

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA



MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE POLÍMEROS

**ESTUDIO DEL EFECTO ANTIMICROBIANO Y CITOTÓXICO DE
NANOPARTÍCULAS DE ZnO CON Y SIN TRATAMIENTO SUPERFICIAL EN
NANOCOMPUESTOS PARA USO MÉDICO**

PRESENTA:

Q.F.B. SONIA NOEMÍ RAMÍREZ BARRÓN

ASESORES:

ASESOR: DRA. REBECA BETANCOURT GALINDO

CO-ASESOR: DR. SAÚL SÁNCHEZ VALDÉS

SALTILLO, COAHUILA

OCTUBRE, 2013



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA
ORGANISMO PÚBLICO DESCENTRALIZADO

DIRECCIÓN DE POSGRADO

Saltillo, Coahuila a 10 de Diciembre de 2013

Coordinación de Posgrado
Presente

Por este conducto nos permitimos informar a esta coordinación que, el documento de tesis preparado por **SONIA NOEMÍ RAMÍREZ BARRÓN** titulado *"Estudio del efecto antimicrobiano y citotóxico de nanopartículas de ZnO con y sin tratamiento superficial en nanocompuestos para uso médico"* el cual fue presentado el día **09 de Octubre de 2013**, ha sido modificado de acuerdo a las observaciones, comentarios y sugerencias, realizadas por el Comité Evaluador asignado. Por tal motivo, avalamos que el documento adjunto corresponde a la versión final del documento de tesis.

Atentamente,

Dr. Ramón Enrique Díaz de León Gómez
Presidente

SINODALES

Dr. Luis Francisco Ramos de Valle
Secretario

M.C. Ma. Luisa López Quintanilla
Vocal

Vo. Bo. de los ASESORES

Dra. Rebeca Betancourt Galindo

Dr. Saúl Sánchez Valdés

Bld. Enrique Reyna No. 140
Saltillo, Coah. México 25253
Tel. (844) 438-9830
Fax (844) 438-9839
www.ciqqa.mx

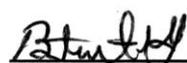
TESIS CON CARACTER ABIERTO

PROGRAMA: MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE POLÍMEROS

AUTOR: SONIA NOEMÍ RAMÍREZ BARRÓN FIRMA 

TITULO: Estudio del efecto antimicrobiano y citotóxico de nanopartículas de ZnO con y sin tratamiento superficial en nanocompuestos para uso médico.

ASESORES: Dra. Rebeca Betancourt Galindo

FIRMA 

Dr. Saúl Sánchez Valdés

FIRMA 

El Centro de Investigación en Química Aplicada clasifica el presente documento de tesis como ABIERTO.

Un documento clasificado como Abierto se expone en los estantes del Centro de Información para su consulta. Dicho documento no puede ser copiado en ninguna modalidad sin autorización por escrito del Titular del Centro de Información o del Director General del CIQA.

Saltillo, Coahuila, a 9 de octubre de 2013



Sello de la Institución

Dr. Oliverio Santiago Rodríguez Fernández
Director General del CIQA

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA



MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE POLÍMEROS
ESTUDIO DEL EFECTO ANTIMICROBIANO Y CITOTÓXICO DE
NANOPARTÍCULAS DE ZnO CON Y SIN TRATAMIENTO SUPERFICIAL EN
NANOCOMPUESTOS PARA USO MÉDICO

PRESENTA:

Q.F.B. SONIA NOEMÍ RAMÍREZ BARRÓN

ASESORES:

ASESOR: DRA. REBECA BETANCOURT GALINDO

CO-ASESOR: DR. SAÚL SÁNCHEZ VALDÉS

SALTILLO, COAHUILA

OCTUBRE, 2013

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA
Programa de Maestría en Tecnología de Polímeros**

TESIS

Estudio del efecto antimicrobiano y citotóxico de nanopartículas de ZnO con y sin tratamiento superficial en nanocompuestos para uso médico

Presentada por:

SONIA NOEMÍ RAMÍREZ BARRÓN

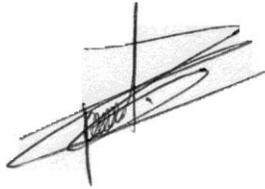
Para obtener el grado de:

Maestro en Tecnología de Polímeros

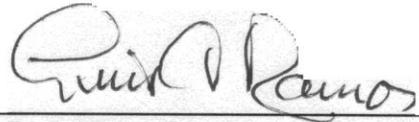
Asesorada por:

**Dra. Rebeca Betancourt Galindo
Dr. Saúl Sánchez Valdés**

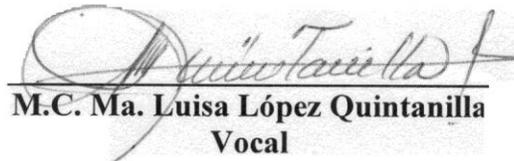
SINODALES



**Dr. Ramón Enrique Díaz de León Gómez
Presidente**



**Dr. Luis Francisco Ramos de Valle
Secretario**



**M.C. Ma. Luisa López Quintanilla
Vocal**

Saltillo, Coahuila

Octubre, 2013

DECLARACIÓN

Declaro que la información contenida en la Parte Experimental así como en la Parte de Resultados y Discusiones de este documento y que forman parte de las actividades de investigación y desarrollo realizadas durante el período que se me asignó para llevar a cabo mi trabajo de tesis, será propiedad del Centro de Investigación en Química Aplicada.

Saltillo, Coahuila a 9 de octubre de 2013



SONIA NOEMÍ RAMÍREZ BARRÓN

Nombre y Firma

DEDICATORIA

A mi madre por tu amor incondicional y enseñanzas a lo largo de mi vida.

A mi gran amor, por estar a mi lado siempre. TE AMO

AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, por permitirme concluir este ciclo de mi vida, por haberme acompañado y guiado a lo largo de esta etapa, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.

A mi madre: **Olivia Barrón Ibarra**, por apoyarme y enseñarme que con perseverancia todo lo que uno quiere se puede alcanzar. Gracias por el apoyo moral, tu cariño y comprensión, por guiar mi camino y estar junto a mí en los momentos más difíciles.

A **Alberto Antonio Neira Vielma**, por ser el compañero de mis alegrías y mis tristezas, de mis buenos y malos momentos. Por estar ahí cuando más te he necesitado, por tus consejos tanto personales como en el ámbito profesional. Por ser además de mi novio, mi mejor y más divertido amigo. Gracias por tu paciencia y por tolerar mis momentos de estrés que tanto tu como yo vivimos al escribir y realizar la tesis y sobre todo por tu amor incondicional. Gracias por hacer de nuestros momentos juntos, los mejores de mi vida.

A la **Dra. Rebeca Betancourt Galindo**, por su apoyo y su asesoría en la realización y escritura de tesis. Porque además de ser una gran investigadora es una excelente persona y amiga. También agradezco al **Dr. Saúl Sánchez Valdés** su apoyo, su asesoría y por haber confiado en mí para llevar a cabo este trabajo de tesis. ¡GRACIAS!

A mis **sinodales** por enriquecer este trabajo de tesis con sus conocimientos y correcciones.

A mi amiga **Sandra Rodríguez González**, por ser la mejor amiga que he tenido. Por compartir conmigo estos dos años en esta etapa de nuestras vidas y hacer más amena mi estancia día a día en el CIQA, ¡Definitivamente sin ti la maestría no hubiera sido lo mismo! Te quiero mucho amiga, y espero que nuestra amistad no termine aquí, espero que aunque la vida nos lleve por caminos diferentes nuestra amistad se conserve.

A mis grandes amigos de la maestría **Juan José, Faby, Felipe, Joaquín, Noé y Richito**, gracias por su sincera amistad, consejos y buenos momentos que pasé a lo largo de mi maestría, ¡los voy a extrañar mucho a todos!

A mis compañeros y amigos de laboratorio, **Berthita, Pamela, Poncho, Gris, Yera, Rigel, Lily, Juan Carlos y Alexis**, por su apoyo, ayuda y en muchos casos asesoría y sobre todo por su amistad y cariño.

A la Facultad de Biología de la Universidad de Vigo (Vigo, España), de manera particular al laboratorio de Inmunología, especialmente a la ***Dra. África Fernández, Rosana Simón, Merce y Tamara*** por su apoyo en la realización de los ensayos para determinación de la toxicidad de los materiales.

Al personal del Laboratorio Estatal de Salud Pública de Aguascalientes, por el apoyo y asesoría para la realización de los ensayos antimicrobianos de los materiales sintetizados en esta tesis, particularmente al ***M.C. Anastacio Palacios, I.Q. Lupita y B. Margarita Vargas*** y su familia por el cálido apoyo recibido.

Al ***Dr. Juan Bernal*** por la asesoría para la realización de las pruebas microbiológicas de los materiales.

A la ***Q.F.B. Bertha Alicia Puente Urbina*** por su apoyo técnico en la síntesis y caracterización de las nanopartículas.

Al ***L.C.Q. Jesús Alejandro Espinosa Muñoz*** por su orientación técnica en la realización e interpretación de FT-IR y DSC, además de su sincera amistad.

Al personal de la biblioteca ***Lic. Juan Uriel Peña Castillo y Q.F.B. José Luis De la Peña Solís*** por su apoyo en la búsqueda de revisión bibliográfica.

Al la ***M.C. María Luisa López Quintanilla, M.C. Mónica A. Ceniceros R. y M.C. Enrique Díaz Barriga Castro*** por el apoyo brindado en la caracterización microscópica de los materiales.

A la ***Ing. Beatriz Reyes Vielma*** por su apoyo y orientación técnica en la realización de los ensayos de adhesión de los nanocompuestos obtenidos.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN.....	3
I. ANTECEDENTES.....	6
1.1. Adhesivos sensibles a la presión.....	6
1.1.1. Clasificación de los adhesivos sensibles a la presión	6
1.1.2. Propiedades de los adhesivos.....	7
1.1.3. Adhesivos acrílicos sensibles a la presión.....	8
1.1.3.1. Preparación de adhesivos acrílicos sensibles a la presión.....	8
1.1.3.1.1. Solución.....	9
1.1.3.1.2. Masa	9
1.1.3.1.3. Emulsión.....	9
1.1.3.1.3.1. Componentes básicos de la polimerización en emulsión para la preparación de PSA.....	10
1.1.3.1.3.2. Mecanismo de la polimerización en emulsión.....	13
1.1.3.2. Aplicaciones de PSA acrílicos	15
1.2. Nanopartículas	17
1.2.1. Nanopartículas de óxido de zinc (NPs de ZnO)	17
1.2.2. Estructura Cristalina de las NPs de ZnO	18
1.2.3. Métodos de síntesis de NPs de ZnO.....	18
1.2.4. Modificación superficial de NPs	21
1.2.5. Actividad antimicrobiana de NPs de ZnO.....	22
1.2.6. Toxicología de las NPs de ZnO	24
1.2.6.1. Inmunotoxicidad.....	25

1.2.6.1.1. Producción de citocinas	25
1.2.6.2. Activación del complemento.....	26
1.3. Nanocompuestos	30
1.3.1. Nanocompuestos adhesivos.....	30
1.3.2. Nanocompuestos poliméricos-ZnO.....	31
II. OBJETIVOS	34
III. HIPÓTESIS	35
IV. PARTE EXPERIMENTAL.....	36
4.1. Materiales.....	36
4.1.1. Polimerización en emulsión de poli (2-EHA/MMA/AA)	36
4.1.2. Preparación de NPs de ZnO	37
4.1.3. Modificación de NPs de ZnO.....	37
4.1.4. Ensayos antimicrobianos	38
4.1.4.1. Preparación de medios de cultivo.....	39
4.1.5. Ensayos de citotoxicidad de NPs de ZnO.....	39
4.1.5.1. Preparación de reactivos para ensayo MTT	41
4.1.5.2. Preparación de reactivos para ensayo de activación del complemento..	41
4.2. Métodos	44
4.2.1. Síntesis de NPs de ZnO	44
4.2.2. Modificación superficial de NPs de ZnO	44
4.2.2.1. Caracterización de NPs de ZnO.....	44
4.2.2.2.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). Técnica de microdilución en placa de 96 pozos.....	47
4.2.2.2.3. Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB).....	50
4.2.2.3. Determinación de citotoxicidad de NPs de ZnO.....	50

4.2.2.3.1. Ensayo MMT	50
4.2.2.3.2. xCELLIGENCE	53
4.2.2.3.3. Activación del complemento	55
4.2.2.3.4. Determinación de citocinas proinflamatorias	58
4.2.3. Preparación de los nanocompuestos poli(2-EHA/MMA/AA)/ZnO mediante polimerización en emulsión	59
4.2.3.1. Resonancia magnética nuclear (H^1 RMN)	61
4.2.3.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	61
4.2.3.3. Determinación de la temperatura de transición vítrea mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC)	61
4.2.3.4. Determinación de la actividad antimicrobiana de los nanocompuestos..	61
4.2.3.5. Determinación de peel.....	63
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	65
5.1. Nanopartículas de óxido de zinc	65
5.1.1. Caracterización de NPs de ZnO con y sin modificación	65
5.1.1.1. Difracción de Rayos X de ángulo amplio (XRD).....	65
5.1.1.2. Espectroscopía infrarroja (FT-IR)	66
5.1.1.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	68
5.1.2. Actividad antimicrobiana de NPs de ZnO.....	70
5.1.2.1. Ensayo de sensibilidad. Método semicuantitativo de difusión en agar	70
5.1.2.2. Determinación de la CMI y CMB	72
5.1.3. Citotoxicidad de NPs de ZnO	76
5.1.3.1. MTT	76
5.1.3.2. xCELLIGENCE	81
5.1.3.3. Activación del complemento	83
5.2. Nanocompuestos PSA-ZnO con y sin modificación.....	88

5.2.1. Caracterización.....	88
5.2.1.1. Resonancia Magnética Nuclear de protón (RMNH ¹).....	88
5.2.1.2. Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	90
5.2.1.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	92
5.2.1.4. Conversión por gravimetría.....	94
5.2.2. Actividad antimicrobiana. Método de difusión en agar.....	98
5.2.3. Prueba de Peel	101
VI. CONCLUSIONES	103
VII. TRABAJO A FUTURO.....	105
VIII. REFERENCIAS	106

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de los PSA	10
Tabla 2. Tipos de monómeros utilizados en la copolimerización de adhesivos acrílicos sensibles a la presión.	11
Tabla 3. Reactivos utilizados para la polimerización en emulsión de poli (EHA/MMA/AA)	36
Tabla 4. Reactivos utilizados para las NPs de ZnO mediante hidrólisis química	37
Tabla 5. Reactivos utilizados en la modificación superficial de NPs de ZnO.....	37
Tabla 6. Colección de bacterias utilizadas en el estudio antimicrobiano	38
Tabla 7. Reactivos para pruebas antimicrobianas	38
Tabla 8. Líneas celulares utilizadas para la determinación de citotoxicidad de NPs	39
Tabla 9. Reactivos para ensayos de respuesta biológica a NPs de ZnO.....	40
Tabla 10. Formulación del minigel inferior	41
Tabla 11. Formulación de lower buffer	41
Tabla 12. Formulación del minigel superior	42
Tabla 13. Formulación de upper buffer	42
Tabla 14. Formulación de Sample Buffer 6x	42
Tabla 15. Formulación de Running Buffer 5x.....	43
Tabla 16. Formulación de Transfer buffer 20X.....	43
Tabla 17. Formulación del TBS 4X	43
Tabla 18. Formulación de TBS-T 1X.....	43
Tabla 19. Preparación de muestras para activación del complemento	56
Tabla 20. Porcentaje de NPs incorporadas al adhesivo acrílico	59
Tabla 21. Componentes de reacción.....	60
Tabla 22. Bandas características de NPs de ZnO, ZnO-DMSO y ZnO-APTES	68
Tabla 23. Actividad antimicrobiana de las NPs de ZnO, ZnO APTES y ZnO DMSO en términos del diámetro de la zona de inhibición.....	70
Tabla 24. CMI y CMB de Nps ZnO frente a diferentes bacterias	73

