% the highest concentration of nanoparticles in the soil.

KEYWORDS:

nanoparticle, texture, pH, organic matter, wavelength, concentration.

V° B° DIRECTOR OF GRADUATE WORK

INTRODUCCIÓN

La nanotecnología comprende el estudio, diseño, creación, síntesis, manipulación de materiales, equipos y sistemas funcionales a través del control de la materia en la nanoescala, siendo un nanómetro (nm) la billonésima parte de un metro (Vasquez, 2.009).

Las nanopartículas presentan un desarrollo en la investigación científica debido a que poseen propiedades distintas a sus características volumétricas, dependiendo de su tamaño, la morfología y la distribución, permitiendo crear y mejorar productos, realizando síntesis de nanopartículas de diferentes materiales (Soriano Corral F, 2.011). Existen nanopartículas metálicas de diferentes tipos como cobre, plata, zinc, titanio, oro, especialmente las nanopartículas de plata (Sotiriou GA, 2.010), con gran potencial como agentes antimicrobianos, lo que las hace atractivas en nuevas aplicaciones como aditivos en la industria textil, embalaje de alimentos y agricultura entre otras (Tamayo L, 2.010).

Por consiguiente en este estudio se utilizó la plata ya que se le atribuyen propiedades antimicrobianas, como en la conservación de alimentos, tratamientos en heridas por quemaduras y tratamientos de agua, por ejemplo el caso del nitrato de plata (Etris, 2.009); en la administración de medicamentos para combatir el cáncer y otras enfermedades, la contaminación medioambiental, los microorganismos contaminantes de las aguas residuales, entre otros. El efecto antimicrobiano de la plata en los microorganismos patógenos se da cuando los iones de plata penetran en el interior de la célula a través de unos transportadores de metales presentes en su membrana, compitiendo con ellos por los lugares de captación. Los iones de plata actúan interfiriendo en la permeabilidad gaseosa de la membrana (respiración celular), y una vez en el interior de la célula alteran su sistema enzimático, inhibiendo su metabolismo y producción de energía, y

modificando su material genético. El resultado es que el microorganismo pierde rápidamente toda capacidad de crecer y reproducirse (Sondi I, 2.004).

Teniendo en cuenta las propiedades de las nanopartículas de plata, lo que se desarrolló en este proyecto es un estudio a escala laboratorio en el que se evaluó la toxicidad que presentan las nanopartículas de plata a los organismos presentes en el suelo y un análisis de las variantes que se presentaron en sus propiedades físicas, químicas y biológicas. Existen muchas enfermedades originadas por microorganismos, que potenciadas por el alto nivel de contaminación mundial, conllevan al desarrollo y evolución de otras formas de vida más poderosas y resistentes a tratamientos para su eliminación, creando inmunidad y obligando a desarrollar nuevas tecnologías en productos de eliminación microbiana.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Desde mucho tiempo atrás se ha venido utilizando la plata por sus cualidades antibacterianas en recubrimientos de materiales, además la plata es un elemento de origen natural, no tóxico, hipoalergénico, no se acumula en el cuerpo para causar daño y se considera seguro para el ambiente (Tolliver, 2013).

En la actualidad se le ha visto potencial científico a la plata (Ag) en forma de nanopartículas las cuales son partículas con por lo menos una dimensión menor que 100 nm, no todas son beneficiosas, ya que nanopartículas con misma configuración química pueden tener resultados muy diferentes por el simple hecho de que su estructura superficial varíe un poco. Se calcula que hay por lo menos 600 productos disponibles actualmente en todo el mundo que contiene algún tipo de nanopartícula (Blog., 2.011).

Colombia es un país altamente agricultor y cada cultivo tiene condiciones específicas de mantenimiento y adecuación, se ve la necesidad de realizar investigaciones en suelos que ayuden a disminuir problemas de plagas y microorganismos que afectan el crecimiento y desarrollo de estos. Para de alguna forma mejorar las cosechas minimizando agentes bacterianos, o de otro modo en la utilización de las nanopartículas como materia prima de productos que ayuden en la conservación de las cosechas ya que el objetivo de un agricultor es reducir cualquier factor que ponga en riesgo la calidad de la producción.

Con la ayuda de este proyecto se quiere realizar una prueba piloto con la adición de nanopartículas de plata al suelo para establecer el grado toxico que representan las mismas en un suelo arcilloso. Evaluando su acción en las propiedades física, química y biológica del suelo para de esta forma conocer su comportamiento e identificar un posible uso agrícola.

2. ANTECEDENTES

Las nanopartículas son materiales a escala de átomos, obteniendo propiedades ópticas, electrónicas o magnéticas de interés comercial. La industria ha realizado grandes progresos en el campo de la nanotecnología y cada vez más se usan en multitud de productos y se investigan también para su uso en medicamentos. Permiten rentabilizar las materias primas, miniaturizar determinados aparatos, hacerlos más ligeros y rápidos (Wing, 2.010).

Por otra parte las nanopartículas son similares en escala a los virus y los mecanismos de absorción y transporte en los tejidos son diferentes a los que exhiben los compuestos a macroescala.

A partir del descubrimiento de todas aquellas propiedades que manifiestan las nanopartículas, se ha iniciado una gran ola de investigación en torno a ellas para encontrar y definir los múltiples usos que se les puede asociar a muchas ramas tanto de la ciencia, como de la agricultura, medicina, tecnología y muchas más.

Es el caso del proyecto europeo Nano-ECOTOXICITY (Ortiz, 2.013) en el cual se investiga sobre el impacto de las nanopartículas de plata en organismos del suelo, en su absorción y en sus efectos potenciales. El equipo ha realizado pruebas de toxicidad en lombrices de tierra ya que la mayor parte de investigaciones sobre nanotecnología en el medio ambiente se ha centrado hasta ahora en el medio ambiente acuático, y estudios recientes parecen indicar que los suelos se convertirán en el mayor sumidero ambiental de nanopartículas (Ortiz, 2.013).

Por otra parte en países como Chile, han dado importancia a como se han incorporado nanopartículas a elementos electrónicos como las lavadoras por su capacidad bactericida, en el proceso de lavado fluyendo luego por las cañerías y han centrado la atención en analizar el daño que pueden llegar a producir, por

ejemplo, en el comportamiento de los suelos. El objetivo general del estudio chileno es ver qué tipo de características físico-químicas y tipo de suelo podrían afectar en mayor medida la movilidad de contaminantes transportados por nanopartículas a nivel trazas. Buscan diferenciar posibles rutas de contaminación para después, llegar a predecir qué determinada característica del suelo con este ingrediente, genera un toxico en el tiempo, o al contrario, estabiliza el sistema (Jiménez, 2.013).

Así mismo la contribución de este estudio, manifiestan que la información generada puede servir para prepararnos ante posibles eventos, como tratar contaminantes en determinado suelo o producir un fertilizante inteligente que permita mejorar el rendimiento del cultivo, entre otros (Jiménez, 2.013).

Por otra parte *Feng et ál.*, reportaron estudios de la inhibición de iones de plata contra dos cepas de bacterias, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Para esto, las cepas de ambas bacterias se inocularon en el medio Luria Bertoni (LB) y se incubaron a 37°C en agitador rotatorio (200 rpm) durante 16 h. En éste estudio se concluyó que los iones de plata penetran por la pared celular en donde se da la reacción de ADN con las proteínas de tiol, ocasionando que no se diera el proceso de replicación y /o la muerte celular (Feng Q, 2000).

En el año 2005, se descubren nuevos métodos de síntesis para las nanopartículas. Baker et ál., reportaron la síntesis de nanopartículas por la condensación de gas inerte y las técnicas de co-condensación. Se probó la eficacia antibacteriana de las nanopartículas frente a *E. coli* en medio líquido y sólido. Se observó que las nanopartículas exhiben actividad antibacteriana a bajas concentraciones (Baker C, 2005).

Para el año 2006, el auge de las nanopartículas de plata era tanto que se probaron en distintas bacterias para comparar su efectividad. Así lo hizo Panacek et ál., quienes reportaron un protocolo de un solo paso, con la reducción del catión

complejo [Ag] por cuatro sacáridos para la síntesis de nanopartículas de plata. A partir de éste estudio se encontró una alta actividad antimicrobiana y bactericida de las nanopartículas de plata tanto en las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas(. Panacek A, 2006).

3. JUSTIFICACIÓN

El crecimiento de la población mundial, el aumento de la necesidad alimenticia causó hace aproximadamente 30 años el inicio de la revolución verde que tenía como única prioridad el aumento de la cantidad de alimentos a todo costo. Desde entonces realmente se ha podido ver en el mundo un cambio extraordinario en la tecnología agropecuaria e indudablemente un aumento en la producción. Pero al mismo tiempo también empezaron a aparecer efectos negativos no calculados.

Para poder aumentar la producción había que aumentar notablemente la aplicación de insumos agrícolas. Como las plantas se alimentan de los nutrientes en el suelo y avanzan en su crecimiento según la disponibilidad de estos nutrientes en el lugar, se empezó a utilizar fertilizantes sintéticos en grandes cantidades ocasionando la erosión del suelo ya que este no logra realizar la captación de todos los compuestos.

Así mismo el aumento de la producción agrícola y especialmente la producción en monocultivos ha creado un aumento extraordinario de insectos-plagas. En la naturaleza no existen plagas, se habla de plaga cuando un animal, una planta o un microorganismo, aumenta su densidad hasta niveles anormales y afecta directa o indirectamente a la especie humana, ya sea porque perjudique su salud, su comodidad, dañe las construcciones o los predios agrícolas, forestales o ganaderos, de los que el ser humano obtiene alimentos, forrajes, textiles, madera, entre otros. Un animal se convierte en plaga cuando aumenta su densidad de tal manera que causa una pérdida económica al ser humano.

Los daños económicos provocados por las plagas han asolado a los agricultores desde el comienzo mismo de la agricultura, con pérdida de productividad, ingresos e inversiones (Brechelt, 2.014).

El consumidor ha empezado a reclamar productos sanos, el agricultor reclama más seguridad y el ecologista demanda la protección del medio ambiente. Ahora se sabe, que solamente una integración hacia las condiciones naturales va a permitir una producción estable, ecológicamente sana, económicamente rentable y permanente (Brechelt, El Manejo Ecológico de Plagas y enfermedades, 2.014).

Con respecto a esto solo queda implementar estudios científicos en el suelo que nos permitan encontrar nuevas soluciones a estas problemáticas, soluciones ecoamigables que aseguren la estabilidad de la producción agrícola sin causar daños irreparables a los seres humanos y al medio ambiente.

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, se busca con esta investigación evaluar la toxicidad que presenten las nanopartículas de plata biosintetizadas a partir de extractos de plantas al aplicarlas en un suelo. Para de esta forma determinar la viabilidad de la utilización de este compuesto como materia prima en la fabricación de materiales que ayuden en los procesos agrícolas en la disminución o posible eliminación de bacterias que afecten los cultivos. Por otra parte se pueden optar por la posibilidad según los resultados de que las nanopartículas de plata sirvan en la fabricación de empaques o embalajes que ayuden en la conservación y preservación de los productos agrícolas finales gracias a sus propiedades antimicrobiales.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto tóxico de las nanopartículas de plata en un suelo arcilloso, con el fin de determinar el grado de afectación en sus propiedades físicas, químicas y microbiológicas.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las propiedades físico-químicas y microbiológicas iniciales del suelo arcilloso, para la aplicación de las nanopartículas.
- Sintetizar y caracterizar las nanopartículas de plata a partir de extractos vegetales, para su aplicación en el suelo arcilloso.
- Analizar el efecto de las nanopartículas de plata sintetizadas en las propiedades físicas, químicas y microbiológicas del suelo arcilloso.

5. MARCO TEORICO

5.1 GENERALIDADES DE LAS NANOPARTÍCULAS

Durante las últimas décadas, la investigación en ciencia y tecnología se ha centrado en la fabricación de estructuras atómicas y materiales a escalas manométricas ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$), lo que comúnmente se conoce como Nanotecnología. Esta nueva ciencia multidisciplinar proporciona productos con nuevas propiedades fisicoquímicas diferentes a las de las moléculas individuales o sólidos de la misma composición (TECEDOR, 2013). La segunda revisión de la normativa sobre los nanomateriales (Comisión Europea, 2012), define nanomaterial como «un material natural, secundario o fabricado que contenga partículas, sueltas o formando un agregado o aglomerado y en el que el 50% o más de las partículas en la granulometría numérica presente una o más dimensiones externas en el intervalo de tamaños comprendido entre 1 nm y 100 nm».