Tabla 25. Relación en % de peso (2-EHA/MMA) de copolímeros PSA-NPs ZnO con y sin modificación superficial	90
Tabla 26. Porcentaje de conversión del PSA acrílico-Nps ZnO	95
Tabla 27. Halos de inhibición de PSA-Nps ZnO frente a diferentes microorganismos.....	99

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de los adhesivos sensibles a la presión	7
Figura 2. Estructura hexagonal tipo Wurtzita del ZnO..	18
Figura 3. Representación de la modificación de NPs de ZnO con APTES.....	22
Figura 4. Vías de activación del complemento.....	28
Figura 5. Mecanismo de polimerización en emulsión pickering de ZnO y el poliestireno inicializando con KPS y AIBN.....	33
Figura 6. Ilustración del diseño para la determinación de la sensibilidad.....	47
Figura 7. Plantilla del ensayo para la determinación de la concentración mínima inhibitoria	49
Figura 8. Reacción mediada por la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial	51
Figura 9. Plantilla para el ensayo MTT	52
Figura 10. Esquema del funcionamiento del lector de placas xCELLIGENCE.....	54
Figura 11. Representación de placa de xCELLigence de 16 pocillos	55
Figura 12. Ilustración de la transferencia de proteínas del gel a la membrana.....	57
Figura 13. Ensayo de peel en maquina de ensayos universales marca Instron	64
Figura 14. Difractograma de rayos x de NPs de ZnO	66
Figura 15. Espectro infrarrojo de NPs de ZnO con y sin modificación superficial	67
Figura 16. Distribución de tamaño de partícula (nm) del ZnO y micrografía obtenida mediante SEM.	69
Figura 17. Micrografías de NPs de ZnO-APTES y DMSO	69
Figura 18. Análisis cualitativo antimicrobiano de NPs de ZnO mediante difusión en agar frente a diversos microorganismos	71
Figura 19. Porcentaje de inhibición de NPs ZnO, ZnO-DMSO, ZnO-APTES	75
Figura 20. Cultivo de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 en microplaca fondo en U con diferentes concentraciones de NPs	76
Figura 21. Citotoxicidad de diferentes NPs de ZnO en HeLa mediante MTT.....	78
Figura 22. Ensayo de citotoxicidad de MMT.....	79

Figura 23. Viabilidad celular de NCI-H460 frente a diferentes NPs mediante MTT	80
Figura 24. Resultados de viabilidad celular frente a diferentes NPs mediante xCELLIGENCE	83
Figura 25. Medición de la activación del complemento de diferentes NPs de ZnO	84
Figura 26. Western blot de NPs de ZnO para la determinación de activación de complemento	85
Figura 27. Producción de citocinas en donantes, después de ser estimulados con NPs de ZnO.....	86
Figura 28. Espectro RMN H ¹ de PSA	89
Figura 29. Micrografías obtenidas por TEM de nanocompuestos PSA-ZnO.....	91
Figura 30. Tg de nanocompuestos PSA-ZnO, ZnO-DMSO, ZnO-APTES.....	94
Figura 31. Porcentaje de conversión de nanocompuestos PSA/ZnO.....	97
Figura 32. Análisis Cualitativo antimicrobiano de los nanocompuestos PSA-ZnO mediante difusión en agar frente a microorganismos gram positivos.....	100
Figura 33. Fuerza de peel en los diferentes nanocompuestos preparados PSA.....	102

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

AA: Ácido acrílico

AP: Vía alternativa

APTES: 3-aminopropiltriethoxisilano

ATCC: Colección Americana de Cultivos

BA: Acrilato de butilo

C: Complemento

CLSI: Instituto de Estándares Clínicos y de laboratorio

CVD: Deposición química de vapor

CP: Vía clásica

DMSO: Dimetil sulfóxido

DSC: Calorimetría diferencial de barrido

ED: Electrodeposición

2-EHA: Acrilato de 2-etil hexilo

ELISA: Ensayo indirecto de inmunoabsorbancia ligado a enzimas

EVA: Copolímero de etilvinilacetato

FT-IR: Espectroscopía infrarroja por transformada de fourier

IFN- γ : Interferon gama

IL-6: interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

IL-10: Interleucina 10

IL-1b: Interleucina 1b

LESP: Laboratorio Estatal de Salud Pública de Aguascalientes

MMA: Metil metacrilato

MMT: Montmorillonita

MH: Mueller-Hinton

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

MWNT: Nanotubos de carbono de pared múltiple

NaMMT: Montmorillonita modificada

NPs: Nanopartículas

PAGE: Geles de electroforesis de acrilamida

Poli (2-EHA-co-AA): Copolímero de acrilato de 2-etilhexilo y ácido acrílico

Poli (2-EHA/MMA/AA): Copolímero de acrilato de 2-etilhexilo, metil metacrilato y ácido acrílico

PSA- ZnO: Nanocompuesto adhesivo sensible a la presión- ZnO

PSA- ZnO-DMSO: Nanocompuesto adhesivo sensible a la presión- ZnO modificado con DMSO

PSA- ZnO-APTES: Nanocompuesto adhesivo sensible a la presión- ZnO modificado con APTES

PVA: Polivinil alcohol

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SEM: Microscopía electrónica de barrido

SWNT: Nanotubos de carbono de pared simple

TEM: Microscopía electrónica de transmisión

TDD: Administración transdérmica de fármacos

Tg: Temperatura de transición vítrea

PSA: Adhesivos sensibles a la presión

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

UFC: Unidades formadoras de colonias

RESUMEN

En este trabajo se reporta la síntesis de nanopartículas de óxido de zinc (NPs de ZnO) semiesféricas, las cuales fueron caracterizadas mediante difracción de rayos X (XRD) y microscopía electrónica de barrido (SEM), donde se obtuvo un tamaño promedio de 26 nm mediante SEM y 12.6 nm por XRD. Posteriormente las NPs de ZnO fueron modificadas con dos diferentes agentes: 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES) y dimetilsulfóxido (DMSO), comprobando su funcionalización mediante espectroscopía infrarroja por transformada de fourier (FT-IR) y microscopía electrónica de barrido (SEM).

Las propiedades antimicrobianas de las NPs de ZnO, ZnO-APTES y ZnO-DMSO sintetizadas, fueron evaluadas frente a diferentes bacterias: *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Klebsiella Oxytoca* ATCC 8724, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Streptococcus Pyogenes* ATCC 19615, mediante métodos cualitativos y cuantitativos: Método de difusión en agar y método de microdilución en caldo, respectivamente. Los resultados obtenidos demuestran que las NPs de ZnO con y sin modificación poseen actividad antimicrobiana a diferente nivel, dependiendo de la bacteria contra la cual son evaluadas. La concentración mínima inhibitoria (CMI) y mínima bactericida (CMB) para cada una de las bacterias analizadas fue determinada para cada nanopartícula en estudio. Destacándose que a las concentraciones probadas, estas, no poseen actividad bactericida frente que *p. aeruginosa*, únicamente actividad bacteriostática.

Aunado a este estudio, también se evaluó la actividad citotóxica de las partículas nanométricas antes mencionadas, en las cuales se determinó la viabilidad celular mediante método colorimétrico MTT, utilizando células HeLa y NCI-H460 para este estudio, además del método de xCELLIGENCE para determinar la dosis letal media (LD 50), usando células NCI-H460. Los resultados obtenidos muestran que a concentraciones altas las NPs de ZnO resultan ser las más tóxicas, mientras que a concentraciones bajas, las NPs ZnO-DMSO tuvieron una mayor disminución en la viabilidad celular. Otro estudio incluido en la determinación de la toxicidad celular, fue la capacidad de activación del complemento, la cual fue determinada mediante western-blot. Los resultados muestran que al incrementar la

concentración de NPs, hay una mayor activación del complemento. Sin embargo, la activación del mismo no fue significativa para ninguno de los casos. También se determinó la cantidad de citocinas proinflamatorias (IFN- γ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-1b y TNF- α) producidas, mediante citometría con un kit FlowCytomix. Los resultados obtenidos señalan que existe producción de todas las citocinas, excepto INF- γ e IL-10 y que además también existe un comportamiento dosis-dependiente.

Posteriormente las NPs de ZnO con y sin modificación fueron utilizadas para la preparación de nanocompuestos adhesivos sensibles a la presión base acrílico (PSA), en concentraciones de 0.1, 0.2, 0.3 % en peso. Se determinó la conversión de cada uno de los nanocompuestos, y se encontró que al incrementar la concentración de NPs la conversión disminuye. El análisis mediante ^1H RMN mostró la composición heterogénea de los copolímeros. Además los nanocompuestos fueron evaluados mediante DSC, para observar el comportamiento de la temperatura de transición vítrea. Los resultados arrojaron que al incorporar NPs a los PSA la Tg se incrementa.

También se evaluó la actividad antimicrobiana de los nanocompuestos obtenidos frente a *E. aerogenes* ATCC 13048, *E. coli* ATCC 35218, *K. Oxytoca* ATCC 8724, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 29213 y *S. Pyogenes* ATCC 19615, por el método de difusión en agar. Las películas obtenidas mostraron actividad antimicrobiana frente a los microorganismos gram positivos únicamente.

Finalmente a los nanocompuestos que resultaron con mayor actividad antimicrobiana frente a las bacterias probadas, fueron evaluados mediante la prueba de adhesión (peel), los resultados expusieron que factores como la composición de los nanocompuestos y la transición vítrea, así como factores reológicos afectan la adhesión de los nanocompuestos.

INTRODUCCIÓN

La nanotecnología es una de las áreas más investigadas y de desarrollo en la actualidad, básicamente en todas las disciplinas técnicas. Esto obviamente incluye la ciencia y tecnología de polímeros [1]. Los nanocompuestos poliméricos, están constituidos por dos o más componentes en el cual al menos uno de ellos presenta dimensiones nanométricas, y se encuentra disperso dentro de la matriz polimérica [2]. En el campo de los nanocompuestos, existen diversas áreas, los cuales incluyen: reforzamiento de materiales compuestos, propiedades de barrera, propiedades opto-electrónicas, de aplicaciones cosméticas y propiedades bactericidas [1], estos últimos han atraído la atención por parte de la industria farmacéutica y médica [2].

La aplicación de estos materiales en el área de la medicina puede traer consigo diferentes avances en el mejoramiento de las técnicas de prevención, diagnóstico, control y tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas e infecto-contagiosas, algunas de ellas adquiridas a través de una infección intrahospitalaria, por ejemplo, en pacientes quemados, pacientes con heridas quirúrgicas y pacientes con úlceras producidas por consecuencia de la diabetes. La ulcera de pie diabético es una complicación muy frecuente y grave de esta enfermedad [3]. Esta afección es una llaga o herida abierta que en general se produce en la planta del pie, en aproximadamente el 15 % de los pacientes con diabetes. Se ha estimado que un 6% de los diabéticos que presentan una úlcera en el pie, deben ser hospitalizados debido a una infección u otra complicación relacionada con la úlcera [4] y en muchos de los casos es necesaria a la amputación. Las amputaciones de miembros inferiores en pacientes diabéticos son mayores al 60% del total de las amputaciones realizadas [5]. De manera conjunta, las heridas infectadas también son una causa importante en morbilidad y sepsis en pacientes quirúrgicos y con quemaduras [2].

Los principales microorganismos causantes de estas infecciones son *S. aureus*, este es el microorganismo más comúnmente aislado (76%) en heridas de diabéticos y úlceras de pies, lo que produce alteraciones en la sanación de las heridas [5]. De igual manera en pacientes quemados este microorganismo también se encuentra presente en infecciones, además de otro microorganismo gram positivo como: *Enterococcus spp.*, gram negativos: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y hongos: *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp* [6].

Como se había mencionado antes, por esta razón, es que el uso de nanocompuestos con actividad antimicrobiana está en rápido crecimiento. Las NPs de ZnO ha sido reconocidas por muchas industrias debido al potencial benéfico, como su alta actividad antimicrobiana contra un amplio espectro de bacterias, virus, hongos y por su baja frecuencia de estos para desarrollar resistencia [7], comparados con los agentes antimicrobianos orgánicos [8].

De igual manera para el cuidado profesional de heridas, se ha tenido acceso a un gran número de vendajes, los cuales están en continuo desarrollo y mejora [9]. Los adhesivos sensibles a la presión (PSA), son polímeros a base de acrílicos y han sido ampliamente utilizados para la administración transdérmica de fármacos (TDD), ya que tienen una buena compatibilidad química y biológica con la piel [9] además de permeabilidad para el vapor de agua y aire [10].

Además de esto, otras aplicaciones para los adhesivos sensibles a la presión, incluyen, paños quirúrgicos, almohadillas de electrocirugía, soportes de ostomía, montajes de electrodos electrocardiográficos, cubiertas para heridas y cierres [11].

Sin embargo, un problema que presentan estos adhesivos son las reacciones clásicas de irritación, claramente demarcadas y limitadas al área de colocación del parche. Los componentes relacionados con este tipo de reacciones son principalmente los productos de degradación bacteriana como el aldehído acrílico. Este efecto se ve favorecido por la acumulación de sudor, consecuencia de la obstrucción de los poros por el efecto oclusivo del parche y la proliferación microbiana facilitada por la elevada temperatura local. Con la intención de evitar este problema, se han incorporado agentes antimicrobianos al parche [12].

Tomando en cuenta lo antes mencionado y ante esta perspectiva, en este trabajo, se desarrollaron parches antimicrobianos a base de un terpolímero acrílico adhesivo sensible a la presión (PSA), preparado mediante emulsión, y se le incorporaron NPs de ZnO con el objetivo de poder aplicarse en el estrato córneo de la piel y prevenir o tratar infecciones bacterianas ocasionadas por diabetes, quemaduras o relacionadas con heridas quirúrgicas.

I. ANTECEDENTES

1.1. Adhesivos sensibles a la presión

Los adhesivos sensibles a la presión (PSA) son materiales viscoelásticos, los cuales en su estado seco y a temperatura ambiente son pegajosos [13]. Estos adhesivos son usados para unir otros materiales, mayormente en sus superficies a través de la adhesión y cohesión.

Los adhesivos sensibles a la presión son conocidos por poseer propiedades que incluyen las siguientes:

1. Adhesión agresiva y permanente
2. Adherencia sin hacer mucha presión
3. Suficiente habilidad para permanecer adherido
4. Suficiente resistencia cohesiva puede ser removido limpiamente de la superficie adherida [14].