Las fuentes de nanopartículas (NPs) pueden ser clasificadas como naturales o como derivadas de actividades antropogénicas intencionales o accidentales. En teoría, las NPs pueden ser producidas a partir de casi cualquier producto químico, sin embargo, la mayoría de las NPs que están actualmente en uso hoy en día, han sido fabricadas a partir de metales de transición, silicio, carbono y óxidos de metal. Según Lux Research Inc, los nanotubos de carbón, los fullerenos, los nanomateriales que contienen metales (incluyendo cerámicas y puntos cuánticos) y los dendrímeros son los nanomateriales más importantes (Haza, 2013).

Las propiedades exhibidas por los “nanomateriales” son inmensamente diferentes a las que exhiben estos mismos materiales en una macroescala. Las NPs poseen una mayor relación de superficie-volumen y por tanto una mayor superficie de

contacto con el entorno. Esto hace que los nanomateriales sean muy atractivos para su explotación en múltiples sectores y que la nanotecnología se expanda a un gran ritmo. Así, se ha pasado en muy poco tiempo de una situación en la que prácticamente no existían nanomateriales en nuestro entorno, a estar rodeados por una gran variedad de productos que los contienen en su composición (Ávalos, 2.013).

El desarrollo de la nanotecnología, tiene que ir acompañado de estudios de toxicidad que permitan conocer los efectos que estas NPs van a tener tanto en la salud humana como en el medio ambiente. Actualmente no existe ninguna legislación específica sobre la nanotecnología y los nanomateriales. La Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria recomienda establecer la necesidad de desarrollar, mejorar y validar metodologías rutinarias para estudiar en profundidad la toxicidad de las NPs, dado el gran número de nuevos nanomateriales que hay en el mercado. Además, es muy importante considerar el posible paso de las NPs a los alimentos. Por ello, se sugería que la evaluación del riesgo potencial de las NPs debe realizarse caso por caso de forma individual, teniendo en cuenta el nanomaterial, su tamaño y si van a ingerirse como tal, ya que entonces serían necesarios estudios de toxicidad y genotoxicidad apropiados (Ávalos, 2.013).

5.2 APLICACIONES DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AGNPS)

La plata (Ag) ha sido ampliamente utilizada desde hace miles de años en la historia de la humanidad, en aplicaciones como la joyería, utensilios, fotografía, etc. Incluso civilizaciones antiguas como los griegos utilizaban la plata para cocinar y mantener la seguridad del agua. Sus propiedades antimicrobianas ya se explotaban antiguamente con la medicina tradicional (Pérez-Santalla, 2013).

En los últimos años, la plata ha ganado mucho interés debido a su buena conductividad, estabilidad química y su actividad catalítica y antibacteriana. Las nanopartículas de plata (AgNPs) se están convirtiendo en una de las categorías de productos de mayor crecimiento en la industria de la nanotecnología, según un informe de investigación de mercado realizado por Bourne research. Su fuerte actividad antimicrobiana es la principal característica para el desarrollo de productos con AgNPs, actualmente, una amplia categoría de productos se encuentran disponibles en el mercado. En el ámbito médico, existen apósitos para heridas, dispositivos anticonceptivos, instrumental quirúrgico y prótesis óseas, todos ellos recubiertos o integrados con AgNPs para así evitar el crecimiento bacteriano. Además, también se está evaluando la utilización de las AgNPs contra el tratamiento de enfermedades que requieren una concentración mantenida de fármaco en sangre o con un direccionamiento específico a células u órganos, como ocurre con el virus del VIH-1, ya que ha sido demostrado que el tratamiento in vitro con AgNPs interacciona con el virus e inhibe su capacidad para unirse a las células del huésped. En la vida diaria los consumidores pueden tener contacto con las AgNPs contenidas en aerosoles, detergentes, frigoríficos, lavadoras, chupetes, sistemas de purificación de aguas, pinturas para paredes y productos cosméticos. (Ávalos, 2.013)

Por otra parte se le está dando otro enfoque industrial a las AgNPs en el desarrollo de películas poliméricas para empaquetado de alimentos con propiedades antimicrobianas, sintetizando nanopartículas de plata con nanocompuestos de polietileno para envases de alimentos, presentándose como un material capaz de liberar agentes antimicrobianos que puedan inhibir el crecimiento de microorganismos y al mismo tiempo, otorgar a los alimentos resistencia a estos. (Rabagliati F, 2010)

Finalmente se puede decir, que aunque en la actualidad el principal uso de las nanopartículas de plata se realiza en el campo biológico como agente antimicrobiano,

se conocen algunos usos en campos de la medicina, tratamientos de agua, en la administración de medicamentos para combatir el cáncer y otras enfermedades, la contaminación medioambiental, los microorganismos contaminantes de las aguas residuales, entre otros (ESTIIC, Aplicaciones Industriales de la Nanotecnología, 2006).

5.3 PROPIEDADES DEL SUELO

Para realizar un muestreo adecuado de suelos es importante definir los objetivos del estudio a realizar, de igual forma, la información previa que se dispone sobre el sitio de estudio es de gran importancia para obtener resultados más exactos. El propósito del muestreo y del posterior análisis de las muestras, es el de proporcionar información fundamental acerca del suelo y de sus características con una precisión aceptable (Muskus A. , Manual de laboratorio de analisis de suelos, 2.012). La investigación a realizar es de tipo exploratoria y el tipo de muestreo es un muestreo simple con una distribución de áreas sistemática o regular, en donde se realizara un total de 9 submuestras.

5.3.1 Propiedades físicas del suelo. El suelo es una mezcla de materiales sólidos, líquidos (agua) y gaseosos (aire). La adecuada relación entre estos componentes determina la capacidad de hacer crecer las plantas y la disponibilidad de suficientes nutrientes para ellas. Las propiedades físicas del suelo donde podrían actuar las nanopartículas son: la textura, color, y permeabilidad e infiltración.

5.3.1.1 Textura: La textura es la proporción de los tamaños de los grupos de partículas que lo constituyen y está relacionada con el tamaño de las partículas de los minerales que lo forman y se refiere a la proporción relativa de los tamaños de varios grupos de partículas de un suelo. Esta propiedad ayuda a determinar la facilidad de abastecimiento de los nutrientes, agua y aire que son fundamentales para la vida de las plantas. El procedimiento analítico mediante el que se separan las partículas de una muestra de suelo se le llama análisis mecánico o granulométrico y consiste en determinar la distribución de los tamaños de las partículas. Este análisis proporciona datos de la clasificación, morfología y génesis del suelo (Barbosa, 2.011).

Tabla 1. Clasificación de las partículas del suelo según el United States Departament of Agriculture.

| Nombre de la partícula límite del diámetro en milímetros | TAMAÑO |
|-----------------------------------------------------------------|----------------|
| Arena | 0.05 a 2.0 |
| Muy gruesa | 1.0 a 2.0 |
| Gruesa | 0.5 a 1.0 |
| Mediana | 0.25 a 0.5 |
| Fina | 0.10 a 0.25 |
| Muy fina | 0.05 a 0.10 |
| Limo | 0.002 a 0.05 |
| Arcilla | menor de 0.002 |

Fuente: (Barbosa, 2.011)

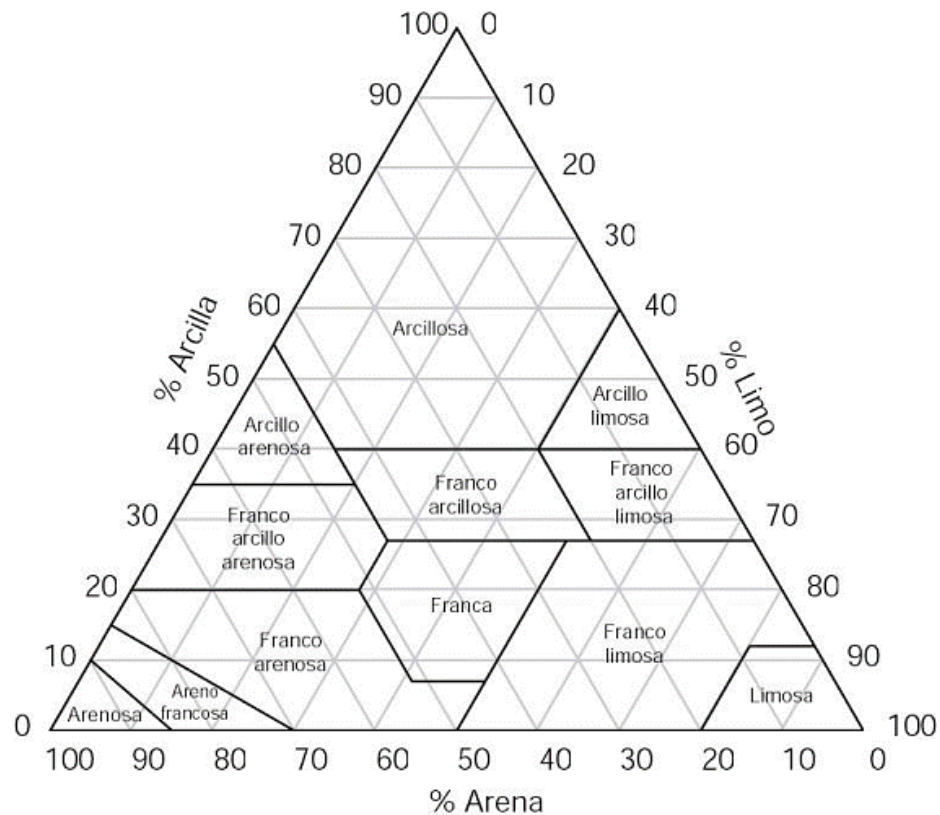


Figura 1. Triángulo textural según clasificación del USDA

Fuente: (Barbosa, 2.011)

5.3.1.2 Color: Los suelos en su mayoría son de color oscuro, pero a medida que se profundiza se aclara. Cuando son de color oscuro es porque cuentan con mayor cantidad de materia orgánica. Si su textura es de tonalidades rojizas, pardas o amarillentas, quiere decir que poseen una ventilación mayor y no se saturan (Moreno Ramón, Blanquer, & Ibáñez Asensio, 2005).

Por otra parte los que se saturan son de colores grises y manchados de verde azulado. Las regiones húmedas tienen suelos de tonos claros que indican baja productividad y un mal desarrollo de las plantas.

La determinación del color se realizara mediante el sistema Munsell que consiste en la comparación de la muestra con las plaquitas de colores que componen cada una de las hojas de Matiz. Se evalúa el color predominante (color de la matriz del suelo), que se corresponde con el que ocupa más de 50% del volumen del suelo. Cuando existen varios colores, donde ninguno de ellos corresponde a más de 50% del volumen, se determinan todos los colores, comenzando con el que ocupa el mayor porcentaje (Viani, 2.003).

5.3.1.3 Permeabilidad e infiltración: La permeabilidad del suelo es la habilidad con que el agua y el aire se movilizan en el suelo. Cuando un suelo se satura es porque tiene permeabilidad muy lenta (FUNACH-ASCAPAM, 2.002).

La infiltración es la velocidad máxima con que el agua penetra en el suelo. La capacidad de infiltración depende de muchos factores; un suelo desagregado y permeable tendrá una capacidad de infiltración mayor que un suelo arcilloso y compacto.

Si una gran parte de los poros del suelo ya se encuentran saturados, la capacidad de infiltración será menor que si la humedad del suelo es relativamente baja.

Se clasifican los resultados de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 2. Clasificación de resultados permeabilidad e infiltración

| VELOCIDAD DE INFILTRACION (cm/h) | VELOCIDAD DE INFILTRACION (mm/h) | PERMEABILIDAD | CLASE DE INFILTRACION |
|----------------------------------|----------------------------------|----------------------|-----------------------|
| < 0.1 | <1 | Muy lenta | Ar |
| 0.1 – 0.5 | 1-5 | Lenta | Ar, ArL |
| 0.5 – 2 | 5-20 | Moderadamente lenta | FAr, FArL |
| 2 – 6.3 | 20-63 | Moderada | FArA |
| 6.3 – 12.7 | 63-127 | Moderadamente rápida | FA |
| 12.7 – 25.4 | 127-254 | Rápida | AF |
| >25.4 | >254 | Muy rápida | AF, A |

Fuente: Hugo Eduardo Castro Franco 1998 (Muskus A. , Determinacion de las propiedades fisicas del suelo: Permeabilidad e Infiltracion, 2.013)

5.3.2 Propiedades químicas del suelo

5.3.2.1 Capacidad de intercambio catiónico: La Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC) es una medida de cantidad de cargas negativas presentes en las superficies de los minerales y componentes orgánicos del suelo (arcilla, materia orgánica o sustancias húmicas) y representa la cantidad de cationes que las superficies pueden retener (Ca, Mg, Na, K, NH₄ entre otros). Estos serán intercambiados por otros cationes o iones de hidrogeno presentes en la solución del suelo y liberados por las raíces. El nivel de CIC indica la habilidad de suelos a retener cationes, disponibilidad y cantidad de nutrientes a la planta, su pH potencial entre otras. Un suelo con bajo CIC indica baja habilidad de retener nutrientes, arenoso o pobre en materia orgánica. La unidad de medición de CIC es en centimoles de carga por kg de suelo cmolc/kg o meq/ 100g de suelo (Ibáñez, 2008).

El cálculo de CIC de una muestra se realiza por medio de las siguientes ecuaciones:

$$CIC\left(\frac{meq}{100\ g}\right) = \frac{[(V - B) \times N_{soda}] \times 100}{pm}$$

$$CIC\left(\frac{meq}{100\ g}\right) = \frac{[(V - B) \times 0.1] \times 100}{5}$$

V= volumen de la soda gastada en la muestra

B= volumen de la soda gastada en el blanco

N= normalidad de la soda

(Muskus A. , Determinacion de la capacidad de intercambio cationico en una muestra de suelo, 2.013)

5.3.2.2 pH: El pH (potencial de hidrógeno) determina el grado de adsorción de iones (H⁺) por las partículas del suelo e indica si un suelo está ácido o alcalino. La acidez del suelo es el indicador principal en la disponibilidad de nutrientes para las plantas, influyendo en la solubilidad, movilidad, disponibilidad y de otros constituyentes y contaminantes inorgánicos presentes en el suelo. El valor del pH en el suelo oscila entre 3,5 (muy ácido) a 9,5 (muy alcalino). Los suelos muy ácidos (<5,5) tienden presentar cantidades elevadas y tóxicas de aluminio y manganeso. Los suelos muy alcalinos (>8,5) tienden a dispersarse. La actividad de los organismos del suelo es inhibida (Ibañez, 2.007).

5.3.2.3 Carbono orgánico del suelo: El carbono orgánico del suelo mejora las propiedades físicas del suelo, aumenta la Capacidad de Intercambio Catiónico, la retención de humedad y contribuye con estabilidad de suelos arcillosos al ayudar a aglutinar las partículas para formar agregados. La materia orgánica del suelo (MOS) está compuesta en mayoría de carbono, tiene una capacidad de retener una gran proporción de nutrientes, cationes y oligoelementos esenciales para el crecimiento de las plantas. Gracias a la MOS la lixiviación de nutrientes se inhibe y es integral a los ácidos orgánicos que disponibilizan los minerales para las plantas y regulador del pH del suelo. Se reconoce globalmente que el tenor de carbono orgánico en el suelo sea un factor fundamental para la salud del suelo, forma parte fundamental del Ciclo de Carbono (FAO, 2.009).

5.3.3 Propiedades microbiológicas del suelo. En un suelo fértil podemos encontrar raíces de plantas superiores, diversos animales y una gran cantidad de microorganismos. Se ha establecido que los suelos con alto contenido de materia orgánica tienden a contener más organismos con demandas complejas, y que la fracción del suelo asociada a las raíces de las plantas (Rizósfera del suelo) posee un nivel más elevado de organismos con exigencias simples. En la rizósfera, donde son más abundantes los nutrientes orgánicos que en el conjunto del suelo, las algas son uno de los pocos grupos cuyo número disminuye. La flora fúngica libera generalmente menos CO₂ por unidad de carbono transformado aeróbicamente que los otros grupos microbiológicos, pues los hongos son más eficientes en su metabolismo (IGAC, 1993). Cientos de especies de hongos se encuentran en el suelo, generalmente cerca de la superficie donde prevalece una condición aerobia. Los hongos son los descomponedores de celulosa, lignina y pectina. La importancia del hongo en el suelo es que mejora la estructura física mediante la acumulación de sus micelios en él. Además los hongos forman unos agregados que ayudan a retener agua (Alba Gutiérrez Girón(UCM), 2.013). Por otra parte las bacterias exceden la población de todos los otros grupos de microorganismos. Encontramos todo tipo de bacterias desde autotróficas, heterotróficas, aerobias y anaerobias. Las bacterias que proliferan en la rizósfera compiten por nitrógeno y además utilizan los materiales orgánicos liberados por las raíces (Gosz y Fisher, 1984, citados por Tisdall, 1996).

La evaluación microbiológica del suelo se realizara en laboratorio por medio de inoculaciones en cajas Petri de diferentes diluciones a partir de un gramo del suelo a estudiar. Con el método de siembra en superficie en cajas de Petri (Delgado, 2.013).

El método a utilizar es siembra de superficie el cual se basa en se vierte sobre una placa de Petri el medio de cultivo fundido, se deja solidificar y se coloca sobre la

superficie el inóculo. Con ayuda de una espátula de Drigalsky se extiende el inóculo hasta su absorción total por el medio de cultivo (Santambrosio E. , 2.009).

Sembrar o inocular es introducir artificialmente una porción de muestra (inóculo) en un medio adecuado, con el fin de iniciar un cultivo microbiano, para su desarrollo y multiplicación. Una vez sembrado, el medio de cultivo se incuba a una temperatura adecuada para el crecimiento.

Las reglas fundamentales para efectuar la siembra exigen:

Que se efectúen asépticamente

Que los medios de cultivo y el instrumental a utilizar estén esterilizados

Que se realicen solo los manipuleos indispensables

Que se trabaje fuera de toda corriente de aire. De ser posible utilizando un mechero o bien Flujo laminar (Santambrosio E. , 2.009).

5.4 SÍNTESIS DE NANO-PARTÍCULAS DE PLATA

Las partículas manométricas son una nueva clase de materiales, los cuales cuentan con propiedades que llegan a ser muy atractivos desde un punto de vista tecnológico. Debido a las diversas aplicaciones que estos materiales pueden tener (médicas, electrónicas, catalíticas, ópticas, magnéticas, etc.) su estudio se visualiza como uno de los de mayor proyección tecnológica en la actualidad y en los años por venir.

La manipulación de las condiciones de síntesis permite el control racional del tamaño y la forma de las partículas y provee los medios para adaptar las propiedades de los materiales a una aplicación específica, otro aspecto fundamental de la síntesis de nanopartículas es su estabilización, de tal manera que pueda mantenerse su tamaño y su forma en función del tiempo. Debido a sus propiedades físicas y químicas únicas, las nanopartículas son con frecuencia descritas como átomos artificiales (Alivisatos, 1996; Banin et al., 1999; Collier et al., 1997). Los avances en los procesos de síntesis han permitido el control preciso sobre los parámetros estructurales que gobiernan la formación de las nanopartículas lo que ha permitido adaptar las propiedades de estos átomos artificiales de acuerdo con su uso específico. La síntesis y el ensamblado modular de nanopartículas permite explotar sus propiedades únicas, lo que puede llevar a nuevas aplicaciones en catálisis, electrónica, fotónica, magnetismo así como censado químico y biológico (Zanella, 2.012).

Los procedimientos actuales que permiten la elaboración de nanomateriales son clasificados en cuatro categorías: procedimientos mecánicos, físicos, químicos y biológicos (González et al., 2009; Aguilar, M. 2009). Para efectos del trabajo a realizar en esta investigación se realizara la síntesis de nanopartículas de plata por

procedimiento biológico, con ayuda de un extracto de material vegetal y como estabilizador de pH con NaOH 2M.

5.4.1 Método biológico. La síntesis biológica de nanomateriales ha sido una buena opción para la obtención de dichas materias, ya que estos resultan ser más amigables con el medio ambiente. En la biosíntesis se involucran microorganismos como las bacterias, hongos y levaduras o extractos de plantas, los cuales logran la reducción de varios tipo de iones metálicos (Sastry et al., 2003).

Los organismos vivos pueden llegar a producir nano-partículas intra o extracelular, siendo ésta última la más implementada por los investigadores debido su bajo costo y por ser más adaptable (Basavaraja et al., 2008).

El empleo de extractos de plantas como agentes reductores, pueden llegar a ser una vía más rápida que la implementación de microorganismos para la preparación de nano-partículas. De acuerdo con Narayanan y Sakthivel (2008), es posible obtener AgNPs en un tiempo de 12 horas a partir de hojas de cilantro (Aguilar, M. 2009).

5.5 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE NANO-PARTÍCULAS METÁLICAS

El estudio a nivel de cualquier molécula requiere la implementación de técnicas analíticas la cuales permitan una determinación cualitativa y cuantitativa como lo son las caracterización físico-química y biológica.

5.5.1 Espectrofotometría Ultravioleta Visible. En método de espectrofotometría Ultravioleta Visible (UV-Vis) se pueden identificar y cuantificar biomoléculas en soluciones y en muestras biológicas, utilizando reactivos específicos que reaccionan con el compuesto a analizar, el cual forma un producto coloreado que permite detectarlo.

Las moléculas a analizar deben presentar una capacidad para absorber radiación. Las longitudes de onda que puedan llegar a ser adsorbidas por las partículas dependen de las condiciones del medio como el pH, temperatura, fuerza iónica, y su constante dieléctrica.

Las moléculas pueden absorber energía luminosa y almacenarla en forma de energía interna. Lo cual logra el funcionamiento de los ciclos vitales como la fotosíntesis en plantas y bacterias. Cada molécula tiene una serie de estados excitados que la distingue del resto de moléculas y permite la captación máxima de energía. Por tal motivo el espectro de adsorción es el fenómeno que presenta una molécula al ser sometida a diferentes longitudes de onda (Aguilar, M. 2009).

5.5.2 SEM microscopio electrónico de barrido. En método de espectrofotometría UV-vis se pueden identificar y cuantificar biomoléculas en soluciones y en muestras biológicas, utilizando reactivos específicos que reaccionan con el compuesto a analizar, el cual forma un producto coloreado que permite detectarlo.

Las moléculas a analizar deben presentar una capacidad para absorber radiación. Las longitudes de onda que puedan llegar a ser adsorbidas por las partículas dependen de las condiciones del medio como el pH, temperatura, fuerza iónica, y su constante dieléctrica.

Las moléculas pueden absorber energía luminosa y almacenarla en forma de energía interna. Lo cual logra el funcionamiento de los ciclos vitales como la

fotosíntesis en plantas y bacterias. Cada molécula tiene una serie de estados excitados que la distingue del resto de moléculas y permite la captación máxima de energía. Por tal motivo el espectro de adsorción es el fenómeno que presenta una molécula al ser sometida a diferentes longitudes de onda (Aguilar, M. 2009).

Las películas de colágeno también son usadas tradicionalmente en la preparación de envolturas comestibles (Tharanathan, 2003). El colágeno es el mayor constituyente de la piel, tendones y tejidos conectivos, y se encuentra extensamente distribuido en las proteínas fibrosas de los animales. Usualmente, películas de un grosor aproximado de 2.5 mm, se fabrican por varios métodos y estas estructuras membranosas delgadas son utilizadas para cubrir los alimentos o como medio de separación (Johnson et al., 2001).

La fermentación bacteriana de la glucosa y la alimentación con ácido acético durante el almacenamiento da un novedoso poliéster termoplástico llamado polihidroxibutirato (PHB), el cual, sólo o en combinación con plásticos sintéticos o con almidón, produce excelentes películas para empaques (Tharanathan, 2003).

6. METODOLOGÍA

La metodología que se utilizó en el proyecto se dividió en tres fases: la primera fase es la determinación de las características físicas, químicas y microbiológicas del suelo en estudio para conocer su estado inicial; la fase segunda es proceso de síntesis y caracterización de las nano partículas de plata a partir de extractos vegetales y la fase cuarta es la aplicación de las nanopartículas en el suelo; presentadas en la figura 2 y en la tabla 4 se presenta los equipos utilizados en el laboratorio.