1.1.1. Clasificación de los adhesivos sensibles a la presión

Los adhesivos sensibles a la presión pueden clasificarse según la composición química, el soporte químico y su uso final. Existen diversos tipos de PSA basados en diferentes polímeros, como, polímeros acrílicos, elastómeros, silicones, poliuretanos, poliésteres, poliéteres, y copolímeros de etileno-vinil-acetato (EVA), sin embargo los acrílicos ofrecen una gran variedad de ventajas en comparación de otro tipo de polímeros (Figura 1).

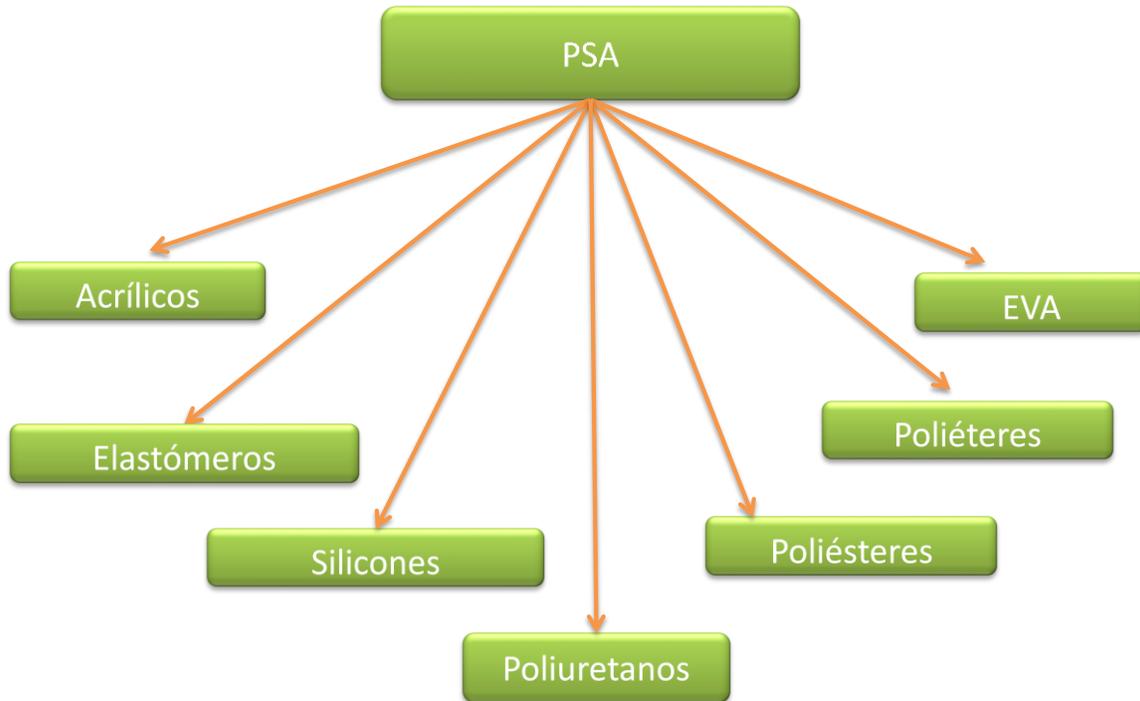


Figura 1. Clasificación de los adhesivos sensibles a la presión

1.1.2. Propiedades de los adhesivos

Las tres propiedades con las cuales fácilmente se puede caracterizar la naturaleza de los adhesivos son el tack (adhesión inicial), peel y esfuerzo de corte. La primera medición de los adhesivos se refiere a la habilidad de adherirse rápidamente, la segunda, es la habilidad para resistir la remoción por el pelaje (Peel), y la tercera es la habilidad de mantenerse en una posición cuando las fuerzas de corte son ejercidas. Generalmente las dos primeras están directamente relacionadas entre sí pero están inversamente relacionados con la tercera [10].

◆ Tack

Es la medición de la fuerza requerida para remover un adhesivo de un sustrato. Esto usualmente se refiere a la medición de la atracción inicial de los adhesivos al sustrato. El grado de tack es una función de los componentes del adhesivo. Las propiedades de tack de

los PSA resulta de la asociación de dos comportamientos conflictivos: instantánea adhesión y cohesión [15].

◆ **Peel**

El peel es la fuerza requerida para remover un PSA, el cual se encuentra en un panel de prueba patrón, usando una presión definida para hacer el contacto [16], es decir el ensayo ‘peel’ mide la adhesión a la superficie mediante.

◆ **Esfuerzo de corte**

El esfuerzo de corte describe la fuerza interna del adhesivo. Se mide como el tiempo requerido para separar la capa adhesiva. En el caso de un fallo cohesivo, queda residuo de adhesivo tanto en el sustrato como en el frontal, por lo que no se rompe la unión adhesiva real [17].

1.1.3. Adhesivos acrílicos sensibles a la presión

Los adhesivos acrílicos son un tipo de polímero sintético dentro de la familia de resinas termoplásticas, estos ofrecen una adhesión fuerte y duradera a temperaturas normales. La característica de los PSA acrílicos es que pueden ser utilizados con o sin ninguna modificación.

En general, los adhesivos acrílicos son transparentes [18], tienen buenas propiedades de envejecimiento y resistencia a los rayos UV, son polares por naturaleza y por tanto confieren una buena adhesión a los sustratos polares como el cristal y el nylon [19], además de que exhiben propiedades intrínsecas adhesivas superiores a la mayoría de los polímeros [18], ya que poseen resistencia a la migración y baja toxicidad.

1.1.3.1.Preparación de adhesivos acrílicos sensibles a la presión

Los PSA acrílicos pueden ser polimerizados en diferentes formas, mediante emulsión, solución y en masa.

1.1.3.1.1. Solución

La mayoría de estos materiales actualmente son producidos a partir de un solvente orgánico como base, ya que ofrecen algunas ventajas, como excelentes características de envejecimiento, resistencia a temperaturas elevadas y a plastificantes, excepcionales propiedades ópticas de claridad y no tiende a ponerse amarillento. También tienen el mayor equilibrio de adhesión y cohesión y una excelente resistencia al agua [20].

1.1.3.1.2. Masa

Esta técnica es apropiada para la mayoría de los elastómeros y agentes de adhesión. Las principales diferencias entre la polimerización base solvente y los adhesivos hot-melt, es que la viscosidad no puede ser controlada con solventes, debe ser controlada por la temperatura o la formulación. Otras limitaciones son que las ceras en general, no pueden ser usadas para reducir la viscosidad [17], por lo que la polimerización en este proceso es difícil de controlar [28]. En casos extremos, en que la velocidad de reacción descontrolada se puede producir el derrame del contenido del reactor. Debido a ello la polimerización en masa no es utilizada a nivel industrial para polimerización en cadena [24].

1.1.3.1.3. Emulsión

Las tecnologías basadas en agua como la polimerización en emulsión son ahora usadas en la producción comercial de los PSA [21]. Los PSA acrílicos obtenidos por polimerización en emulsión, actualmente han adquirido mayor importancia debido a que poseen atributos para reemplazar a los solventes flamables y poco amigables con el medio ambiente, otro factor importante, es que la polimerización en emulsión reduce costos, siendo esto decisivo, para el remplazo de la tecnología anteriormente usada (polimerización en solución) [22].

1.1.3.1.3.1. Componentes básicos de la polimerización en emulsión para la preparación de PSA

En el proceso de polimerización en emulsión se requieren de algunos componentes básicos: agua, monómero, tensoactivo e iniciador. La composición general de estos materiales para su síntesis se muestra en la Tabla 1, así como los porcentajes utilizados.

Tabla 1. Composición de los PSA

Componente	Composición
Monómero principal	30-40%
Monómero secundario	10-20%
Tensoactivo	2-5%
Inciador o catalizador	1-2%
Agua	40-50%

Como se puede observar hay casi un número ilimitado de formulaciones con estos componentes que pueden ser adaptadas dependiendo de las aplicaciones específicas a la cual están destinados.

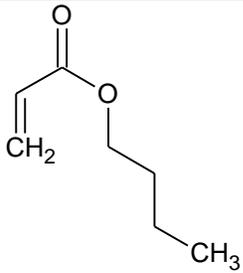
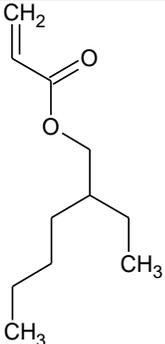
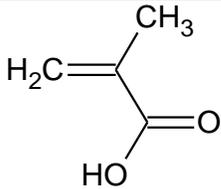
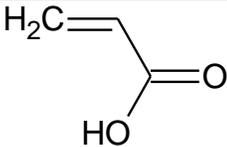
a) Monómeros

La elección de los monómeros depende de la aplicación. Generalmente, los PSA base acrílico se copolimerizan. Los monómeros utilizados para polimerizar comúnmente son: los monómeros suaves, los monómeros medios, los monómeros duros y los monómeros funcionales. Esta clasificación es basada en la Tg del homopolímero obtenido con cada uno de ellos. Los monómeros suaves, por ejemplo, son los que producen homopolímeros con Tgs alrededor -30°C y constituyen el monómero primario en el copolímero. Los

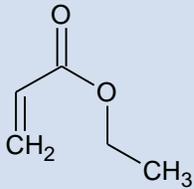
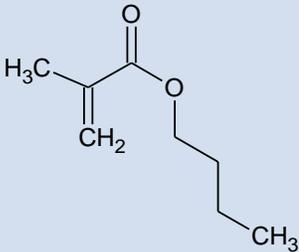
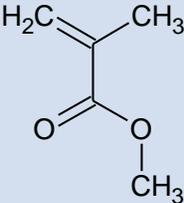
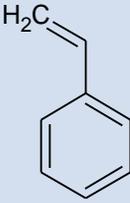
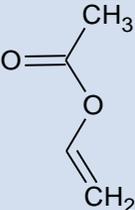
monómeros comúnmente usados para la preparación son acrilato de butilo (BA) y acrilato de 2-etilhexilo (2-EHA) [21]. Los monómeros medios, son aquellos que producen homopolímeros con Tgs mayores a -30°C y menores 30°C . Mientras que los monómeros duros producen homopolímeros con Tgs de alrededor 30°C o mayores, por ejemplo MMA. Estas dos clases de monómeros están en una proporción más baja que el monómero principal y su función primordial es añadir cohesión interna al adhesivo [23].

Los monómeros funcionales se incluyen con el fin de proporcionar una adhesión específica a un sustrato y proporcionar sitios activos para reacciones de entrecruzamiento, por lo general son el ácido acrílico (AA 106°C) o ácido metacrílico. Además los grupos de ácidos carboxílicos de estos monómeros proporcionan estabilidad coloidal en el látex a través de la estabilización electrostérica de los valores de pH más altos cuando están cargados negativamente. Los grupos ácido carboxílico (COOH) imparten hidrofiliidad; por lo tanto monómeros ácidos tienden a concentrarse en la superficie de la partícula durante la polimerización en emulsión, con los monómeros más hidrófobos que se localizan dentro de los núcleos de partículas [24]. En la Tabla 2 se muestran algunos ejemplos de los monómeros más usados en la copolimerización de adhesivos acrílicos sensibles a la presión [25].

Tabla 2. Tipos de monómeros utilizados en la copolimerización de adhesivos acrílicos sensibles a la presión.

Monómeros suaves		Monómeros funcionales	
n-Acrilato de butilo	Acrilato de 2-etilhexilo	Ácido metacrílico	Ácido acrílico
			

Continuación Tabla 2

Monómeros medios		Monómeros duros		
Acrilato de etilo	Metacrilato de butilo	Metilmetacrilato	Estireno	Acetato de vinilo
				

En la presente investigación se usó el acrilato de 2-etilhexilo como monómero principal, metilmetacrilato, como monómero duro y ácido acrílico, como monómero funcional. Las propiedades del terpolímero son aproximadamente equivalentes a las propiedades individuales de los homopolímeros [26].

b) Iniciador

Otro componente crucial en la polimerización en emulsión es el iniciador, los iniciadores se dividen en dos principales categorías: 1) Térmicos y 2) Redox. Las ventajas de los iniciadores térmicos, como el persulfato de amonio o de sodio, es que son de alto grado de solubilidad en agua y su fácil uso, los rangos normales de temperatura de polimerización fluctúan entre 75 y 90 °C [27]. Los iniciadores térmicos son más comunes que los redox alternativos. Los principales beneficios de un iniciador redox, es la habilidad de iniciar las polimerizaciones a bajas temperaturas y minimizar el número de grupos cargados incorporados en el esqueleto del polímero.

c) **Tensoactivo**

Los tensoactivos ayudan a la polimerización a través de la formación de micelas durante la polimerización en emulsión las cuales son requeridas para la formación de la partícula mediante nucleación micelar, además que contribuyen al control del tamaño de partícula en el polímero y estabilización de la emulsión durante la polimerización [28].

d) **Agente de transferencia de cadena (ATC)**

Los ATC son disueltos en la fase oleosa para abstraer los radicales libres de las cadenas en crecimiento con el fin de reducir el promedio del peso molecular en las partículas de látex [29]. Además también es añadido para evitar posibles efectos que puedan afectar la polimerización. Uno de ellos llamado efecto Trommsdorf, que se caracteriza por un aumento en la velocidad de polimerización y una exotermia en la reacción, debido a que en este momento las cadenas poliméricas son largas y flexibles y tienden a enredarse entre ellas, por lo que los centros activos pierden movilidad dentro de la partícula y tiene lugar un aumento en la viscosidad y pérdida de estabilidad coloidal, como se había mencionado antes este efecto se puede controlar mediante la adición de un agente de transferencia de cadena, al igual que el efecto vítreo, que consiste en la pérdida de la estabilidad coloidal debido a que en este caso las cadenas son largas pero rígidas, lo que ocasiona que se enreden entre sí y se de la pérdida de la movilidad interna, ocasionando un aumento en el número de radicales en la partícula y aumento de la viscosidad interna [30, 31].

1.1.3.1.3.2. Mecanismo de la polimerización en emulsión

El modelo físico de la polimerización en emulsión está basado en el modelo cualitativo de Harkins desarrollado en 1947 [32], y el posterior tratamiento cuantitativo hecho por Smith y Ewart al año siguiente. El monómero antes de comenzar la reacción está repartido. Localizándose una parte en la formación de gotas, otra cantidad está disuelto en la solución

(el hecho que el monómero sea insoluble en el medio indica que la solubilidad de éste en el medio es muy baja), y la última cantidad de monómero ha migrado al interior de las micelas. Se debe tener presente que antes que inicie la reacción, la cantidad de monómero que hay en las micelas es muy baja comparada con la cantidad de monómero en forma de gotas[33].

El iniciador está presente en la fase acuosa, y es ahí donde se produce la propagación de los radicales. El sitio de polimerización no es la gota de monómero debido a que el iniciador no es soluble en éste. Mientras tanto, parte del surfactante se ha localizado en las interfases del sistema, y el surfactante que no se ha localizado en las interfases del sistema, ha formado micelas. Es ahí dentro de las micelas donde la polimerización ocurre.

El iniciador, al no ser soluble en las gotas de monómero, migra hacia las micelas y comienza a polimerizar el monómero. Esta polimerización es más rápida que la polimerización en solución, debido a que la concentración de monómero dentro de las micelas es mucho mayor que la concentración de monómero al interior de una solución. La velocidad de la reacción aumenta al aumentar la concentración de iniciador, pero esto puede acarrear moléculas de polímero con un peso molecular más bajo.

A medida que avanza la reacción, el monómero que hay dentro de la micela se va agotando, sin embargo el monómero que está disuelto en la solución se dirige al interior de las micelas para suplir la carencia de éste. Debido a que ahora la concentración de monómero en el medio dispersante está por debajo de la concentración de saturación, ocurre un proceso difusivo donde el monómero localizado en las gotas viaja al seno del medio dispersante para intentar saturarlo de nuevo.

Por ser una reacción en cadena, las moléculas de polímero pueden crecer hasta alcanzar pesos moleculares muy altos. La polimerización puede finalizar ya sea porque ingresó un nuevo radical libre al interior de la cadena, o porque chocaron dos cadenas aún activas, o porque se agotó el monómero del sistema. En general este proceso de terminación es lento, dependiendo la velocidad de la concentración de iniciador que estaba presente inicialmente en el sistema.

Se podría pensar que al aumentar la concentración de surfactante aumenta la concentración de micelas, y por tanto, aumenta la velocidad de reacción, pero lo que en realidad ocurre es que disminuye la cantidad de iniciador por micela y disminuye la velocidad de terminación [34].

Las ventajas de la polimerización en emulsión comparada con otros procesos como: polimerización en solución y en masa, es que los problemas térmicos y de densidad son menos significativos, el estado físico de la emulsión nos permite un mejor control del proceso y el producto de la reacción que puede ser utilizado de manera directa, es decir, sin separaciones o tratamientos posteriores [31].

1.1.3.2. Aplicaciones de PSA acrílicos

Los PSA han sido aplicados en una diversidad de industrias y mercados consumidores, generalmente en etiquetas, cintas adhesivas, productos médicos, cosméticos y productos electrónicos, así como en arquitectura, deportes, en la industria aeroespacial y médica [10, 20, 35].

Así mismo, los PSA son muy utilizados también en la industria farmacéutica, ya que las capas adhesivas son usadas para adherir dispositivos liberadores de fármacos, tanto parches activos como pasivos al estrato córneo. El transporte pasivo de medicamentos a través de la piel se efectúa mediante una difusión por los tortuosos espacios intercelulares y en función de un gradiente de concentración. Los fármacos penetran por difusión pasiva, dependiendo de la interacción entre el fármaco, la piel y los excipientes. La piel tiene una función de barrera representada estructuralmente por la dinámica de la capa córnea; las propiedades fisicoquímicas del fármaco (principio activo + excipientes); la estructura y composición del estrato córneo son los principales parámetros capaces de modificar la difusión y la penetración [12].

Este tipo de adhesivos son importantes en la industria médica debido a sus propiedades como: excelente adhesión inicial, tiempo prolongado de adhesión, limpieza a la remoción, es decir, que no se quedan restos del adhesivo adheridos a la piel y a la compatibilidad con

los fármacos y la piel. En adición, sus altas propiedades viscoelásticas son pre-requisitos necesarios para su fijación en tejidos blandos. La adhesión y la integridad de los dispositivos está gobernada por la química del polímero (la elección del adhesivo), espesor de la capa, contenido de aditivos (potenciador de la permeabilidad y la carga farmacéutica), además de las condiciones ambientales (temperatura, humedad, y el ambiente fisiológico) [36].

Actualmente, un gran número de fármacos han sido incorporados a la estructura polimérica de los PSA por ejemplo: nitroglicerina [25], ketoprofeno [37], anticonceptivos [10] y Nitrendipina [38], entre otros. También los PSA se emplean, en el cuidado profesional involucrado en las de heridas, ha tenido acceso a un gran número de vendajes para heridas muchos de estos requieren el uso de un vendaje de retención o un sistema adhesivo que se sostenga en una posición segura. Estos sistemas adhesivos pueden ser entidades separadas (v.g. cintas) o componentes integrales para vendajes. Hay un número que es llamado vendajes “bordeado o islas” las cuales tienen un adhesivo incorporado, ya sea en toda la superficie o alrededor de una almohadilla absorbente.

Un PSA debe ser capaz de mantener un rendimiento adecuado en una amplia gama de temperaturas, niveles de humedad, y la frecuencia de aplicación (de 24 horas a una semana). También deben ser considerados los efectos de las tensiones mecánicas (por ejemplo, estiramiento), así como irritación de la piel y la sensibilización [39].

Existe una amplia gama de adhesivos acrílicos los cuales han sido usados para unir una variedad de materiales semejantes y no semejantes. Los principales tipos de adhesivos acrílicos son los adhesivos basados en cianoacrilatos y acrílicos modificados. Estos adhesivos son de particular interés en la industria médica, tanto para unir dispositivos médicos como agentes de unión de tejido. Hay un gran número de cintas grado médico y películas disponibles (por ejemplo recubierto simple o doble lado, tejida y no tejida, materiales elásticos y absorbentes). Son usados en una gran variedad de aplicaciones incluyendo parches hipoalergénicos, parches de nicotina, dispositivos de ostomía y apósitos en general.

Uno de los más importantes tipos de acrílicos adhesivos son los cianoacrilatos, y son también conocidos como “superpegamento”. La polimerización de los cianoacrilatos puede ser iniciada por la presencia de humedad o bases débiles en la atmósfera o en el sustrato. Desarrollos considerables han sido hechos usando cianoacrilatos como adhesivos en tejidos quirúrgicos sin embargo las limitaciones en estos adhesivos son la toxicidad, resistencia, durabilidad y seguridad.

1.2. Nanopartículas

En los últimos años la nanociencia y nanotecnología se han convertido en uno de los más importantes desarrollos, donde confluyen la Física, la Química, la Biología y la Ingeniería. La nanotecnología se define como el uso y producción de materiales a la mínima escala posible [40]. A su vez estos materiales nanométricos como las NPs se definen como partículas con un tamaño aproximado que va de 1 hasta 100 nm, que muestran propiedades que no se encuentran en muestras a granel del mismo material [41].

1.2.1. Nanopartículas de óxido de zinc (NPs de ZnO)

El ZnO se considera un material semiconductor *tipo II-IV*, por la diferencia de electronegatividades entre el Zn y el O, se produce un alto grado de ionicidad en su enlace, convirtiéndolo en uno de los compuestos más iónicos de la familia, con una banda gap de 3.3 eV a temperatura ambiente y una alta energía de excitación de alto grado de unión de 60 meV [42]. Esto ha generado gran interés en diversas investigaciones por ser un material con aplicaciones en el área científica e industrial [43, 44], debido a sus múltiples propiedades como semiconductor, piezoelectrico, piroeléctrico, catálisis, optoelectrónicas y propiedades antimicrobianas [45-48]. Por ejemplo, se ha demostrado que las NPs de ZnO poseen potencial para aplicaciones biológicas como agentes antimicrobianos, además también han mostrado ventajas como transportadores de fármacos, y que poseen un comportamiento citotóxico para el tratamiento del cáncer [45].

1.2.2. Estructura Cristalina de las NPs de ZnO

Dentro de las estructuras cristalinas de los semiconductores binarios del *tipo II-IV* de Zinc se encuentra la estructura hexagonal tipo Wurtzita, en donde cada anión se encuentra rodeado de cuatro cationes en las esquinas de un tetraedro y viceversa, de esta manera cada átomo de zinc se encuentra rodeado por un tetraedro de 4 átomos de oxígeno y viceversa. La estructura cristalina del ZnO se representan en la Figura 2, en condiciones ambientales normales la fase más estable es la wurtzita [49].

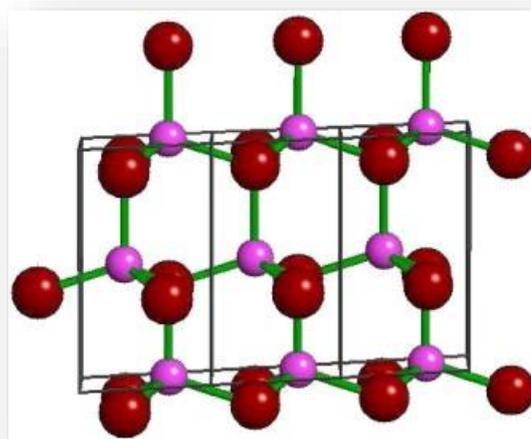


Figura 2. Estructura hexagonal tipo Wurtzita del ZnO. Los átomos rojos representan el zinc, mientras que los átomos morados representan los átomos de oxígeno [50].

1.2.3. Métodos de síntesis de NPs de ZnO

En años recientes, investigadores de todo el mundo han desarrollado diferentes técnicas para preparar NPs de ZnO, como la deposición química de vapor (CVD), método hidrotérmico, proceso sol-gel, precipitación química, y descomposición térmica, entre otros [48].

◆ Deposición química de vapor

La deposición química de vapor puede definirse como la deposición de un sólido en una superficie caliente a través de una reacción química en fase vapor. Esta técnica pertenece a la clase de procesos de transferencia de vapor, la cual es a nivel atómico en la naturaleza, esto es la deposición de las especies que son átomos o moléculas o una combinación de estos [51], básicamente consiste en la descomposición de uno o varios compuestos volátiles, en el interior de una cámara de vacío (reactor), en o cerca de la superficie de un sólido para dar lugar a la formación de un material en forma de capa delgada o de NPs [52].

◆ Método hidrotérmico

La vía hidrotérmica se refiere a cualquier reacción química heterogénea en presencia de solventes ya sea en un medio acuoso o no. Las tres etapas que ocurren en este proceso son; disolución, supersaturación y el subsecuente crecimiento de cristales. Por lo general, se puede emplear agua y otros solventes; además de que este proceso brinda la posibilidad de emplear aditivos para modificar algunas propiedades en el caso de que así se desee. Los solventes a emplear pueden ser polares e incluso no polares para que ocurra un proceso de disolución-recristalización, con el fin de extender el rango de aplicación de este método. Se debe considerar que los solventes que se emplean; pueden llegar a presentar relativas desventajas como la toxicidad y problemas de corrosión. Una vez obtenida la nanopartícula se puede recurrir a una posterior etapa de lavado y centrifugado [53].

La técnica hidrotérmica es una alternativa promisoriosa para la síntesis de Nps de ZnO por su baja temperatura de proceso y debido a que permite un fácil control de tamaño de partícula y tiene algunas ventajas sobre otros métodos, como por ejemplo el equipo es simple, libre de catalizadores, bajo costo, ambientalmente amigable y menos peligroso [54].

◆ Método sol-gel

El método de sol-gel, también llamado método de Pechini, fue desarrollado en 1960 [55]. El sistema inicial representa una solución donde diferentes procesos de polimerización y policondensación conllevan a la formación gradual de una red sólida. Este proceso consiste básicamente en la formación de redes compuestas de elementos inorgánicos; obtenidos a

través de dos reacciones químicas simultáneas que son la hidrólisis y condensación, estas se inician a partir de una solución homogénea de un alcóxido como solvente, agua y un catalizador, este último puede ser o no empleado.

Este método es común para la fabricación de NPs de óxidos metálicos por su simplicidad, bajo costo, y la alta calidad del producto final. Diferentes rutas químicas han sido usadas para la síntesis de NPs de ZnO por medio del proceso sol-gel. Este aspecto es muy importante ya que usando los surfactantes adecuados se podrán obtener NPs más finas. Los surfactantes son conocidos como un importante precursor en el proceso sol-gel el cual es usado para el control de tamaño y morfología de los productos [56]. Comparado con otros métodos de sol-gel, la ruta de Pechini proporciona una mejor homogeneidad en la composición, menor toxicidad [57].

♦ Método de precipitación o hidrólisis química

De acuerdo con reportes publicados, algunas sales de Zn incluyendo $ZnCl_2$, $Zn(Ac)_2$, $Zn(NO_3)_2$ han sido usadas con frecuencia para la preparación de NPs de ZnO a través de la precipitación usando soluciones básicas como amoníaco, KOH, y NaOH y también con la asistencia de diferentes aditivos como surfactantes (PVC, CTAB, etc.)

Para conocer los mecanismos involucrados en este tipo de procesos, es necesario conocer la naturaleza de los complejos de soluto en la solución, además de observar los cambios que experimenta su concentración en las condiciones de obtención del producto deseado. Es importante establecer, una relación entre las diferentes propiedades de los sólidos obtenidos, las especies químicas presentes en la solución durante la precipitación y los procesos fisicoquímicos que ocurren en el proceso de síntesis. Existen parámetros a considerar en este método como son; la solubilidad; en donde el precipitado debe ser lo suficientemente insoluble para que la parte soluble no afecte en el resultado, otro factor es la pureza; ya que las propiedades físicas del precipitado deben ser tales que los contaminantes puedan ser liberados empleando tratamientos sencillos, como el lavado o el filtrado pasos importantes; ya que debe ser posible aislar cuantitativamente el precipitado sólido de la fase líquida por métodos de separación sencillos y rápidos [58]. La principal

desventaja de estos métodos es la necesidad de lavar y filtrar el precipitado resultante para remover impurezas y también requieren de reactivos costosos como los surfactantes [59].

◆ **Métodos verdes**

Algunos métodos novedosos han sido recientemente desarrollados utilizando tecnologías verdes: por ejemplo Azam y col. [60] desarrollaron un método mecanoquímico libre de solventes para la síntesis de NPs de ZnO obteniendo un tamaño de partícula de 15 nm aprox., igualmente Jalal y col. [61] utilizaron líquidos iónicos como solvente verde mediante irradiación por microondas para la síntesis de NPs de ZnO. Alternativas biológicas también han sido desarrolladas para la obtención de NPs de ZnO. Sangeetha y col. [48] sintetizaron NPs de ZnO utilizando un extracto de *Aloe Vera*, el cual proporcionó NPs esféricas estables de 25 a 40 nm de diámetro.

1.2.4. Modificación superficial de NPs

Las modificaciones superficiales de una nanopartícula pueden ser con el objetivo de (a) disminuir la actividad química de la nanopartícula, (b) la estabilización del medio (que puede ser un disolvente o un polímero fundido) donde la nanopartícula se encuentra dispersa (c) la funcionalización de la nanopartícula para aplicaciones tales como reconocimiento molecular o (d) promover el ensamblaje de NPs [62].

La modificación superficial ayuda a superar estas dificultades, además de asegurar una mayor adhesión y mejorar las propiedades de los materiales compuestos, lo anterior permite una mayor compatibilidad con otros materiales que presentan estructuras diferentes por medio de puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, enlaces covalentes, logrando como resultado una muy buena dispersión y estabilidad de las NPs en el polímero [63, 64].

Se han desarrollado métodos físicos (v.g. modificación por medio de plasma) y químicos (v.g. hidrólisis química y tratamiento con agentes como: titanatos, oleatos siloxanos entre otros) [50] para la modificación de NPs de ZnO. La modificación superficial química, puede ser clasificada como de injerto en la superficie y de esterificación, este último método permite una fuerte unión covalente entre la superficie de las partículas modificadas y las cadenas de polímero [63].