TABLA 3. Equipos utilizados en el laboratorio y sus usos

| EQUIPO | USO |
|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| Balanza OHAUS gold series | Pesaje de muestras de suelo. |
| PH metro HACH HQ40d | Determinar Ph y conductividad |
| Centrífuga HERMELE Z206AA | Proceso de síntesis de nanopartículas |
| Vaso agitador HAMILTON BEACH | Proceso de determinación de textura del suelo. |
| Horno BINDER | Secado de muestras para establecer materia orgánica. |
| Balanza analítica METTLER TOLEDO MS204S | Pesaje de muestras de suelo. |
| Cámara extractora de gases EXTRACTOR CEX 120 | Realizar determinación de CIC y materia orgánica del suelo. |
| Espectrofotómetro HACH DR500 | Caracterización de nanopartículas de plata. |
| Cabina de bioseguridad ESCO CLASS II BSC | Proceso de inoculación de muestras en cajas Petri. |

| | |
|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| Horno MEMERT UN 110 | Esterilización de material de vidrio. |
| Incubadora WTC BINDER | Cajas Petri inoculadas. |
| Autoclave GEMMY STURDY SA-300VL | Esterilización de tubos de ensayo y plate count. Limpieza de cajas Petri. |

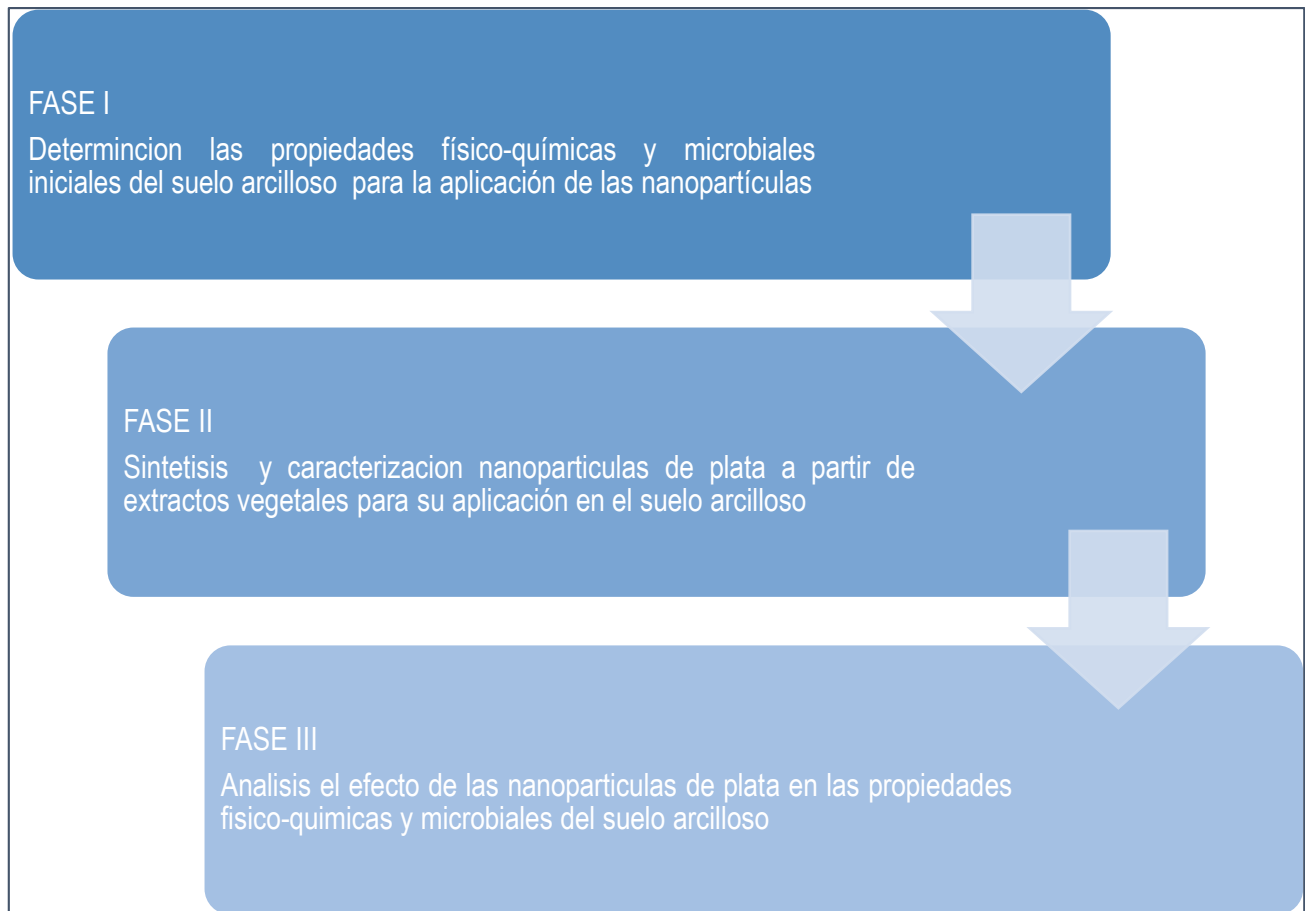


Figura 2. Metodología aplicada en la evaluación del efecto tóxico de las nanopartículas de planta en las propiedades del suelo arcillosos. Fuente: Autor

6.1 FASE I Determinación de las características físicas, químicas y microbiológicas del suelo en estudio.

En la primera fase se desea conocer las características físicas y químicas como: textura, pH, conductividad, Color, Materia Orgánica (MO), Intercambio Catiónico (C.I.C), entre otras del suelo de estudio. Entre las características microbiológicas del suelo en estudio para conocer su estado inicial se analizó la cantidad de unidades formadoras de colonia, que es un valor que indica el grado de contaminación microbiológica de un ambiente. Expresa el número relativo de microorganismos de un taxón determinado en un volumen de un metro cúbico de agua, por el método sembrado por superficie (Bianchi, 2011).

6.1.1 Determinación de textura del suelo por el método de Bouyoucos

Consiste en la obtención de los porcentajes en que se encuentran los diferentes separados del suelo, de acuerdo con el peso de una muestra seca del mismo. El hidrómetro estandarizado para este análisis es el ASTM-152H (Forsythe, 1975) y las condiciones analíticas para las cuales fue calibrado son: temperatura de 19.4 °C; con una densidad de partículas de 2.65 g/cm³ ; el medio de suspensión es agua, con $\delta w = 1 \text{ g/cm}^3$ y $n = 0.01 \text{ g/cm}^3 \text{ s}^{-1}$.

El suelo pesado fue de 50 g y se adicionó en el vaso de aluminio de la batidora, se agregó 100 ml de agua corriente y 10 ml de agente dispersante que está formado por 35.45 g de Hexametáfosfato de Sodio (NaPO₃)₆ y 7.94 g de Carbonato de Sodio Anhídrido (Na₂CO₃). La mezcla del suelo con el agente dispersante se disolvió y se pasó a 1 litro con agua destilada. La mezcla con el suelo se batió durante 10 minutos. La suspensión- obtenida se pasó a un cilindro de 1000 mL, completando el volumen con el hidrómetro sumergido. La solución se agitó durante 1 minuto con ayuda del agitador de pistón dejando reposar por 40 segundos e introduciendo el hidrómetro. Después de los 40 segundos se realizó la primera lectura, teniendo en cuenta la temperatura de la suspensión, con esta lectura se calculó el % de arena. A las dos

horas y sin disturbar se tomó la segunda lectura del hidrómetro y del termómetro, con esta lectura se calculó el % de arcilla.

6.1.2 Determinación del Color del suelo

La determinación del color se realizó mediante el sistema Munsell que consiste en la comparación de la muestra del suelo con placas de colores que componen cada una de las hojas de Matiz. EL color que se selecciona es el color predominante (color de la matriz del suelo), que corresponde al que ocupa más de 50% del volumen del suelo.

6.1.2 Determinación del pH y Conductividad

Para la determinación del pH se utilizó el método potenciométrico que consiste en medir la diferencia de potencial que se establece entre la solución del suelo problema y una solución cuya concentración de iones de hidrogeno se conoce. El potenciómetro es un aparato eléctrico que mide la diferencia de potencial entre dos electrodos en contacto con una solución. La medición de conductividad eléctrica detecta la cantidad de aniones o cationes en solución. Cuanto mayor es la cantidad de aniones o cationes mayor es la lectura de la conductividad eléctrica. Para el crecimiento de plantas los valores aceptables de conductividad eléctrica están entre 0 y 0.8 Ds/M.

Para la medición de pH y de la conductividad del suelo se colocaron 30 g de suelo seco en un beaker de 100 ml, se adicionaron 30 ml de agua destilada, esta suspensión se agitó por aproximadamente 5 minutos y se dejó reposar por una hora. Al terminar el tiempo se reposo de la suspensión se leyó en el potenciómetro los valores de pH y de Conductividad. Para lograr una mejor exactitud en los resultados se realizó el mismo procedimiento con 30 ml de KCl 1 N, utilizado como patrón de análisis. La variación del pH fue calculada por la ecuación (3):

$$\Delta PH = pH \text{ en KCl} - pH \text{ en H}_2\text{O} \text{ (1)}$$

6.1.3 Determinación de intercambio Catiónico del suelo

Para el análisis de Intercambio catiónico se pesó 5 g de suelo en un erlenmeyer, se agregó 25 ml de acetato de amonio y se dejó en reposo durante un día y se filtró. El filtrado se desechó y se lavó el exceso de sal amónica con porciones de 10 ml de alcohol etílico sin dejar secar. El filtrado se desechó y se agregó 5 porciones de 10 mL de cloruro de sodio en un recipiente limpio sin dejar secar entre cada adición. Al filtrado obtenido se le agregó 10 mL de formaldehído, 3 gotas de fenolftaleína y se tituló con hidróxido de sodio 0.1; hasta obtener un color rosado pálido permanente y se llevó un blanco de reactivos sin la adición del suelo. Las ecuaciones utilizadas para el cálculo de CIC en el suelo son:

$$IC \left(\frac{meq}{100 g} \right) = \frac{[(V-B) \times N_{soda}] \times 100}{pm} \quad (2)$$

$$CIC \left(\frac{meq}{100 g} \right) = \frac{[(V-B) \times 0.1] \times 100}{5} \quad (3)$$

Donde

V= Volumen de la soda gastada en la muestra

B= Volumen de la soda gastada en el blanco

N= Normalidad de la soda.

6.1.4 Determinación la Materia Orgánica del suelo

Para la determinación de la materia orgánica del suelo se secó la muestra previamente por 24 horas a 45 °C, se macero y se pasó por un tamiz No. 60 o de 0.25 mm de diámetro. En un erlermeyer de 300mL se colocó 0.30 gramos de suelo de la muestra seca. El procedimiento fue repetido para obtención del blanco pero sin muestra de suelo. A las muestras preparadas se les adicionó 5 mL de dicromato

de potasio (KCrO_7) 1N, adicionalmente se les añadió 10 mL de H_2SO_4 concentrado, y se agito durante un minuto. Esta muestra se dejó reposar por media hora, y se agregó 70 ml de H_2O y 3 ml de H_3PO_4 AL 85% y 0.5 mL de indicador. La muestra de suelo fue titulada con una solución ferrosa para conocer la normalidad del sulfato ferroso. En la titulación se espera que partiendo de un color azul oscuro pase a un verde brillante. Para la cuantificación de la materia orgánica se calcula la normalidad de la solución ferrosa y el porcentaje de carbono para poder determinar el porcentaje de materia orgánica utilizando las siguientes ecuaciones (4, 5 y 6):

NORMALIDAD FERROSA

$$N \text{ solución ferrosa} = \frac{V_{K_2Cr_2O_7} \times N_{K_2Cr_2O_7}}{V \text{ solución ferrosa}} \quad (4)$$

PORCENTAJE DE CARBONO %C

$$\%C = \frac{(B-M) \times N \times 0.003 \times 1.3 \times 100}{pm} \quad (5)$$

DETERMINACION DE LA MATERIA ORGANICA

$$\% MO = \% C \times 1.724 \quad (6)$$

Dónde:

B= Volumen de solución ferrosa gastada en el blanco

M= Volumen de solución ferrosa gastada en la muestra

N= Normalidad de la solución ferrosa

1.3= Eficiencia de la reacción es del 77%

Pm= Peso de la muestra en gramos

6.2 FASE II. Síntesis y caracterización de las nanopartículas de plata a partir de extractos vegetales, para su aplicación en el suelo arcilloso.