Además la modificación superficial es un método efectivo para mejorar las propiedades mecánicas de los materiales compuestos. Los silanos son importantes agentes de modificación, los cuales pueden formar una capa de membrana de una sola molécula en la superficie de las cargas y mejoran la humectabilidad y la dispersión [65], además que son capaces de formar enlaces estables tanto materiales orgánicos e inorgánicos [66]. La Figura 3 muestra la unión de las NPs de ZnO con el agente de modificación superficial APTES.

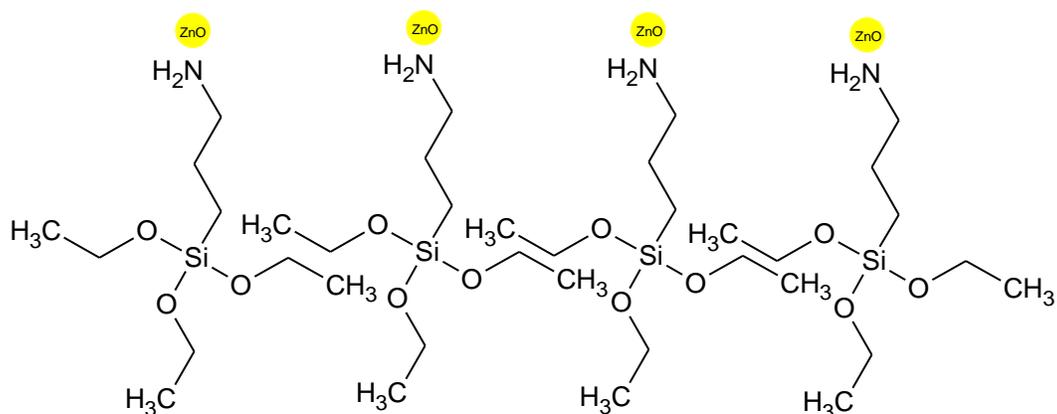


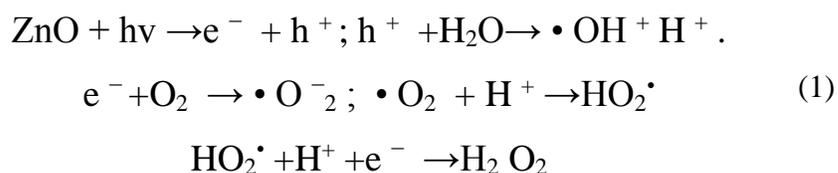
Figura 3. Representación de la modificación de NPs de ZnO con APTES [67]

1.2.5. Actividad antimicrobiana de NPs de ZnO

Las NPs de ZnO, han resultado particularmente interesantes, debido a presentan características muy particulares: pueden ser preparadas con un área superficial extremadamente alta y con estructuras cristalinas inusuales [68], tienen gran resistencia frente a los microorganismos [47, 48], además el Zn es un elemento esencial para la salud humana, lo que proporciona biocompatibilidad con células humanas, haciéndolos muy adecuados para aplicaciones biológicas, más específicamente como agentes antibacterianos [47], aunque en trabajos recientes también se reporta actividad antifúngica.

Las NPs de ZnO han sido probadas con éxito también frente a bacterias como: *Pseudomonas sp.* [45], *E. coli* [40, 47, 61], *Bacillus subtilis* [40], *S.aureus* [69, 70], *Botrytis cinérea* [68] y hongos como: *Fusarium sp* [45] y *Penicillium expansum* [68] por mencionar algunos.

El mecanismo propuesto para la actividad antibacterial de las de ZnO, no ha sido descrito completamente, sin embargo se ha sugerido que está basado principalmente en la catálisis de formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) las cuales son formadas a partir de agua y oxígeno en la superficie de la NP, seguida de la liberación del ion zinc, que se interna en la membrana celular donde es biotransformado por la bacteria produciendo cambios conformacionales y lesiones oxidantes en la superficie de la membrana del microorganismo [45]. La generación de especies altamente reactivas como OH^- , H_2O_2 y O_2^{2-} es explicada de la manera siguiente. Los efectos de las NPs de ZnO pueden ser activados por la luz visible y UV, mediante la creación de huecos en los pares de electrones ($e^- - h^+$). Los huecos disocian las moléculas de agua (de la suspensión de ZnO) en OH^- y H^+ . La moléculas de oxígeno disueltas son transformadas en aniones radicales superóxidos ($\bullet\text{O}^-$), los cuales a su vez reaccionan con los iones H^+ para generar radicales ($\text{HO}_2\bullet$), y por una subsecuente colisión con los electrones producen aniones de peróxido de hidrógeno (HO_2^-). Luego estos reaccionan con los iones hidrógeno para producir moléculas de H_2O_2 . Las moléculas de H_2O_2 pueden penetrar en las membranas celulares y aniquilar a las bacterias (Ec 1).



Puesto que los radicales hidroxilos y superóxidos están cargados negativamente, estos no pueden penetrar dentro de la membrana celular y deben permanecer en contacto directo con la superficie exterior superficie de la célula de las bacterias, sin embargo, los H_2O_2 pueden penetrar dentro de la célula [71].

La catálisis de la formación de los radicales ocurre en la superficie de la partícula, permitiendo el daño de las enzimas microbianas, y consecuentemente la muerte de las células bacterianas [52]. Por lo tanto, las partículas con gran superficie de contacto demuestran mayor actividad antibacteriana [14]. Adicionalmente, la interacción

electrostática entre la superficie de las bacterias y las NPs puede ser la reacción para la inhibición del crecimiento [72]. Además de poseer propiedades antimicrobianas, el ZnO propicia la cicatrización de las heridas mediante la liberación del ión zinc permitiendo la migración de los queratinocitos [74], las cuales son células predominantes en la dermis.

1.2.6. Toxicología de las NPs de ZnO

El ZnO tradicionalmente es conocido como un compuesto que no resulta tóxico, por lo tanto, NPs de ZnO han sido incluidas en numerosos productos, por lo tanto la investigación referente a la toxicología de las NPs de ZnO se encuentra más estancada que el desarrollo de sus aplicaciones [73].

Por esta razón, existen muchas controversias en relación de la toxicidad de las NPs de ZnO. Primeramente, no hay una conclusión consistente acerca de la toxicidad de estas NPs y del impacto del tamaño su toxicidad. Recientes estudios muestran que las NPs de ZnO pueden ser internalizadas a través de la membrana de las células humanas, los canales iónicos y las proteínas transportadoras permiten que las NPs, o sus iones, crucen la membrana plasmática. Algunas NPs entran por vía de endocitosis: la membrana los envuelve y las vesículas con NPs son transportadas al interior de las células. Las NPs pueden interactuar directamente con orgánulos oxidativos, como las mitocondrias, las proteínas redox activas que estimulan la producción de ROS en las células, y los iones Zn^{2+} generados por las NPs pueden inducir ROS mediante reacciones químicas. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden inducir daños en el ADN, y afectar la expresión génica. Además, los iones Zn^{2+} tienen la capacidad de formar quelatos con biomoléculas o desplazar a los iones metálicos en metaloproteínas específicas que podría resultar en la inactivación funcional de la proteína [74].

En un estudio, Yang y col. (2010) determinaron que las NPs de ZnO son altamente tóxicas para células NIH/3T3, ya que las células pierden su viabilidad al ocasionar fugas de membrana y cambios de morfología [75]. También Lin y col. (2009) demostraron que la exposición aérea supone un riesgo importante. La inhalación o instilación de las NPs de ZnO resulta en inflamación de pulmón y toxicidad sistémica. Probablemente las especies reactivas de oxígeno juegan un papel importante en la respuesta inflamatoria [76].

Contrario a esto, Heng y col. (2010) estudiaron la toxicidad y el potencial inflamatorio de NPs de ZnO de morfología esférica y en forma de láminas usando ratones y líneas celulares humanas. Los resultados demuestran que la citotoxicidad depende de la concentración de las NPs de ZnO tanto en las de morfología esférica como en las NPs en forma de láminas, para todas las líneas celulares evaluadas, sin embargo los resultados indican que no existe citotoxicidad significativa, ya que no hay diferencias en la viabilidad celular [77]. También existen diversos estudios que demuestran que el uso de NPs de ZnO es seguro en contacto con la piel, puesto que han sido utilizadas en diversos protectores solares en conjunto con NPs de óxido de titanio [78].

Como se describió anteriormente se han realizado una gran cantidad de evaluaciones acerca de la toxicidad de las NPs de ZnO con diferentes líneas celulares así como modelos animales, sin embargo algunos resultados reportados son contradictorios, en particular en términos de parámetros fisicoquímicos que afectan su citotoxicidad. Por lo tanto, la toxicidad de las NPs de ZnO aún queda por esclarecerse, necesitando una evaluación toxicológica más extensa y focalizada al uso final de las NPs y a sus posibles vías de entrada en el organismo [79].

1.2.6.1. Inmunotoxicidad

1.2.6.1.1. Producción de citocinas

Los nanomateriales, dependiendo de sus características y composiciones, pueden interactuar con el sistema inmune en muchas maneras y pueden potenciar o inhibir la respuesta inmune. Las citocinas son reguladores de la respuesta de los hospederos a las infecciones, inflamación, traumas [80] y desempeñan funciones pleiotrópicas las cuales sirven para mediar o regular la respuesta inmune y son generalmente reconocidos por biomarcadores de la inmunotoxicidad [81]. Algunas citocinas claramente pueden promover la inflamación y son llamadas citocinas proinflamatorias [80].

Muchas reacciones inmunoestimulantes iniciadas por NPs están mediadas por la producción de citocinas inflamatorias. Varios estudios han reportado la inducción de

citocinas por los diferentes tipos de nanomateriales (coloides de oro, dendrímeros, polímeros, NPs lipídicas, etc). El tamaño de las NPs se ha sugerido como un parámetro principal que determina el potencial de una NP para inducir respuestas de citocinas. Por ejemplo, la longitud de los nanotubos de carbono muestra que se correlaciona con la inflamación inducida en estudios in vivo. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que las citocinas no son inducidas por las NPs en sí, sino por agentes tensoactivos o endotoxinas bacterianas presentes en la formulación [82].

Entonces, es muy importante conocer el comportamiento de las NPs en estudio, sobre todo si las aplicaciones a las que va dirigidas se encuentran relacionadas con la manipulación, inhalación o contacto directo, ya que las células inmunitarias reconocen de forma muy eficaz a patógenos y partículas extrañas al organismo, y pueden generar diversas respuestas inmunitarias en el organismo [83].

1.2.6.2. Activación del complemento

El sistema del complemento (C) es una rama de la inmunidad que puede rápidamente reorganizar y responder a bacterias, virus y células infectadas con un potente repertorio de opsoninas, anafatoxinas y agentes citotóxicos. La activación de C puede ocurrir virtualmente con alguna superficie no protegida y el daño severo a tejidos puede ir acompañado de una actividad intensa del complemento. La activación de C es mediada por tres principales vías, la vía clásica (CP), de lectina, y la vía alternativa (AP). La CP es activada por complejos antígenos-anticuerpos y ciertos patrones moleculares, mientras que la vía de la lectina es activada por polisacáridos de los microorganismos, y finalmente AP es activada por una variedad de superficies. En adición, la AP amplifica la actividad en todas las vías.

Cada vía se une las convertasas C3, las enzimas centrales de la cascada de C. Las C convertasas escinden la fase de fluido de proteína C3 en la opsonina C3b y la anafilatoxina C3a. Además, la actividad convertasa también dirige la unión del complejo de membrana de ataque y la producción de C5a, una segunda anafilatoxina. La activación de los

productos de C (C3a, C3b, C5a, y C5b) tiene la finalidad de remover al blanco mediante la lisis de la membrana y también tiene la función de promover reacciones inflamatorias locales. La regulación de las proteínas del complemento salvaguardan las células del huésped inhibiendo la actividad de las convertasas, pero sus efectos protectores pueden ser superados por la actividad local intensa o sistémica de C, con lo cual puede desencadenar daño tisular. La activación local de C puede producir severos efectos perjudiciales como en el caso de lesión de isquemia-reperusión (Figura 4) [84].

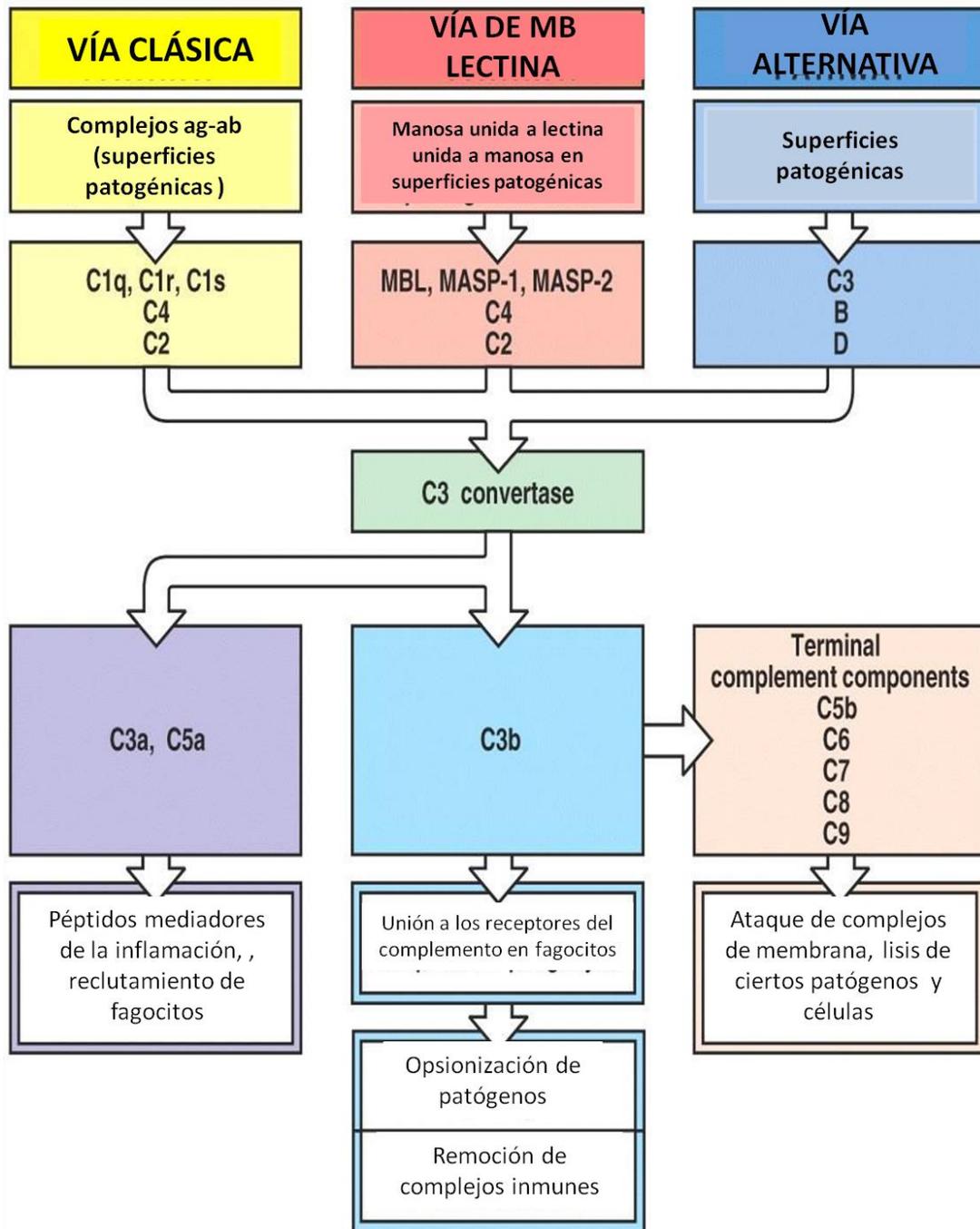


Figura 4. Vías de activación del complemento

Es bien sabido que algunos nanomateriales son capaces de activar el complemento, por ejemplo algunos nanoliposomas y nanotubos de ingeniería. Curiosamente, tanto los nanotubos de pared simple (SWNT), como los nanotubos de carbono de pared doble (DWNTs) estimulan la vía clásica, sin embargo solo los DWNT desencadenaron la vía

alternativa. Los mecanismos para esta activación selectiva del complemento son aún desconocidos [85].