En la segunda fase se realizó el proceso de síntesis y caracterización de las nanopartículas de plata a partir de extractos vegetales de guayaba. El extracto de guayaba fue realizado con las hojas de los árboles de Guayaba por medio de una infusión con agua destilada. La infusión se obtuvo a partir de 100 g de la muestra de material vegetal, los cuales fueron colocados en un vaso de precipitado con 1000 mL de agua destilada y se puso a hervir con el fin de reducir el volumen hasta 300 a 400 mL del extracto natural. La mezcla preparada se dejó enfriar a temperatura ambiente y no fue filtrada.

Para la síntesis de las nanopartículas se utilizó un beaker de 250 mL en el cual se adicionaron 50 mL de la solución de nitrato de plata (AgNO_3) con una concentración 2 M, esta solución se encontraba bajo agitación magnética constante. A la solución de plata se le adicionó 5 mL de extracto de guayaba preparado con anterioridad.

El paso siguiente fue centrifugar a 5000 rpm la muestra eliminando el sobrenadante, se adicionaron 6 mL de agua destilada para remover y se lavó el precipitado el cual contenía las nanopartículas, éste se llevó nuevamente a centrifugar, después del primer lavado se eliminó nuevamente el sobrenadante, posteriormente se adicionaron 6 mL de etanol a cada tubo de centrifuga para eliminar las impurezas orgánicas aun presentes en el precipitado, esta muestra se llevó nuevamente a centrifugar para poder retirar las nanopartículas libres de impurezas luego de mover el sobrenadante.



Figura 3. Síntesis de nanopartículas de plata en la centrifugadora

Fuente: Autor

Las nanopartículas presentes en los tubos de centrifuga se diluyen con 10 mL de agua destilada en total, para ajustar el pH con ayuda de hidróxido de sodio a 2 M, esperando llegar de esta manera a un pH entre 7 y 9 donde se establece que las nanopartículas de plata se encuentran en suspensión (Camacho, Deshamps, & Herrera, 2013).

Para la caracterización por UV-VIS se realizó diluciones de alícuotas de las muestras obtenidas de las síntesis con concentraciones de nanopartículas de plata de 0.045 g/mL y concentración por separado en 100 mL agua destilada. Con ayuda de un espectrómetro de ultravioleta visible se identificó las nanopartículas formadas, la longitud de onda se esperó obtener entre los intervalos de 400 a 500nm (Prakash, Gnanaprakasam, Emmanuel, Arokiyaraj, & Saravanan, 2012) (Nazeruddin, Prasada, Prasadd, Shaikha, Waghmareb, & Adhyapak).

6.3 FASE III. Análisis del efecto de las nanopartículas de plata sintetizadas en las propiedades físicas, químicas y microbiológicas del suelo arcilloso.

Después de obtener la síntesis de las nanopartículas de plata se procedió a realizar la adición de las nanopartículas al suelo evaluando variables de concentración de nanopartículas aplicadas al suelo y el tiempo de contacto de la nanopartículas con el suelo, las variables seleccionadas son presentadas en la tabla 4.

Tabla 4. Variables de análisis del efecto de las nanopartículas en el suelo

| Concentración (ppm) | Tiempo (horas) | |
|---------------------|----------------|----|
| 0.045 | 24 | 48 |
| 0.135 | 24 | 48 |
| 0.27 | 24 | 48 |

La adición de nanopartículas como agentes antimicrobiales al suelo se realizó por medio de un sistema de goteo, que en su parte superior tenía una bureta con la solución diluida de nanopartículas de plata que fue dosificando el suelo. El montaje utilizado para la dosificación se presenta en la figura 4.

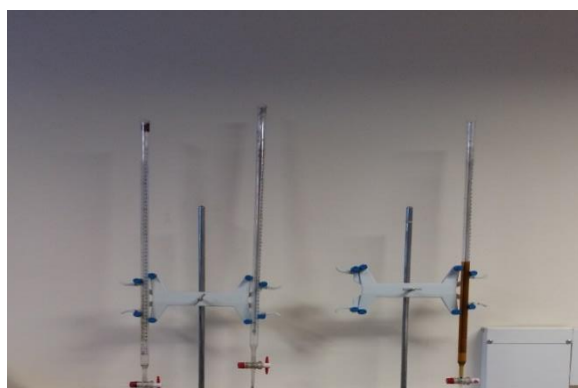


Figura 4. Montaje de dosificación del suelo con nanopartículas biosintetizadas de plata

Fuente: Autor

Se realizaron tres diluciones de nanopartículas de plata en 100 ml de agua destilada, la primera dilución fue de 1 ml de nanopartículas de plata, la segunda de 3 ml y por último una tercera dilución de 6 ml, cada una con concentración inicial de 0.045 g/mL. Se realizaron tres montajes con muestras de 500g de suelo cada una y se realizaron las respectivas adiciones de 30 ml de cada concentración. Posteriormente se estimaron tiempos de contacto de 24 y 48 horas. Las muestras con nanopartículas fueron homogenizadas por medio de volteo por 10 minutos para de esta manera realizar con cada muestra una submuestra compuesta de 300g, a partir de las cuales se iniciaron las pruebas de caracterización final del suelo.

6.3.1 Realización del análisis microbiológico del suelo

El análisis microbiológico del suelo se realizó con el mayor hermetismo posible y con el más riguroso protocolo de asepsia para lograr resultados con el mínimo

margen de error. Para este análisis se realiza el procedimiento en la cabina de bioseguridad del laboratorio de microbiología, en presencia de un mechero y con la desinfección inicial de la cabina con alcohol. Inicialmente se realizó la esterilización de todo el material que se iba a utilizar en el procedimiento, entre los que se encuentra la preparación del medio (plate count) y de los tubos de ensayo con la solución salina que sirve para realizar las diluciones respectivas y ser llevados a la autoclave por 15 minutos a 120°.

Por otra parte se esterilizó el material de vidrio (pipetas, cajas Petri, espátulas de Drigasky) en el horno por 2 horas a 180°. Se realizó el procedimiento de recuento de colonias por el método de siembra en superficie con el suelo contaminado con las tres concentraciones diferentes.

Los resultados obtenidos del análisis de variables en la adición de nanopartículas al suelo se evaluarán en los efectos de las características fisicoquímicas del suelo original como Materia Orgánica, CIC, textura, pH y Conductividad. De observarse cambios en las características fisicoquímicas se analizará los efectos adversos a este cambio.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES FÍSICAS DEL SUELO INICIAL

7.1.1 Textura del suelo inicial. Esta propiedad del suelo nos indica las cantidades porcentuales en que se encuentran las partículas de diámetro menor a 2 mm, es decir tierra fina, las cuales se agrupan en tres clases según su tamaño, arena (2 y 0.05 mm), limo (0.05 y 0.002 mm) y arcilla con diámetro menor a 0.02 mm.

El promedio de las tres muestras analizadas en el laboratorio para estudiar la textura del suelo arrojó como resultado un suelo Franco- arcilloso con 45% de arena, 34% de arcilla y 21% de limo, lo cual indica que es un suelo que tiene partículas moderadamente finas, es un suelo franco con dominio de arcillas. Los resultados se demuestran en las tablas 5 y 6.

Tabla 5. Resultados de textura del suelo inicial en estudio

| MUESTRA | LECTURA A LOS 40 SEGUNDOS | | | LECTURA A LAS 2 HORAS | | |
|---------|---------------------------|--------------------|-------------------------|-----------------------|--------------------|-------------------------|
| | HIDRÓMETRO | TERMÓMETRO (°C) | HIDRÓMETRO CORREGIDA | HIDRÓMETRO | TERMÓMETRO (°C) | HIDRÓMETRO CORREGIDA |
| 1 | 33 | 25 | 27.09 | 23 | 25 | 16.72 |
| 2 | 34 | 24 | 27.58 | 24 | 25 | 17.22 |
| 3 | 34 | 25 | 27.72 | 24 | 25 | 17.72 |

$$c = (t \times 0.36) - 7 \quad H \text{ corr} = c + \text{hidrómetro}$$

Tabla 6. Porcentaje de arena, arcillas y limo presentes en el suelo inicial.

| MUESTRA | % ARENA | % ARCILLA | % LIMO | CLASE TEXTURAL |
|-----------------|---------|-----------|--------|------------------------|
| 1 | 45.82 | 33.44 | 20.74 | FAr (Franco arcilloso) |
| 2 | 44.83 | 34.44 | 20.73 | FAr (Franco arcilloso) |
| 3 | 44.56 | 35.44 | 20 | FAr (Franco arcilloso) |
| PROMEDIO | 45.07 | 34.44 | 20.49 | FAr (Franco arcilloso) |

7.1.2 Color del suelo inicial. En la figura 5 se presenta los resultados del color obtenido para el suelo arcilloso muestreado en los terrenos de la Universidad Pontificia Bolivariana. El resultado obtenido en la tabla de Musell es de 7.5 YR 4/4, indicando un color marrón pardo.

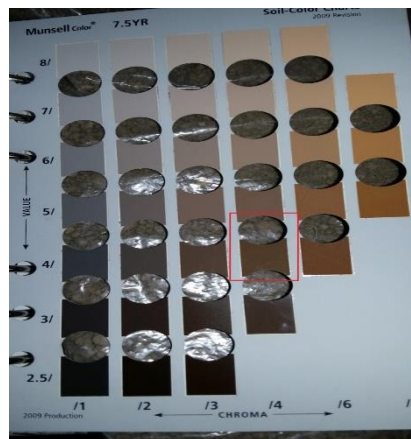


Figura 5. Resultado obtenido del análisis del color inicial del suelo muestreado.

Fuente: Autor

7.2 ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES QUÍMICAS DEL SUELO INICIAL

Los análisis de las propiedades fisicoquímicas se basaron en Capacidad de intercambio catiónico, materia orgánica (carbono orgánico) y pH y conductividad.

7.2.1 Capacidad de intercambio catiónico (CIC) del suelo inicial. La capacidad de intercambio catiónico es la capacidad del suelo para retener e intercambiar cationes y depende del número de cargas negativas presentes en la superficie de la arcilla y de la materia orgánica. Las partículas de arcilla son los componentes de carga negativa del suelo, se encargan de atraer, retener y desprender partículas con carga positiva (cationes). Las arenas no tienen reactividad. Por esto se establece que los suelos con gran cantidad de arcilla y materia orgánica tendrán mayor CIC. Las unidades en las que se expresa son miliequivalentes por 100 gramos de suelo seco.

Las pruebas iniciales de caracterización de suelo demostraron un suelo con capacidad de intercambio catiónico media ya que se encuentran en un rango entre 10 a 20 meq/100 g. Este valor también indica que este tipo de suelo tiene un suministro equitativo de bases como Calcio, Magnesio, Potasio y Sodio. En la tabla 7 se presentan los resultados obtenidos para el CIC en un suelo inicial. En la tabla 8 se presenta los valores comparativos que permiten definir que el suelo tiene un CIC medio.

Tabla 7. Resultados de CIC obtenidos para el suelos inicial

| PARAMETRO | MUESTRA 1 | MUESTRA 2 | MUESTRA 3 |
|------------------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| Volumen de la soda gastada en la muestra | 10,5 | 8.7 | 9.2 |
| Volumen de la soda gastada en el blanco | 1.2 | 1.3 | 1.3 |
| Normalidad de la soda | 0.1 | 0.1 | 0.1 |
| CIC | 19 | 15.4 | 16.4 |

Tabla 8. Estimativo de la cantidad de cationes intercambiables en el suelo

| Concentración de nano partículas (meq /100 gr) | Capacidad de Intercambio Cationico (CIC) |
|------------------------------------------------|------------------------------------------|
| Menor de 10 | Baja |
| De 10 a 20 | Media |
| Mayor de 20 | Alta |

7.2.2 Resultados del pH y de conductividad del suelo inicial. Los resultados de pH iniciales del suelo corresponden a un suelo fuertemente ácido comparado con la tabla 9.