Se ha demostrado que las NPs pueden activar el complemento a través de una de las tres vías o por combinación de estas, lo cual es primariamente determinado por las propiedades de superficie de la nanopartícula y la conformación del recubrimiento polimérico. Otro factor interesante es que la activación por la vía clásica por NPs no requiere un complejo antígeno-anticuerpo específico, pero es desencadenada por la interacción directa con el componente C1q del complemento o la unión no específica de las inmunoglobulinas. Es generalmente aceptado que las NPs destinadas a la administración sistémica deben ser diseñadas con el propósito de evitar la activación del complemento, para evitar reacciones de hipersensibilidad y anafilaxis. En contraste aunque es indeseable la activación del complemento causada por la inyección sistémica de ciertos nanomateriales, la activación del complemento por otras NPs administradas por diferentes vías (subcutánea o intradérmica) pueden beneficiar la eficacia de vacunas, algunas NPs recubiertas con polímeros hidrofílicos como el PEG (recubiertas para incrementar el tiempo de circulación y protegerse del reconocimiento del sistema inmune, ejem: liposomas), no protege de la activación del complemento. Salvador-Morales y col. [86], describen que se requiere poner atención a los procedimientos de síntesis y los ligandos usados para unir polímeros y los ligandos en las superficies de las NPs. Por ejemplo, estudios recientes han demostrado que los ligandos con grupos hidroxilo o tioles no activan el sistema del complemento, al contrario de los ligandos con grupos metoxi que son potentes activadores. Otro estudio demostró que la metilación de la fracción de fosfato oxigenada del metoxiPEG reduce la activación del complemento [87]. Desde un punto de vista práctico, esto significa que el uso de ligandos "complemento-reactivos" son aceptables para las NPs destinadas a la administración de vacunas cuando es deseable la activación de complemento, mientras que el uso de ligandos "complemento-no reactivos" es crucial para formulaciones destinadas a la administración sistémica cuando la activación del complemento no es deseable [88].

1.3. Nanocompuestos

1.3.1. Nanocompuestos adhesivos

Para explotar una nueva clase de adhesivos PSAs de alto rendimiento, los adhesivos acrílicos basados en emulsión han incorporado nuevas cargas nanométricas para mejorar sus propiedades, o incluso añadirle nuevas.

Diversos investigadores han preparado adhesivos con diferentes partículas nanoestructuradas, con el fin de incrementar las propiedades mecánicas, mejorar las propiedades de liberación de fármacos, o incrementar la conductividad eléctrica.

Por ejemplo Kyoung Oh y col. (2009) prepararon nanocompuestos adhesivos a partir EHA, BA y nanoarcillas de montmorillonita (MMT) a diferentes concentraciones mediante mezclado mecánico y polimerización en emulsión “in situ”. En este estudio se encontró que la transición vítrea del polímero es independiente de la concentración de las nanoarcillas, mientras que las propiedades viscoelásticas si se ven afectadas por el contenido de estas. La concentración al 1% de NPs se dispersó de manera uniforme en la matriz polimérica [89].

Lofton y col. (2007) también incorporaron NaMMT modificadas a PSA, con el fin de incrementar las propiedades mecánicas [90]. Prepararon adhesivos acrílicos a base de EA/EHA mediante polimerización en emulsión. Los resultados mostraron que la cinética de la polimerización en emulsión es independiente de la adición de las nanoarcillas de montmorillonita. En cambio las propiedades de los adhesivos se ven fuertemente influenciadas por el tipo y cantidad de nanoarcillas añadidas. Por ejemplo peel y tack decrecen gradualmente a mayor cantidad de nanoarcillas MMT, y hay un substancial incremento en esfuerzo de corte, el valor máximo determinado fue del por ciento en peso de nanoarcillas modificadas. Mientras que hay Influencia moderada en tack, peel y esfuerzo de corte al incorporar nanoarcillas no modificadas[91].

Por su parte, Shaikh y col.(2007), incorporaron (0, 2, 5 y 10% basado en el peso seco de adhesivo) de organoarcillas a parches transdérmicos PSA de polidimetilsiloxano mediante fundición en solución con la intención de proporcionar una liberación controlada, ya que al

añadir las nanoarcillas modificadas, se mejoran tanto las propiedades de permeación a través del estrato corneo como las propiedades mecánicas del adhesivo [92].

Del mismo modo, Rana y col. (2007) prepararon nanocompuestos adhesivos, incorporando a Poli(2-EHA-co-AA), silicato de sodio a nanoescala, con el propósito de mejorar la absorción de la cloxacilina sódica [36]. También Wang y col. (2009) desarrollaron un adhesivo de polibutilacrilato y SWNT (Nanotubos de carbono de pared simple), con el fin de incrementar la conductividad eléctrica. Los nanotubos de carbono de pared simple fueron funcionalizados con polivinilalcohol (PVA), en una proporción de 0.3% en peso. Los resultados mostraron que la conductividad aumenta en diez órdenes de magnitud. También en este umbral, se observan los cambios de adhesión y un aumento en tack. Del mismo modo, la energía de adhesión aumenta en aproximadamente un 85% con la adición de PVA-SWNT en la misma concentración [93].

También Wang y col. (2008) prepararon nanocompuestos adhesivos, mediante la deposición horizontal de poli (butilacrilato-co-ácido acrílico), y SWNT o MWNT funcionalizados con varios polímeros y utilizando diferentes tensoactivos. Añadiendo 0.03% de nanotubos se obtuvo una conductividad eléctrica del orden de 1 S/m. La conductividad térmica se incrementó 80% al añadir 0.1% en peso de SWNT, en cuanto la energía de adhesión se incrementó en 85% [94].

Sin embargo, no existen reportes acerca de la preparación de nanocompuestos adhesivos PSA acrílicos que incorporen NPs de ZnO, como este estudio lo plantea. En el siguiente apartado se muestran las investigaciones previas de sistemas poliméricos que incorporan NPs de ZnO, mediante emulsión y miniemulsión.

1.3.2. Nanocompuestos poliméricos-ZnO

Existen investigaciones previas que reportan sistemas en emulsión y miniemulsión que incorporan NPs de ZnO. Por ejemplo, Tang y Dong, (2009) estudiaron el sistema poliestireno-NPs de ZnO, mediante polimerización en miniemulsión. En esta investigación se utilizó el agente de modificación APTES (3-aminopropiltriétoxissilano), para modificar

las NPs de ZnO y compatibilizarlas con el polímero. Al añadir este agente de modificación en una proporción de 0.6%, se mejora la eficiencia de encapsulación de NPs de ZnO hasta en un 95%, además que se mejora la dispersión de NPs en la matriz polimérica, presentando buena actividad antimicrobiana [95].

Chen y col. (2008) estudiaron el sistema poliestireno/NPs de ZnO mediante polimerización en emulsión por pickering. Diferentes cantidades de monómero de estireno fueron emulsificadas en agua en presencia de NPs de ZnO, y fueron agitados mecánicamente o por sonicación. Se utilizaron iniciadores como azobisisobutironitrilo (AIBN) y Persulfato de potasio (KPS). En este estudio se observaron morfologías diferentes dependiendo del iniciador utilizado. El esquema de reacción propuesto utilizando el KPS (imagen superior), se muestra en la Figura 5, en este esquema se puede observar como las NPs de ZnO, se encuentran en su mayor parte encapsuladas en las partículas de látex de poliestireno, así como algunas quedan en la superficie de esta [96]. Mientras que cuando la reacción es inicializada por AIBN, las NPs se encuentran en la superficie de las partículas de látex de poliestireno (imagen inferior).

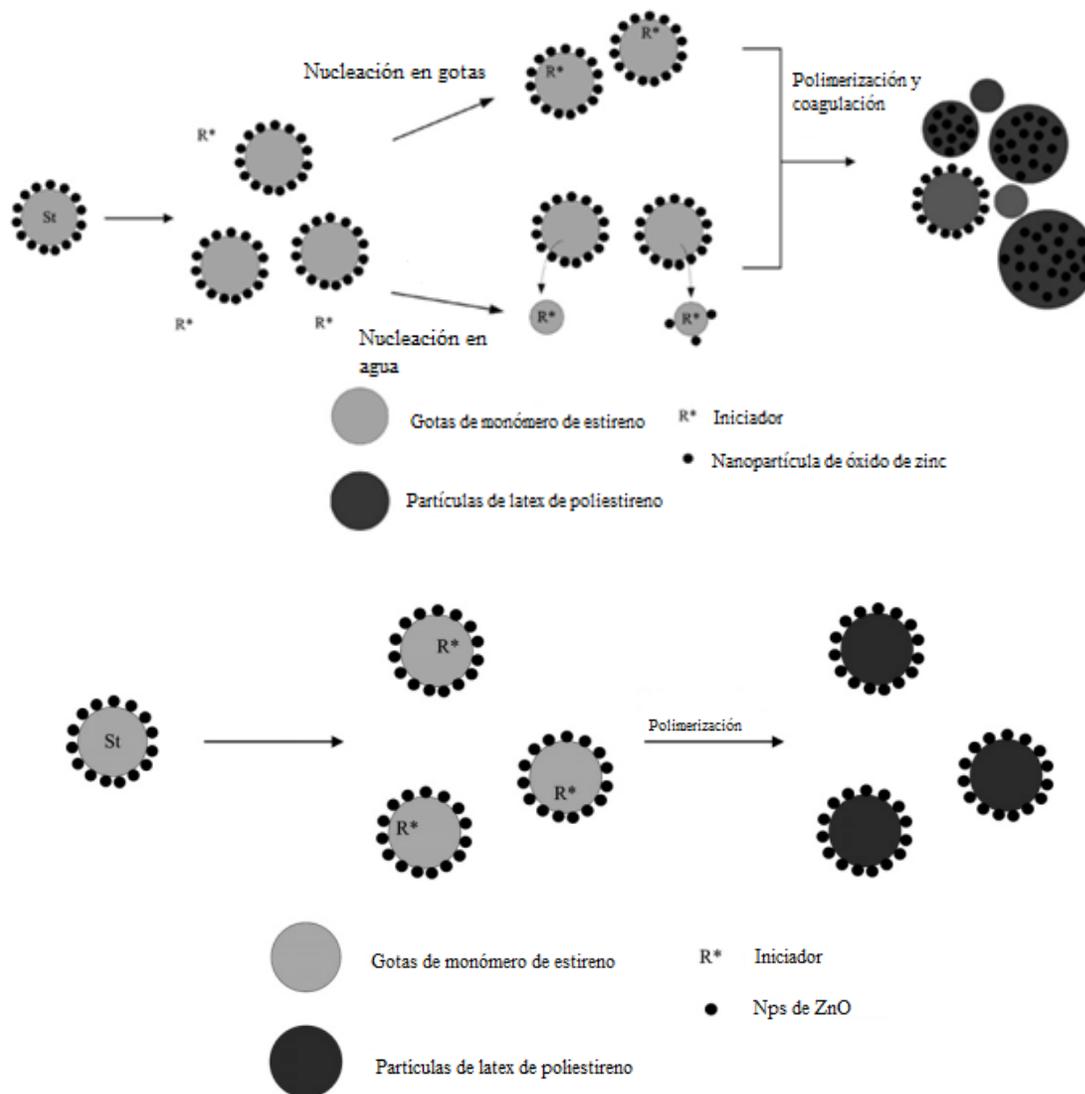


Figura 5. Mecanismo de polimerización en emulsión pickering de ZnO y el poliestireno inicializando con KPS y AIBN

Xiong y col. (2003) estudiaron el sistema de poli (Estireno-butilacrilato)/nano y micropartículas de ZnO. Observaron que al aumentar el contenido de NPs de ZnO, la temperatura de transición vítrea aumenta, así como las propiedades mecánicas, no teniendo influencia cuando se incorporan micropartículas a este sistema [97].

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar el efecto antimicrobiano y grado de toxicidad de NPs de ZnO con y sin tratamiento superficial en nanocompuestos adhesivos acrílicos sensibles a la presión para materiales de uso médico.

Objetivos particulares

1. Obtener NPs de ZnO semiesféricas mediante el método de hidrólisis química.
2. Modificar superficialmente NPs de ZnO con APTES y DMSO.
3. Evaluar de las propiedades estructurales y morfológicas de las NPs de ZnO con y sin modificación.
4. Evaluar la actividad antimicrobiana de NPs de ZnO modificadas y sin modificar frente a bacterias gram positivas (*S. pyogenes*, *S. aureus*) y gram negativas (*E.coli*, *P. aeruginosa*, *K. oxytoca*, *E. aerogenes*).
5. Evaluar la viabilidad celular de NPs de ZnO frente a líneas tumorales humanas, así como la producción de citocinas y activación del complemento.
6. Preparar nanocompuestos PSA mediante polimerización en emulsión incorporando las NPs de ZnO con y sin modificación
7. Caracterizar las propiedades morfológicas, estructurales y realizar ensayos de adhesión de los nanocompuestos obtenidos.
8. Evaluar la actividad antimicrobiana de los diferentes nanocompuestos.

III. HIPÓTESIS

Los PSA pueden ser preparados a partir con la incorporación de NPs de ZnO con y sin modificación superficial, los cuales pueden servir como apósitos de uso médico. El agente de modificación permitirá una mejor compatibilidad de las NPs y el copolímero, así como una buena dispersión y distribución de las NPs en el apósito. Se espera que el apósito presente un efecto notable sobre la cicatrización y la inhibición del crecimiento de microorganismos en el momento que entre en contacto con la herida.