En el caso de la muestra de suelo inicial, su rango de pH esta entre 5.1 y 5.5 lo cual indica que es un pH fuertemente ácido, y el pH de la solución de KCl está en un rango menor a 4 por cual es un pH extremadamente acido. El cálculo demostró que el suelo tiene un Δ PH con signo negativo indicando que el suelo es un buen intercambiador catiónico.

Tabla 9. Resultados de los valores de pH del suelo inicial en estudio.

| MUESTRA | VALOR DE PH H ₂ O | VALOR DE PH KCl 1N | Δ PH |
|---------|------------------------------|--------------------|-------------|
| 1 | 5.45 | 3.84 | -1.61 |
| 2 | 5.27 | 3.88 | -1.39 |
| 3 | 5.19 | 3.86 | -1.33 |

Tabla 10. Clasificación de los resultados del pH del suelo.

| pH DETERMINADO EN AGUA 1:1 | | PH DETERMINADO EN KCl 1:1 | |
|----------------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------|
| VALOR | CALIFICACION | VALOR | CALIFICACION |
| <3.5 | Ultra acido | <4 | Extremadamente acido |
| 3.5-4.4 | Extremadamente acido | 4.0-4.9 | Fuertemente acido |
| 4.5-5.0 | Muy fuertemente acido | 5.0-5.9 | Moderadamente acido |
| 5.1-5.5 | Fuertemente acido | 6.0-6.9 | Ligeramente acido |
| 5.6-6.0 | Moderadamente acido | 7.0 | Neutro |
| 6.1-6.5 | Ligeramente acido | 7.1-8.0 | Ligeramente alcalino |
| 6.6-7.3 | Neutro | 8.1-9.0 | Moderadamente alcalino |
| 7.4-7.8 | Ligeramente alcalino | 9.1-10.0 | Fuertemente alcalino |
| 7.9-8.4 | Moderadamente alcalino | >10 | Extremadamente alcalino |
| 8.5-9.0 | Fuertemente alcalino | | |
| .0 | Muy fuertemente alcalino | | |

Por otra parte la conductividad eléctrica indica la cantidad de sales que hay en el suelo, para el suelo analizado los resultados son presentados en la tabla 11 y 12. Las mediciones de conductividad eléctrica detectan la cantidad de cationes y aniones en una solución. Entre mayor es la lectura de aniones o cationes mayor es la lectura de la conductividad eléctrica. Para el caso del suelo estudiado, su rango de conductividad oscila en 0.09 dS/m, lo cual indica que es un suelo no salino, es decir tiene poca cantidad de cationes o aniones.

Tabla 11. Resultados de la conductividad eléctrica del suelo inicial

| MUESTRA | VALOR DE LA CONDUCTIVIDAD ELECTRICA (mS/cm) | VALOR DE LA CONDUCTIVIDAD ELECTRICA (dS/m) |
|---------|---------------------------------------------|--------------------------------------------|
| 1 | 91.2 | 0.0912 |
| 2 | 94.4 | 0.0944 |
| 3 | 96.1 | 0.0961 |
| | | |

Tabla 12. Interpretación de los valores de conductividad eléctrica para suelos

| CONDUCTIVIDAD ELECTRICA (DS/M A 25°C) | CLASE DE SALINIDAD |
|------------------------------------------|------------------------|
| 0-0.98 | No salino |
| 0.98-1.71 | Muy ligeramente salino |
| 1.71-3.16 | Ligeramente salino |
| 3.16-6.07 | Moderadamente salino |
| >6.07 | Fuertemente salino |

7. 2. 4 Resultados de material orgánica en el suelo inicial. La materia orgánica del suelo está constituida por desechos animales o vegetales. Este análisis se basa únicamente en el carbono que es oxidable. En los resultados obtenidos se pudo establecer que según el clima templado de la ciudad, el porcentaje de materia orgánica de la muestra es alto ya que oscila en un rango mayor de 5%. En la tabla 13 se presenta los resultados obtenidos para materia orgánica del suelo inicial.

Tabla 13. Resultados obtenidos para materia orgánica del suelo inicial.

| MUESTRA | N Solución ferrosa | % C | % MO |
|---------|--------------------|-------|-------|
| 1 | 1.6 | 7.072 | 12.19 |
| 2 | 1.6 | 3.952 | 6.81 |
| 3 | 1.6 | 6.656 | 11.47 |

7.3 ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES MICROBIOLÓGICAS INICIALES DEL SUELO

El análisis microbiológico de la muestra de suelo inicial se realizó mediante la inoculación de 1gr de suelo un número de disoluciones que permiten obtener una concentración adecuada que se pueda observar a simple vista la formación de colonias individuales para de esta forma obtener un conteo representativo de las mismas. Este valor indica el grado de contaminación microbiológica de un ambiente.

Expresa el número relativo de microorganismos de un taxón determinado en un volumen de un metro cúbico de agua. UFC es el número mínimo de células separables sobre la superficie, o dentro, de un medio de agar semi-sólido que da lugar al desarrollo de una colonia visible del orden de decenas de millones de células descendientes.

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente se pudo observar en las concentraciones de 10^{-2} y 10^{-3} los mejores resultados para realizar el respectivo conteo de colonias formadas en 48 horas en el horno a una temperatura de 37.5°C , obteniendo 87 y 136 colonias de bacterias respectivamente, los resultados del recuento de colonias se presentan en la tabla 14.

Tabla 14. Recuento de colonias representativas presentes en el suelo inicial.

| MUESTRA | 10^{-2} | 10^{-3} |
|---------------|-----------|-----------|
| UFC (ufc/ gr) | 136 | 78 |



Figura 6 Siembra de colonias

Fuente: Autor

Teniendo los resultados iniciales se pudo obtener que el suelo en estudio es un suelo franco-arcilloso de color marrón pardo, presenta además capacidad de intercambio catiónico media, un promedio de pH fuertemente ácido y que por lo consiguiente la conductividad es no salina, la cantidad de materia orgánica es alta lo que se puede corroborar en la alta cantidad de colonias de microorganismos encontradas en las pruebas microbiológicas.

7.4 CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA SINTETIZADAS A PARTIR DE EXTRACTOS VEGETALES

El análisis de caracterización y formación de nano partículas de plata fue realizada por Microscopia Electrónica (SEM) y por espectroscopia de ultravioleta visible (UV-Vis)

La aparición de bandas de absorción en el espectro ultravioleta visible (UV-Vis) se encontraron alrededor de longitudes de onda de 400 a 450 nm, indica la presencia de nanopartículas metálicas (Marcel Lahmani, 2006), y en el caso de las nanopartículas de plata, su rango de absorción oscila entre longitudes de onda que van desde 405 a 415 nm. (A. Slistan-Grijalva, 2004). En la figura 6 y 7 se presentan los espectros de absorción obtenidos por UV-Vis para las nanopartículas de palta biosintetizadas en la muestra 1 y 2.

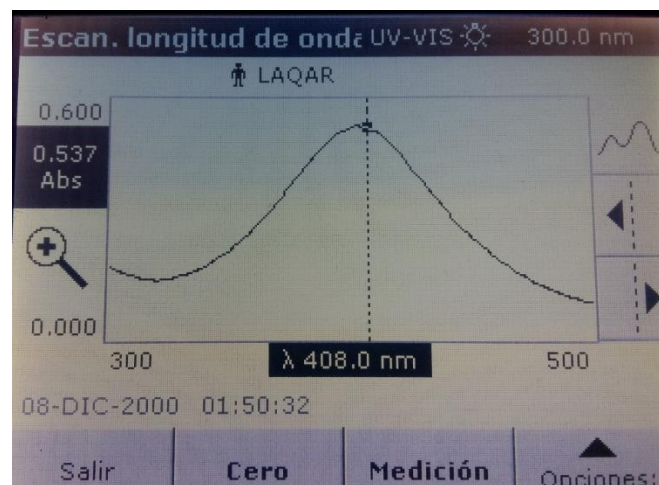


Figura 7 Curva de absorbancia. Muestras 1.

Fuente: Autor

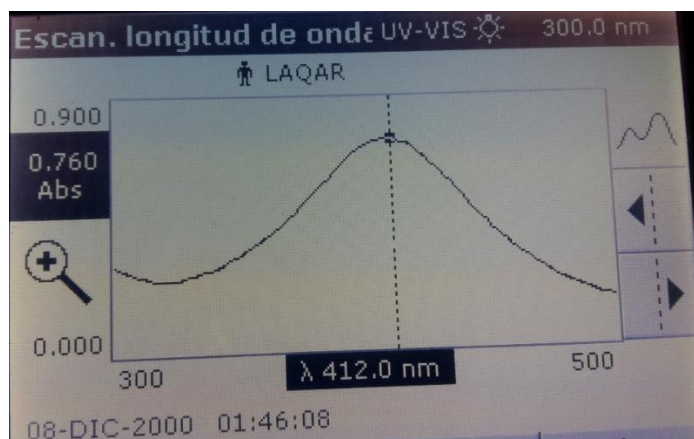


Figura 8 Curva de absorbancia. Muestra 2.

Fuente: Autor

El resultado de la prueba de microscopía electrónica de barrido (MEB) por sus siglas en inglés (SEM), de una muestra líquida biosintetizadas a partir de guayaba. El estudio se realizó por la Universidad Industrial de Santander UIS con un Microscopio Electrónico Quanta FEG 650 ambiental (ESEM), trabajando en el modo de alto vacío utilizando el detector de electrones secundarios "Everhart---Thornley Detector" (ETD) y el detector de electrones retrodispersados "Backscater Electron Detector" (BSED).

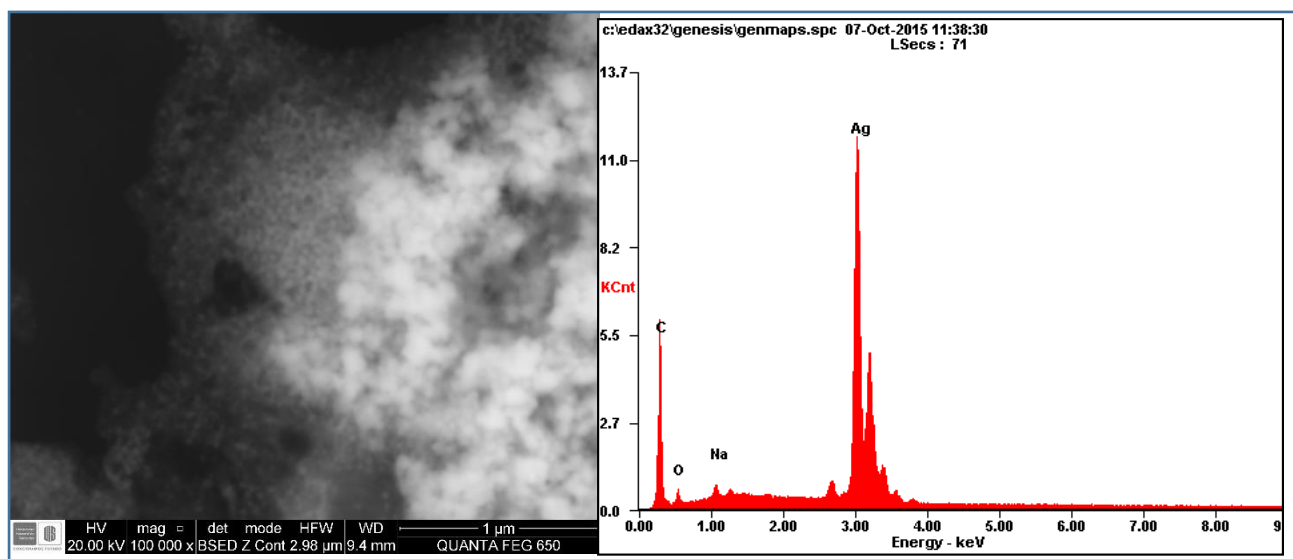


Figura 9 Micrografía de muestra líquida de nanopartículas de plata biosintetizadas a partir de extractos de guayaba analizadas por microscopía electrónica de barrido SEM

Los análisis puntuales, fueron realizados gracias a que este instrumento esta acoplado a un detector EDAX APOLO X que tiene una resolución de 126.1 eV (en.MnK α) para realizar análisis EDS (Energy--- Dispersive Spectroscopy), proporcionando información cualitativa y semi---cuantitativa de los elementos químicos presentes en los materiales. Los elementos químicos detectados mediante el EDS se rastrearon en los puntos de interés, revelando las posibles concentraciones elementales que fueron: Carbono (19.30%), Oxígeno (4.58%) y sodio (2.07%) pertenecientes a la composición de la planta de guayaba. Se confirmó la presencia de compuestos de plata con un 74.05%.

| <i>Element</i> | <i>Wt%</i> | <i>At%</i> |
|-----------------------|-------------------|-------------------|
| <i>CK</i> | 19.30 | 60.19 |
| <i>OK</i> | 04.58 | 10.73 |
| <i>NaK</i> | 02.07 | 03.37 |
| <i>AgL</i> | 74.05 | 25.71 |

Tabla 15. Análisis de composición elemental de las nanopartículas biosintetizadas por medio de extracto de guayaba. Resultado microscopia electrónica de barrido (SEM).

7. 5 ANÁLISIS DEL EFECTO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN LAS PROPIEDADES FÍSICAS DEL SUELO

7.5.1 Textura del suelo con nanopartículas. Con la intervención de las nanopartículas de plata en el suelo Franco arcilloso que inicialmente se tenía se vieron grandes cambios en los porcentajes de partículas. Un cambio significativo se observó en el porcentaje de arena en las tres diferentes concentraciones de nanopartículas de plata que se adicionaron. Los resultados reportan que se pasó de tener un rango de 45% de arena a un aumento de 52%, es decir las nanopartículas de plata inciden en las arenas logrando una mejor dispersión, además se observó una notable disminución del porcentaje de arcilla, ya que inicialmente estaba en un promedio de 34% y bajo a 23%, esto quiere decir que la acción de las nanopartículas de plata en las arcillas es de sedimentación. Por otro lado el porcentaje de limo estuvo en rangos estables. Los resultados obtenidos en el suelo con nanopartículas de plata se presentan en las tablas 16 y 17.

Depende del uso que se le quiera dar al suelo, son cambios muy bruscos en la textura del mismo lo que puede llegar a traer consecuencias negativas puesto que las nanopartículas ocasionan una desestabilización muy grande en las partículas del suelo. Para poder aplicar las nanopartículas en el suelo se debe pensar en bajar las concentraciones agregadas o realizar más diluciones.

Tabla 16. Textura del suelo con nanopartículas de plata biosintetizadas con 24 h de contacto.

| MUESTRA | LECTURA A LOS 40 SEGUNDOS | LECTURA A LAS 2 HORAS |
|---------|---------------------------|-----------------------|
|---------|---------------------------|-----------------------|

| | HIDRÓMETRO | TERMÓMETRO (°C) | HIDRÓMETRO CORREGIDA | HIDRÓMETRO | TERMÓMETRO (°C) | HIDRÓMETRO CORREGIDA |
|-----------------------|------------|--------------------|-------------------------|------------|--------------------|-------------------------|
| [] ₁ 24 h | 30 | 25 | 23.72 | 19 | 26 | 12.85 |
| [] ₂ 24 h | 30 | 26 | 23.85 | 20 | 26 | 13.85 |
| [] ₃ 24 h | 28 | 25 | 21.72 | 18 | 26 | 11.34 |

Tabla 17. Textura del suelo con nanopartículas de plata biosintetizadas con 48 h de contacto.

| MUESTRA | LECTURA A LOS 40 SEGUNDOS | | | LECTURA A LAS 2 HORAS | | |
|-----------------------|---------------------------|----------------------|-------------------------|-----------------------|--------------------|-------------------------|
| | HIDRÓMETRO | TERMÓMETRO O (°C) | HIDRÓMETRO CORREGIDA | HIDRÓMETRO | TERMÓMETRO (°C) | HIDRÓMETRO CORREGIDA |
| [] ₁ 48 h | 28 | 26 | 21.84 | 19 | 25 | 12.85 |
| [] ₂ 48 h | 29 | 26 | 22.85 | 20 | 26 | 13.85 |
| [] ₃ 48 h | 29 | 26 | 22.84 | 18 | 25 | 11.34 |

Tabla 18. Análisis de resultados de clases texturales de un suelo con 24 horas de contacto con nanopartículas.

| MUESTRA | CONTENIDO DE LOS SEPARADOS | | | CLASE TEXTURAL |
|-----------------------|----------------------------|-----------|--------|------------------------|
| | % ARENA | % ARCILLA | % LIMO | |
| [] ₁ 24 h | 52.56 | 25.7 | 21.74 | Franco Arcillo Arenoso |
| [] ₂ 24 h | 52.3 | 27.7 | 20 | Franco Arcillo Arenoso |

| | | | | |
|-----------------------|-------|-------|-------|------------------------|
| [] ₃ 24 h | 56.56 | 22.68 | 20.76 | Franco Arcillo Arenoso |
|-----------------------|-------|-------|-------|------------------------|

Tabla 19. Análisis de resultados de clases texturales de un suelo con 48 horas de contacto con nanopartículas

| MUESTRA | CONTENIDO DE LOS SEPARADOS | | | CLASE TEXTURAL |
|-----------------------|----------------------------|-----------|--------|------------------------|
| | % ARENA | % ARCILLA | % LIMO | |
| [] ₁ 48 h | 56.32 | 23.44 | 20.24 | Franco Arcillo Arenoso |
| [] ₂ 48 h | 54.3 | 23.7 | 22 | Franco Arcillo Arenoso |
| [] ₃ 48 h | 54.32 | 25.44 | 20.24 | Franco Arcillo Arenoso |

7.5.2 Análisis del Color del suelo con nanopartículas. Es la única propiedad evaluada que no presenta cambios en el suelo en presencia de nanopartículas de plata, teniendo en cuenta que éstas ocasionan cambios en la materia orgánica del suelo, pero no se ve reflejado significativamente en el suelo.

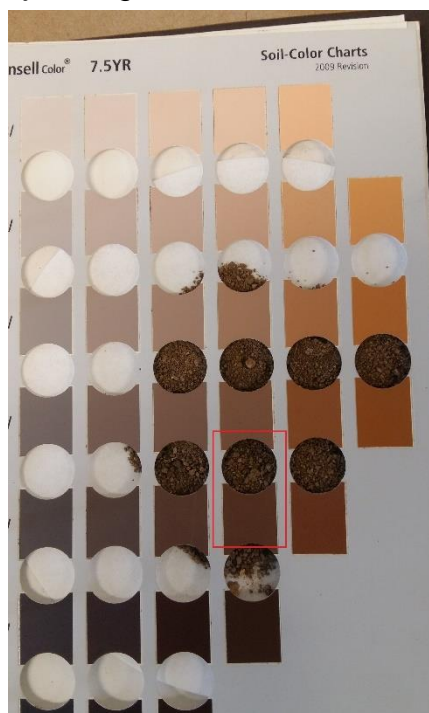


Figura 10 Determinación del color de suelo Carta de colores de Munsell

Fuente: Autor

7.6 EFECTO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN LAS PROPIEDADES QUÍMICAS DEL SUELO

7.6.1 Efecto en el análisis de CIC en suelos con nanopartículas. El CIC es una propiedad muy importante ya que si se encuentra en niveles altos lo que hace es ayudar al suelo a retener y atraer nutrientes. Inicialmente la capacidad de intercambio catiónico del suelo en estudio estaba en un nivel medio. Debido a que se alteró la textura del suelo con la adición de las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata, la capacidad de intercambio catiónico también se vio alterada y disminuyó notoriamente sus valores que inicialmente se encontraban en rangos desde los 15 a los 19 meq /100 gr, en los resultados finales se obtuvo rangos de capacidad de intercambio catiónico en un rango desde 3 hasta 7.8 meq /100 gr lo que equivale a rango bajo de CIC. En la tabla 18 se observan los resultados obtenidos para el CIC en un suelo arcilloso con presencia de nanopartículas de plata.

Estos valores son comprobables con los de textura, observando que la textura predominante en los resultados finales son las partículas de arena, y estas partículas no poseen reactividad ya que a su vez poseen menor cantidad de materia orgánica.

Con este tipo de resultados finales también se observa que inicialmente el suelo tenía buen porcentaje de saturación de bases, pero con la adición de las nanopartículas se bajan los niveles de calcio, magnesio, potasio y sodio. Los resultados indican que el suelo con presencia de nanopartículas de plata la pérdida de nutrientes, de materia orgánica y por consiguiente de su fertilidad.

Tabla 20. Intercambio Catiónico en un suelo arcilloso en presencia de nanopartículas de plata en solución.

| PARAMETRO | Concentración de nanoparticulas [] ₁ | | Concentración de nanoparticulas [] ₂ | | Concentración de nanoparticulas [] ₃ | |
|------------------------------------------|--------------------------------------------------|------|--------------------------------------------------|------|--------------------------------------------------|------|
| | 24 H | 48 H | 24 H | 48 H | 24 H | 48 H |
| Volumen de la soda gastada en la muestra | 11.6 | 9.8 | 12.5 | 10.1 | 13.5 | 9.2 |
| Volumen de la soda gastada en el blanco | 7.7 | 7.7 | 7.7 | 7.7 | 7.7 | 7.7 |
| Normalidad de la soda | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 |
| CIC | 7.8 | 4.2 | 9.6 | 4.8 | 11.6 | 3 |
| | BAJA | BAJA | BAJA | BAJA | MEDIA | BAJA |



7.6.2 Efecto en el pH y Conductividad determinado en un suelo con nanopartículas.

El pH es una de las propiedades más importantes del suelo ya que influye en muchos aspectos como la disponibilidad de nutrientes para las plantas, la solubilidad de los nutrientes, controla la clase y el tipo de actividad microbiana, además de actuar sobre la mineralización de la materia orgánica. El pH también regula la concentración de iones tóxicos que el suelo pueda tener. En la caracterización inicial del suelo se encontró valores de pH en KCL de 3.8; el cual es un valor extremadamente ácido si lo clasificamos según la tabla de Soil Survey División Sstaff (SSDS, 1993) y Fassbender (1982). Los valores de pH en agua oscilaban entre 5.1-5.5 realizando la misma clasificación anteriormente mencionada dando como resultado un pH fuertemente ácido. Al aplicar las nanopartículas al suelo arcilloso los valores de pH en KCl bajan un poco con respecto a los iniciales, pero si los valores de pH en agua iniciales con los finales presentan valores que han bajado aproximadamente en una unidad, siendo cambios grandes en la estructura del suelo. El pH está ligado a muchas propiedades del suelo como lo son la materia orgánica y la capacidad de intercambio catiónico.

Tabla 21. Valores de pH en suelo con nanopartículas de plata.

| MUESTRA | VALOR DE PH H ₂ O | VALOR DE PH KCl 1N | Δ PH |
|-----------------------|------------------------------|--------------------|-------|
| [] ₁ 24 H | 4.75 MFA | 3.61 | -1.14 |
| [] ₁ 48 H | 4.66 MFA | 3.62 | -1.04 |
| [] ₂ 24 H | 4.53 MFA | 3.65 | -0.88 |
| [] ₂ 48 H | 4.49 MFA | 3.66 | -0.83 |
| [] ₃ 24 H | 4.28 EA | 3.70 | -0.58 |
| [] ₃ 48 H | 4.25 EA | 3.67 | -0.58 |

Tabla 22. Valores de conductividad eléctrica en un suelo con nanopartículas de plata.

Aunque aumentaron los valores de conductividad eléctrica, estos no son representativos, ya que los resultados siguen siendo que es un suelo no salino.

| MUESTRA | VALOR DE LA CONDUCTIVIDAD ELECTRICA (mS/cm) | VALOR DE LA CONDUCTIVIDAD ELECTRICA (dS/m) |
|-----------------------|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| [] ₁ 24 H | 106.4 | 0.1064 |
| [] ₁ 48 H | 129.9 | 0.1299 |
| [] ₂ 24 H | 135.2 | 0.1352 |
| [] ₂ 48 H | 157.6 | 0.1576 |
| [] ₃ 24 H | 147.7 | 0.1477 |
| [] ₃ 48 H | 172.7 | 0.1727 |

7.6.3 Efecto en la cantidad de materia orgánica en un suelo en presencia de nanopartículas de plata.

En la materia orgánica en el suelo con nanopartículas de plata se observó una disminución representativa. Inicialmente se obtuvo resultados que clasificaban el suelo en porcentajes altos y los resultados obtenidos después de la adición de nanopartículas del suelo, muestran que la cantidad de materia orgánica se redujo a un nivel bajo. Esto se comprobó con el análisis de las características microbiológicas, las cuales deben disminuir al igual que la materia orgánica para que sean resultados coherentes.