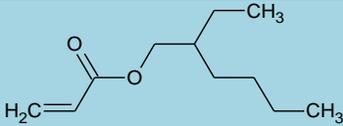
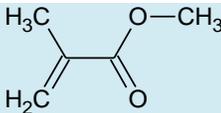
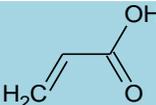
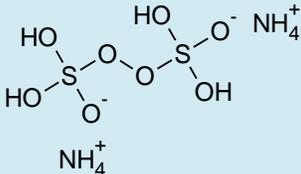
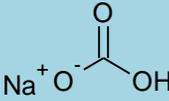
IV. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Materiales

4.1.1. Polimerización en emulsión de poli (2-EHA/MMA/AA)

Las principales características de los reactivos utilizados para la polimerización en emulsión del terpolímero en estudio, se muestran en la siguiente Tabla:

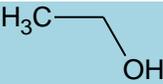
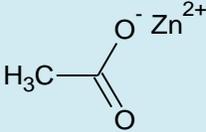
Tabla 3. Reactivos utilizados para la polimerización en emulsión de poli(EHA/MMA/AA)

Función	Nombre	Fórmula	Estructura química	Proveedor
Monómero	Acrilato de 2-etilhexilo (2-EHA)	$C_{11}H_{20}O_2$		Sigma-Aldrich
	Metilmetacrilato (MMA)	$C_5H_8O_2$		Sigma-Aldrich
	Ácido acrílico (AA)	$C_3H_4O_2$		Sigma-Aldrich
Iniciador	Persulfato de amonio (NH₄PS)	$(NH_4)_2S_2O_8$		Sigma-Aldrich
Buffer	Bicarbonato de sodio	$NaHCO_3$		Merck
Agente de transferencia de cadena	Dodecano-1-tiol	$CH_3(CH_2)_{11}SH$		Sigma-Aldrich
Tensoactivo	Latemul s-180	---	Polioxietileno alquileter sulfonato de sodio	Kao Corp.
	Agua desionizada	H_2O	----	----
Inhibidor de reacción	Hidroquinona	$C_6H_4(OH)_2$		Merck

4.1.2. Preparación de NPs de ZnO

Para la síntesis de NPs de ZnO se utilizó una base fuerte, acetato de zinc, usando etanol como solvente, las principales características de los reactivos utilizados se muestran en la Tabla 4:

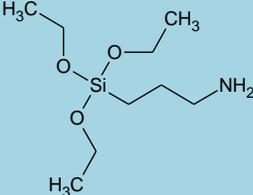
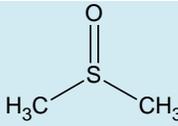
Tabla 4. Reactivos utilizados para las NPs de ZnO mediante hidrólisis química

Reactivo	Fórmula	Estructura química	Proveedor
Etanol	C_2H_6O		---
Acetato de zinc dihidratado	$Zn(O_2CCH_3)_2(H_2O)_2$		Sigma-Aldrich
Hidróxido de sodio	NaOH	---	Sigma-Aldrich

4.1.3. Modificación de NPs de ZnO

La modificación de las NPs de ZnO se llevó a cabo con agentes modificantes, los reactivos utilizados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Reactivos utilizados en la modificación superficial de NPs de ZnO

Reactivo	Fórmula	Estructura química	Proveedor
3-aminopropiltrióxido de silano (APTES)	$C_9H_{23}NO_3Si$		Sigma Aldrich
Dimetilsulfóxido (DMSO)	C_2H_6OS		Sigma Aldrich
Octano	C_8H_{18}		Sigma Aldrich

4.1.4. Ensayos antimicrobianos

Para el estudio antimicrobiano de las NPs de ZnO así como del nanocompuesto, se utilizaron 6 diferentes bacterias todas ellas American Type Culture Collection (ATCC), las cuales fueron provistas por LESP (Laboratorio Estatal de Salud Pública de Aguascalientes). En la Tabla 6, se muestran las bacterias analizadas así como en la Tabla 7 se describen los reactivos necesarios para llevar a cabo los ensayos antimicrobianos.

Tabla 6. Colección de bacterias utilizadas en el estudio antimicrobiano

BACTERIA	GRAM	CARACTERÍSTICAS
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	(-)	bacilo
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	(-)	bacilo
<i>Klebsiella Oxytoca</i> ATCC 8724	(-)	bacilo
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853	(-)	bacilo
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	(+)	cocos
<i>Streptococcus Pyogenes</i> ATCC 19615	(+)	cocos

Tabla 7. Reactivos para pruebas antimicrobianas

Ensayo	Reactivo	Proveedor
Difusión en agar	Agar Mueller Hinton	Acumedia
	Sensidiscos de amoxicilina, ciprofloxacino,	Dilaco
	Agua desmineralizada estéril	----
Determinación de CMI	Caldo Mueller-Hinton	Acumedia
	Agua desmineralizada estéril	----
	Agente Dispersante Tween (80)	----
	PBS	Cellgro
Determinación de CMB	Agar Plate count	Acumedia

4.1.4.1. Preparación de medios de cultivo

◆ Preparación de agar Mueller Hinton

Se suspendieron 38 g del polvo en un litro de agua purificada. Se mezclaron perfectamente, calentaron con agitación frecuente y se hirieron durante un minuto hasta la disolución completa.

◆ Preparación de agar plate count

Se disolvieron 23.5 g del polvo en un litro de agua purificada, la solución se calentó con agitación frecuente durante un minuto hasta disolución completa. La esterilización se llevó a cabo a 121°C durante 15 minutos.

*El agar sangre y caldo Mueller-Hinton son preparados comerciales.

4.1.5. Ensayos de citotoxicidad de NPs de ZnO

Para el ensayo MMT de NPs ZnO, se utilizaron dos importantes líneas celulares, HeLa y NCI, todas ellas fueron provistas por la Universidad de Vigo (Galicia, España), las cuales fueron obtenidas de la ATCC (American Type Cell Collection). En la Tabla 8 se muestran las características más importantes, mientras que en la Tabla 9, se muestran los reactivos que fueron requeridos para los ensayos de citotoxicidad.

Tabla 8. Líneas celulares utilizadas para la determinación de citotoxicidad de NPs

Ensayo	Línea celular	características
MTT	NCI-H460	Pulmón
	HeLa	Cancer de cérvix

Tabla 9. Reactivos para ensayos de respuesta biológica a NPs de ZnO

Ensayo	Reactivo	Proveedor
MTT	DMSO	Sigma-Aldrich
	Medio de cultivo RPMI	Gibco
	Buffer de fosfato salino (PBS)	Cellgro
	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT)	Sigma-Aldrich
	RPMI	Gibco
	Suero bovino fetal (SBF)	Gibco
	Antibiótico	Gibco
	Azul de tripán	Merck
Activación del complemento	PBS	Cellgro
	Persulfato de amonio	Sigma-Aldrich
	Acrilamida	Sigma-Aldrich
	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina(TEMED)	Sigma-Aldrich
	Tris	Sigma-Aldrich
	Dodecilsulfato sódico (SDS)	Sigma-Aldrich
	2-B-mercaptoetanol	Sigma-Aldrich
	azul bromofenol	Sigma-Aldrich
	Glicina	Sigma-Aldrich
	NaCl	Sigma-Aldrich
	Leche	Sigma-Aldrich

4.1.5.1. Preparación de reactivos para ensayo MTT

◆ Solución stock MTT

El reactivo en forma comercial se encuentra liofilizado. En la oscuridad se resuspendió en PBS 1X a una concentración de 5 mg/mL. Esta solución se filtró y se almacenó a -20° hasta su uso.

4.1.5.2. Preparación de reactivos para ensayo de activación del complemento

- ◆ **Gel inferior:** La red de poliacrilamida se prepara usando agua destilada una solución buffer para mantener el pH adecuado, y se utiliza acrilamida como monómero, la reacción radicalica se inicia usando persulfato de amonio al 10%, mientras que la red entrecruzada se forma con TEMED como agente entrecruzante. La formulación del gel se muestra a detalle en la Tabla 10 y 11.

Tabla 10. Formulación del minigel inferior

Minigel Inferior	10%
H ₂ O _d	2 mL
Lower buffer	1.25 mL
acrilamida	1.65 mL
Persulfato amónico 10%	75 µL
TEMED	2.5 µL

Tabla 11. Formulación de lower buffer

Lower buffer	(100 mL)
Tris 1.5 M	18.17 g
SDS 0.4%	4mL
Rellenar con H ₂ O _d y ajustar pH a 8.8	

Luego de la preparación inmediatamente se añade el gel al cristal hasta dos centímetros antes del borde superior. Se añade agua hasta el ras, para que el frente quede recto y evitar que el gel se seque. Esperar hasta su solidificación. Se seca el agua con un papel filtro.

- ◆ **Gel superior:** Luego se añade el minigel superior rápidamente para evitar que polimerice antes. En la Tabla 12 y 13, se muestra la formulación correspondiente al

minigel superior y al upper buffer utilizados para la preparación del gel. Luego de preparados y vaciados los dos geles se coloca el peine y se espera a que solidifique

Tabla 12. Formulación del minigel superior

Minigel Superior	
H ₂ O _d	1.5 mL
Upper buffer	625 μL
acrilamida	375 μL
Persulfato amónico 10%	25 μL
TEMED	10 μL

Tabla 13. Formulación de upper buffer

LOWER BUFFER (100 ml)	
Tris 1.5 M	6.05 g
SDS 0.4%	4 ml
Rellenar con H ₂ O _d y ajustar pH a 8.8	

Sample buffer: La formulación utilizada se muestra en la Tabla 14.

Tabla 14. Formulación de Sample Buffer 6x

Sample Buffer 6x (Rellenar con H ₂ O _d 10 mL)	
Upper Buffer	1.5 mL
SDS 20%	3 mL
Glicerol	3 mL
Añadir 600 μL de 2-B-mercaptoetanol + unas trazas de azul bromofenol (polvitos)	

Running Buffer: Se prepara running buffer 5x como solución madre, luego se diluye en agua hasta obtener el running buffer 1x (Se añaden 200 mL 5X y 800 mL H₂O miliQ), la formulación se muestra en la Tabla 15.

Tabla 15. Formulación de Running Buffer 5x

Running Buffer 5x (Rellenar con H ₂ O hasta 1000 mL)	
Tris	15.1 g
Glicina	72 g
SDS 0.5%	5 g
Ajustar pH a 8.6	

Transfer buffer: La formulación la solución madre de transfer buffer se muestra en la Tabla 16. Para el ensayo se utilizó transfer buffer 1X, el cual es preparado añadiendo 240 mL H₂O + 45 mL metanol + 15 mL Transfer Buffer 20x.

Tabla 16. Formulación de Transfer buffer 20X

TRANSFER BUFFER 20 X (1000 mL)	
Tris 200 Mm	24.23g
Glicina 2 M	150.14g
Rellenar con H ₂ O hasta 1000mL	

TBST: La formulación de TBST 4X se describe en la Tabla 17. Para el ensayo se utilizó TBST 1X, su preparación se describe en la Tabla 18, al cual se le añade al 5% de leche en agitación a 4°C.

Tabla 17. Formulación del TBS 4X

TBS 4X (100 ml)	
Tris	9.68g
NaCl	32 ml
Rellenar con H ₂ O hasta 1000 ml y ajustar pH a 7.6	

Tabla 18. Formulación de TBS-T 1X

TBS-T 1X (100 ml)	
TBS 4X	18.17g
0.1% Tween 20	4ml
Rellenar con H ₂ O hasta 1000 ml	

4.2. Métodos

4.2.1. Síntesis de NPs de ZnO

La síntesis de las NPs de ZnO, se llevó a cabo mediante el método de hidrólisis química. En un matraz bola provisto de tres bocas se colocaron 13.7 g de Zn (AcO)₂ y 600 mL de ETOH. Esta solución se agitó constantemente a una temperatura de 75°C en reflujo durante 2h. Después se adicionó una solución acuosa 0.22 M de NaOH y 100 mL más de H₂O para completar la mezcla de reacción. Se continuó con agitación constante durante 24 h. Posteriormente las NPs obtenidas inmersas en etanol fueron centrifugadas a 15,000 rpm durante 5 minutos para recuperarlas. El precipitado fue lavado 2 veces con etanol y secado en una estufa a 60°C por 24 horas. Las NPs secas fueron trituradas en un mortero de ágata para obtener un polvo fino y fueron almacenadas a temperatura ambiente hasta su uso.

4.2.2. Modificación superficial de NPs de ZnO

Para la modificación superficial de las NPs, se utilizaron dos agentes modificantes con el fin de mejorar la compatibilidad de las NPs con la matriz polimérica. Se colocaron 5g de NPs de ZnO en un matraz bola de 3 bocas provisto de un condensador, al que se le adicionaron 50 mL de octano como solvente. Los diferentes agentes modificantes (dimetil sulfóxido y 3-aminopropiltriétoxisisilano) se añadieron en una proporción 2:1. La reacción se llevó a cabo mediante reflujo y agitación constante por 12 h.

4.2.2.1. Caracterización de NPs de ZnO

◆ Difracción de rayos X de ángulo amplio (XRD)

El análisis de difracción de rayos X se llevó a cabo en un difractómetro SIEMENS D-500 utilizando radiación CuK α (25 mA, 35 kV) en un intervalo de barrido de 10 a 80° en la escala de 2 θ , con una velocidad de 0.02 grados/s. Esta técnica se utilizó para identificar la fase cristalina y el tamaño aproximado de las NPs de ZnO.

◆ **Espectroscopía de Infrarrojo por transformada de fourier (FT-IR)**

La espectroscopía de infrarrojo (FT-IR) se efectuó en un espectrómetro Nicolet Magna5500. Los espectros de infrarrojo de las NPs ZnO se obtuvieron preparando pastillas de KBr. Esta técnica de caracterización se uso para identificar la presencia de especies absorbidas en la superficie de las NPs.

◆ **Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

Se utilizó un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo JEOL JSM-7401F, en modo STEM, utilizando voltajes de 0.5 a 30 kV con detector LEI (Low Electron Image) para observar la morfología y evaluar el tamaño de las de las NPs ZnO. Los polvos estudiados fueron evaluados dispersando un poco de la muestra en agua, de la cual posteriormente se coloco una pequeña gota en una rejilla de cobre especial para realizar el análisis en el microscopio, dejando secar la gota y por último introducirla al microscopio para apreciar la estructura obtenida.

4.2.2.2.Determinación de actividad antimicrobiana de NPs de ZnO

La evaluación del efecto antimicrobiano de las NPs de ZnO, se llevó a cabo por medio de dos diferentes métodos. Para la evaluación cualitativa, se utilizó el método de difusión en agar. Esta es una forma rápida y sencilla para determinar la sensibilidad bacteriana frente a diversos agentes.

La evaluación cuantitativa permitió determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB), y se realizó mediante el método de microdilución en placa sugerido por la CLSI.

4.2.2.2.1. Prueba rápida de sensibilidad bacteriana. Método de difusión en agar

◆ **Preparación de los discos de NPs**

Para la evaluación del efecto antimicrobiano mediante la prueba de difusión en agar se utilizaron discos de NPs, los cuales fueron preparados, pesando 50 mg \pm 0.2 de las NPs a analizar. El polvo fue prensado para obtener un disco uniforme.

◆ **Preparación del inóculo**

El inóculo se preparó tomando con un hisopo una muestra de un cultivo de 24 h y se colocó en solución salina. Esta suspensión se ajustó al 0.5 de McFarland, usando un nefelómetro marca Phoenix, la cual corresponde a 1.5×10^8 UFC/mL.

Las bacterias evaluadas fueron *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Klebsiella Oxytoca* ATCC 8724, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, descritas anteriormente en la Tabla 7.