En la tabla 23 y 24 se reportan los valores obtenidos para el análisis de materia orgánica en un suelo con nanopartículas de plata.

Tabla 23. Materia orgánica para un suelo con nanopartículas de plata

| | Concentración de nanopartículas [1] | | Concentración nanopartículas [2] | | Concentración nanopartículas [3] | |
|----------------------------------------|-------------------------------------|------|----------------------------------|------|----------------------------------|------|
| | 24 H | 48 H | 24 H | 48 H | 24 H | 48 H |
| Vol Sol. Ferrosa gastada en la muestra | 8.6 | 8.6 | 8.5 | 8.5 | 8.5 | 8.5 |
| N Solución ferrosa | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| % C | 1.49 | 1.49 | 1.56 | 1.56 | 1.56 | 1.56 |
| % MO | 2.57 | 2.57 | 2.69 | 2.69 | 2.69 | 2.69 |

Tabla 24. Clasificación de la cantidad de materia orgánica

| CLIMA | INTERPRETACION DEL % DE MATERIA ORGANICA | | |
|----------|------------------------------------------|---------------|--------------|
| | Mineral Bajo | Mineral Medio | Mineral Alto |
| Frío | Menos de 5 | 5-10 | Mayor de 10 |
| Templado | Menos de 3 | 3-5 | Mayor de 5 |
| Cálido | Menos de 2 | 2-3 | Mayor de 3 |



Fuente: Hugo Eduardo Castro Franco, 1998

7.7 EFECTO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN LAS PROPIEDADES MICROBIOLÓGICAS DEL SUELO

El análisis de los resultados de la parte microbiológica del suelo es el aspecto más relevante en el que se puede observar la acción de las nanopartículas de plata en el suelo, ya que se está midiendo su aspecto tóxico con seres vivos comparando el crecimiento inicial de microorganismos en los medios de agar versus el crecimiento de los microorganismos expuestos a las tres diferentes concentraciones de nanopartículas en un tiempo de 48 horas. Inicialmente se obtuvieron resultados representativos de colonias en las diluciones de 10^{-2} y 10^{-3} con 87 y 136 colonias respectivamente. Comparando los resultados obtenidos en las mismas diluciones de 10^{-2} y 10^{-3} en el suelo con nanopartículas de plata se pudo observar que se obtuvieron reducciones de colonias en todas las concentraciones, después de las primeras 24 horas y aun después de las 48 horas. En las tablas 24 se observa los porcentajes obtenidos en el crecimiento de colonias en presencia de nanopartículas de plata en el suelo y en la tabla 25 se muestra el respectivo conteo de colonias que se obtuvieron en las respectivas concentraciones.

Tabla 25. Porcentajes de crecimiento de colonias en suelo con nanopartículas

| | Concentraciones de nanopartículas [] ₁ | | Concentraciones de nanopartículas [] ₂ | | Concentraciones de nanopartículas [] ₃ | |
|-----------------------------|----------------------------------------------------|--------|----------------------------------------------------|--------|----------------------------------------------------|--------|
| | 24 H | 48 H | 24 H | 48 H | 24 H | 48 H |
| 10^{-2} | 72.41% | 64.37% | 65.52% | 62.06% | 40.23 | 27.58% |
| 10^{-3} | 86.56% | 79.41% | 66.91% | 63.97 | 11.76% | 8.82% |

Tabla 26. Análisis Microbiológico del suelo con nanopartículas de plata

| | [] ₁ | | [] ₂ | | [] ₃ | |
|---------------------------|------------------|------|------------------|------|------------------|------|
| | 24 H | 48 H | 24 H | 48 H | 24 H | 48 H |
| 10 ⁻² (UFC/gr) | 63 | 56 | 57 | 54 | 35 | 24 |
| 10 ⁻³ (UFC/gr) | 115 | 108 | 91 | 87 | 16 | 12 |

8. CONCLUSIONES

- La caracterización del suelo obtenido en la UPB es un suelo arcilloso con un pH fuertemente ácido y una conductividad no salina, además de presentar un valor de capacidad de intercambio catiónico medio y un porcentaje de materia orgánica alto. La textura del suelo inicial se caracterizó comprobando que era un suelo arcilloso.
- La síntesis de nanopartículas de plata a partir de extracto de guayaba fue confirmada por medio de la técnica de UV-Vis donde se presentó una longitud de onda de 412 nm, acertando en la formación de nanopartículas de plata.
- El efecto tóxico de las nanopartículas de plata en suelo se pudo comprobar en la disminución de la actividad microbiológica del suelo. Donde se redujo el crecimiento microbiano en un 35%, en la dilución de 3 ml de nanopartículas se redujo el crecimiento de microorganismos en 38% observando que a medida que aumentaba la concentración de nanopartículas se alcanzó un porcentaje máximo de disminución de actividad microbiológica de hasta un 72%.
- El cambio de las propiedades iniciales del suelo después de la adición de las nanopartículas del suelo fue observado alterando desde su textura, bajando sus niveles de pH y de conductividad eléctrica, capacidad de intercambio catiónico y especialmente de materia orgánica.

9. RECOMENDACIONES

- ❖ Después de realizar el muestreo del suelo a estudiar, se debe realizar su caracterización en el menor tiempo posible para garantizar de esta forma resultados más aproximados condiciones a las que este está expuesto en el medio ambiente.
- ❖ La síntesis de nanopartículas de plata es un proceso que presento un grado alto de dificultad, por la estabilización de su pH, ya que de este depende la formación de las nanopartículas. Con ayuda del Hidróxido de sodio (NaOH) 2 M se ajusta el pH y se deja en refrigeración por 48 horas ya que se pudo observar que inmediatamente después de terminado el proceso de síntesis no se podía leer la longitud de onda y que la refrigeración ayuda a estabilizar las nanopartículas.
- ❖ El régimen de limpieza del material a utilizar en la inoculación de los microorganismos garantiza la reducción del porcentaje de error de los resultados obtenidos, ya que existe un gran porcentaje de que las muestras se contaminen ya sea por medio del material no esterilizado, por la no adecuada limpieza de la cámara o por el inadecuado proceso al servir los medios en las cajas de Petri.

BIBLIOGRAFÍA

- . Panacek A, K. L. (2006). *Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity*. Phys Chem.
- A. Slistan-Grijalva, R. H.-U.-S.-B.-B. (2004). Classical theoretical characterization of the surface plasmon absorption band for silver spherical nanoparticles in water and ethylene glycol. *Physica E27*.
- Abia, P. (2.011). Guayaba propiedades y usos. *Botanical*, 1-2.
- Alba Gutiérrez Girón(UCM), R. G. (2.013). Las comunidades microbianas del suelo y el funcionamiento de los ecosistemas de alta montaña mediterráneas. *madrimasd*, 1.
- Ávalos, A. H. (2.013). NANOPARTÍCULAS DE PLATA: APLICACIONES Y RIESGOS TÓXICOS PARA. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* , 1-2.
- Baker C, P. A. (2005). Effect of silver on burn wound infection control and healing:.. *review of the literature*, 39-48.
- Barbosa, j. H. (2.011). Propiedades del Suelo. *Biología*, 1.
- Bianchi, C. C. (2011). Cultivo en agar. *Revista Medicina*.
- Blog. (2.011). Las nanopartículas: Una realidad en el mercado actual. *CarbonInspired*, 1.
- Brechelt, A. (2.014). El Manejo Ecológico de Plagas y. *Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas para América Latina* , 4-5.
- Brechelt, A. (2.014). El Manejo Ecológico de Plagas y enfermedades. *Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas para América Latina*, 6-7.
- Delgado, J. R. (2.013). LA ACTIVIDAD MICROBIANA: UN INDICADOR INTEGRAL DE LA CALIDAD DEL SUELO. *Lunazul*, 1.
- ESTIIC. (2.005). Aplicaciones Industriales de la Nanotecnología. *Revista del Instituto Tecnológico de Materiales*, 4-5.
- ESTIIC. (2006). Aplicaciones Industriales de la Nanotecnología. *Instituto Tecnológico de materiales*, 4-5.
- Etris, S. (2.009). Plata presente en premio a telas utilizadas en el sector de la salud. *Informativo Michigan*.

- FAO. (2.009). Propiedades químicas del suelo. *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*, 1.
- Feng Q, W. J. (2000). Mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Biomed Mater*, 52.
- FUNACH-ASCAPAM. (2.002). EL SUELO Propiedades físicas-químicas. *Agronet*, 1-6.
- Haza, A. M. (2013). NANOPARTÍCULAS DE PLATA: APLICACIONES Y RIESGOS TÓXICOS PARA LA SALUD HUMANA Y EL MEDIO AMBIENTE. *Complutense de Ciencias Veterinarias.*, 7-10.
- Ibañez, J. J. (2.007). pH del suelo. *Madrimasd*, 1.
- Ibañez, J. J. (2008). Complejo de cambio o complejo absorbente del suelo. *Miod*.
- Jiménez, L. (2.013). Efectos de las nanopartículas en el suelo chileno. *Universidad Santiago de Chile*, 1.
- Khan, F. A. (2012). *Biotechnology Fundamentals*. CRC.
- Marcel Lahmani, C. B. (2006). Nanomatériaux et nanochimie. *Les nanosciences* .
- Moreno Ramón, H., Blanquer, J. M., & Ibañez Asensio, S. (2005). El color del suelo. *Revista Universidad Politecnica de Valencia*, 3-4.
- Muskus, A. (2.012). *Manual de laboratorio de analisis de suelos*. Bucaramanga: UPB.
- Muskus, A. (2.013). Determinación de la capacidad de intercambio catiónico en una muestra de suelo. En A. Muskus, *Manual de laboratorio de analisis de suelos* (pág. 1). Bucaramanga: UPB.
- Muskus, A. (2.013). Determinación de las propiedades físicas del suelo: Permeabilidad e Infiltración. En A. Muskus, *Manual de laboratorio de analisis de suelos* (pág. 1). Bucaramanga: UPB.
- Muskus, A. M. (2.013). *Manual de laboratorio de analisis de suelos*. Bucaramanga: Universidad Pontificia Bolivariana.
- Ortiz, M. D. (2.013). Nanopartículas. *Observatorio de salud y medio ambiente de Andalucía*, 1.
- Pérez-Santalla, M. (2013). El uso de la plata: cambios y perspectivas. *Bullionvault*.
- Rabagliati F, T. L. (2010). Preparación de Nanocompositos de polietileno y nanopartículas de plata: Desarrollo de Películas poliméricas con actividad antimicrobiana. *Revista Facultad de Química y Biología (U. Santiago de Chile)*, 3.

- Santambrosio, E. (2.009). *Siembra y recuento de microorganismo*. Buenos aires : Catedra.
- Santambrosio, E. (2.009). *Siembra y recuento de microorganismos*. Buenos aires: Catedras.
- Sondi I, S.-S. B. (2.004). *Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for gram-negative bacteria*. Interface.
- Soriano Corral F, A. P. (2.011). Incorporacion de nanoparticulas de plata en poliestireno de alto impacto. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 116-124.
- Sotiriou GA, P. S. (2.010). *Antibacterial Activity of Nanosilver Ions and Particles*. Techno.
- Tamayo L, R. F. (2.010). Preparacion de Nanocompuestos de polietileno y nanoparticulas de plata. *Revista Facultad de Quimica y Biologia*, 3.
- TECEDOR, M. G. (2013). Definiendo la nanotecnología. *Nanotecnología*.
- Tolliver, K. D. (2013). Uso de nanopartículas de plata. *eHow*, 1.
- Trujillo, M. D. (2.013). La Guanábana, sus propiedades nutritivas y beneficios para la salud. *caribbean news digital*, 1.
- Vasquez, M. F. (2.009). *Aplicaciones medicas de las nanotecnologias en relacion con las otras tecnologias*. Nuevas Fronteras.
- Viani, F. A. (2.003). El Color del Suelo: definiciones e interpretación. *Revista Digital del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Venezuela*, 1.
- Wing, C. E. (2.010). Las nanopartículas: Pequeñas estructuras con gran potencial. *Contacto nuclear*, 27-28.
- Zanella, R. (2.012). Metodologías para la síntesis de nanopartículas:. *UNAM*, 1.