◆ **Determinación de la sensibilidad bacteriana a diferentes NPs**

La suspensión bacteriana se extendió en 3 planos sobre la superficie de la placa de agar sangre (AS) para *S. pyogenes* y Mueller Hinton (MH), para las cepas restantes usando un hisopo de algodón. Luego se colocaron los controles positivos, los cuales corresponden a los antibióticos comerciales específicos para cada bacteria. Los discos de NPs se depositaron sobre el agar inoculado, con al menos 3 cm de separación una de otra y no más de 5 discos por placa de agar, como lo marca el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), como se observa en la Figura 6, cabe mencionar que el ensayo se realizó por triplicado. Las placas con agar se incubaron en un ambiente aeróbico a 37°C, de 18 a 24 horas. Al día siguiente se registraron las zonas de inhibición, de cada sistema en estudio, para cada una de las bacterias analizadas, se realizaron los cálculos respectivos para obtener la media de las repeticiones realizadas.

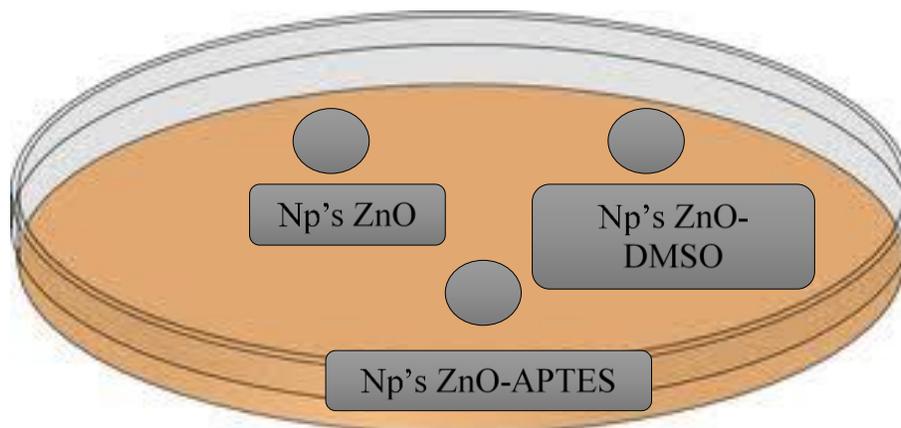


Figura 6. Ilustración del diseño para la determinación de la sensibilidad

4.2.2.2.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). Técnica de microdilución en placa de 96 pozos.

♦ Preparación de las diluciones de NPs

Se preparó una suspensión patrón de 3200 $\mu\text{g/mL}$ de las muestras de NPs inmersas en solución buffer de fosfatos (PBS). Esta suspensión se sonificó por 30 min. De esta dispersión se prepararon, diluciones correspondientes a 1600, 800, 400, 200, 100 $\mu\text{g/mL}$ de los sistemas a estudiar.

♦ Preparación del inóculo

Para la propagación bacteriana, se utilizó un cultivo fresco de 24 h en agar Mueller Hinton, del cual fue tomada una asada y fue colocada en agua desmineralizada ajustando el inóculo de la bacteria a evaluar a 0.5 en la escala de Mc Farland usando un nefelómetro phoenix, igual que el caso anterior.

De este inóculo se transfirieron 10 μL , a 11 mL de caldo de cultivo Mueller Hinton, para las bacterias gram (-), de igual modo, para las bacterias gram (+), se tomaron 50 μL de la suspensión bacteriana y se transfirieron a 11mL de caldo de cultivo MH. Es importante mencionar que el inóculo solo puede ser utilizado durante los 15 minutos posteriores a su preparación, debido a la rápida reproducción bacteriana, puesto que de lo contrario habrá resultados falsos.

◆ **Ensayo de concentración mínima inhibitoria en microplaca**

Para realizar este ensayo, se utilizó un control negativo y un control positivo. El control negativo corresponde a las diluciones correspondientes de NPs y el caldo de cultivo Mueller Hinton preparado en una relación 2:1, para obtener un volumen final de 150 μL .

El control positivo, corresponde a la suspensión bacteriana preparada en caldo Mueller Hinton, y 100 μL de PBS. Cada una de las muestras corresponden 100 μL a las diluciones de 3200 a 100 ppm, y 50 μL la suspensión bacteriana a evaluar (Figura 7).

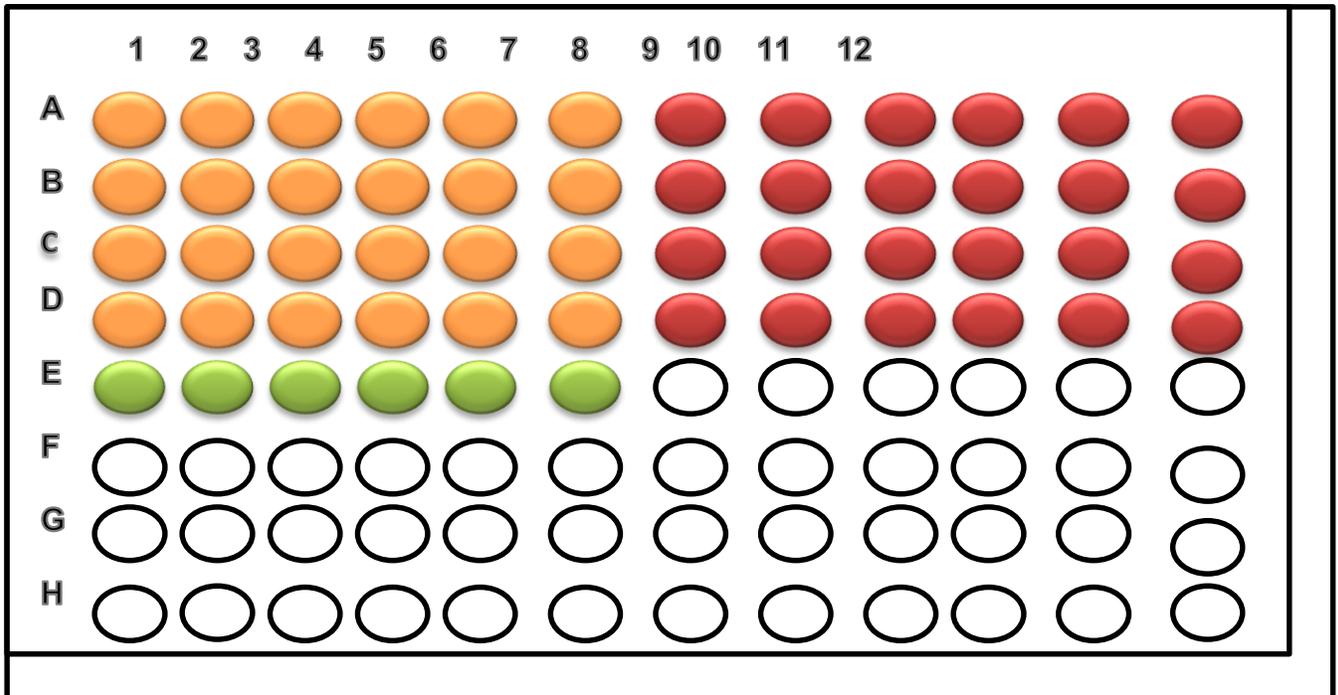
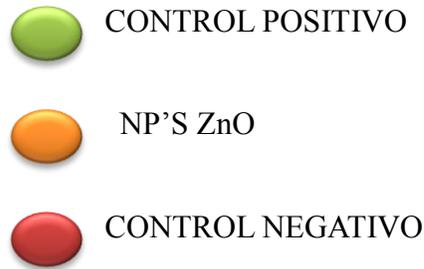


Figura 7. Plantilla del ensayo para la determinación de la concentración mínima inhibitoria

Posteriormente la placa se incubó por 24h y transcurrido este tiempo, se determinó la densidad óptica a 650 nm en un lector de ELISA para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y el porciento de inhibición, mediante la Ec. 2.

$$\% \text{ de Inhibición: } \frac{\text{control (OD650)} - \text{Muestra (OD 650)}}{\text{control (OD650)}} * 100 \quad (2)$$

OD es la densidad óptica.

4.2.2.2.3. Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB)

De la placa de 96 pocillos, se tomaron 100 µl de cada pocillo donde no se observó crecimiento bacteriano, para luego inocularse en cajas petri mediante el método en fundido con agar plate count (PCA), el cual consiste en poner la muestra y vaciar el medio fundido a 40°C aprox. y homogeneizarlo con movimientos en forma de ocho para asegurar la dispersión de la muestra.

Este ensayo se realizó con el fin de determinar la CMB para cada una de las bacterias. Las placas sólidas se incubaron por 48 h a una temperatura de 37°C. Transcurrido el tiempo se realizó el conteo de colonias.

4.2.2.3. Determinación de citotoxicidad de NPs de ZnO

La evaluación de la toxicidad celular de las NPs en estudio, se llevó a cabo por cuatro diferentes técnicas: La viabilidad celular, se determinó mediante el método MTT y xCELLIGENCE, así como la LD50 (dosis letal media). La inmunotoxicidad, se determinó por medio de la activación del complemento y la medición de citocinas proinflamatorias en suero de personas sanas.

4.2.2.3.1. Ensayo MMT

El propósito de este estudio fue determinar el posible efecto citotóxico de un agente sobre líneas celulares tumorales ó cultivos primarios de células normales. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto de color violeta (formazan), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular, determinando que la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. Este método fue desarrollado por *Mosmann* en 1983 [98] siendo modificado en 1986 por *Francois Denizot y Rita Lang* [99].

En este caso, las sales de tetrazolio, que son de un color amarillo, por la acción de la succinato deshidrogenasa mitocondrial, se transforman en un metabolito insoluble, el formazán, que es color violeta, coloreando el medio de cultivo. La formazán se puede cuantificar midiendo la absorbancia del cultivo en un lector de ELISA a una longitud de onda de 570nm. Por su sencillez, sensibilidad y semiautomatismo permite cuantificar un elevado número de muestras (Figura 8) [100].

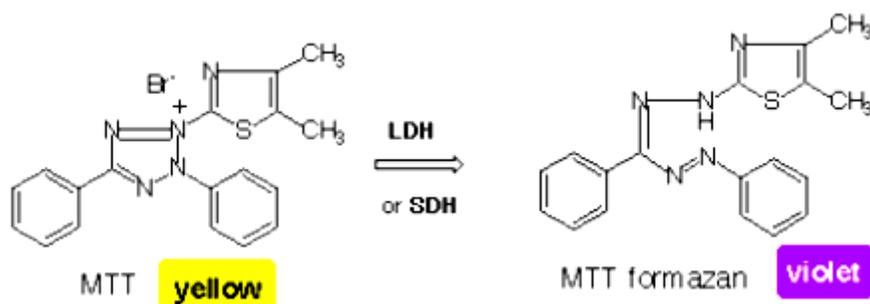


Figura 8. Reacción mediada por la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial

◆ Preparación de la línea celular

Células NCI y Hela en cultivo a 37°-5% CO₂ en medio RPMI+antibiótico+10%FBS, fueron transferidas a un tubo cónico de 50 mL, el cual posteriormente fue centrifugado a 1200 rpm por 5 minutos en una centrífuga. El pellet (pastilla) fue resuspendido en 1 mL de medio RPMI, adicionado con antibiótico y suero bovino fetal al 10%. Luego una alícuota de 10µL fue tomada y fue transferida a un tubo ependorf que contenía 90 µL de azul de tripán, para realizar el conteo en la cámara de Neubauer. Finalmente el volumen de las células fue ajustado hasta obtener 100,000 células/mL.

◆ Preparación de soluciones acuosas de NPs

Se preparó una solución madre de NPs, de la siguiente manera, se pesaron 10 mg de NPs y se dispusieron en 900 µL de agua mili-q filtrada, para completar el volumen de 1mL se agregó FBS, el cual tiene la función de mejorar la dispersión de las NPs. Posteriormente se

realizados los cálculos correspondientes para obtener una concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$, utilizando como diluyente medio de cultivo RPMI+Ab+FBS 10%. Esta solución fue sonificada en un baño de ultrasonido marca Branson durante 5 minutos, para obtener una dispersión homogénea.

◆ Método

Se colocaron 100 μL de células inmersas en el medio RPMI+antibiótico+10%FBS, en los pocillos correspondientes, en una microplaca de cultivo con fondo plano, ajustadas a 100,000 células/mL como se había mencionado anteriormente. Las células fueron incubadas por 24 horas a 37°C con 5% CO_2 . Poco antes del término de la incubación, se prepararon diluciones de NPs en medio RPMI + RPMI+ab+10%FBS, en una placa con fondo en U, partiendo 500 $\mu\text{g/mL}$, hasta terminar en una concentración de 3.9 $\mu\text{g/mL}$.

Luego de las 24 horas de incubación de las células, el medio en el que se encontraban inmersas fue retirado y 100 μL de cada una de las diluciones de NPs fue depositado en los pocillos correspondientes, con su respectiva repetición, como se muestra en la Figura 9.

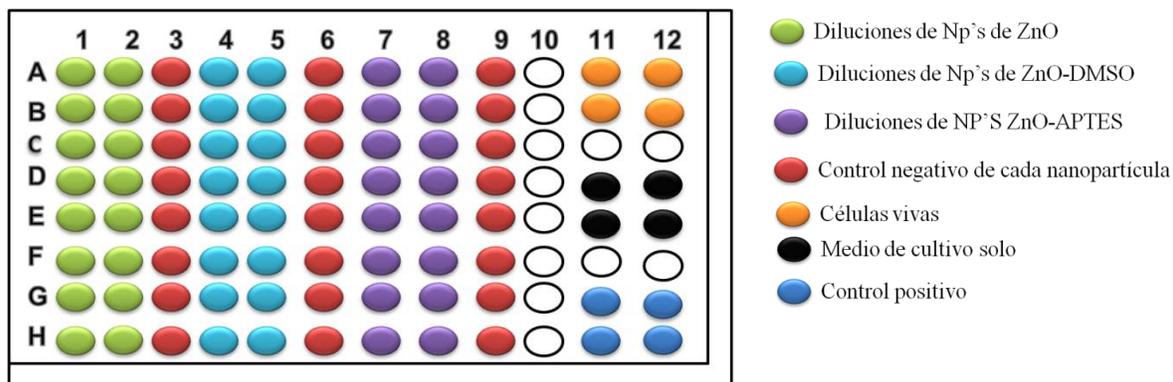


Figura 9. Plantilla para el ensayo MTT

Se utilizó un control el cual corresponde a las NPs solas, se dispusieron pocillos como control negativo el cual corresponde a las células solas, otro control que corresponde al medio de cultivo solo sin las células, todos los tratamientos fueron ajustados a 100 μL , cada

uno. La microplaca de fondo plano fue incubada nuevamente por 24 horas. Una hora antes del término de la incubación, en los pozos correspondientes, fue colocado como control positivo triton X-100, el cual es un detergente capaz de lisar a las células. Y se dejó actuar por una hora. Al término de la incubación, se agregó 10 μ L 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), en cada pocillo y la placa fue incubada nuevamente por 4 horas a 37°C con 5% CO₂. Tras el tiempo de incubación, el medio de cultivo fue retirado de todos los pocillos con una micropipeta multicanal, luego se añadieron 100 μ L por pocillo de DMSO, el DMSO permite que los cristales formados por el MTT se disuelvan, es importante mencionar que se debe agitar un poco (up & down) con la multicanal hasta disolver el precipitado, para obtener un color azul-violáceo uniforme, evitando hacer burbujeo, ya que esto interfiere con las mediciones.

Después de realizado este proceso, se midió la absorbancia en un lector Envision (Perkin Elmer Inc., Norwalk), a 570 nm, realizándose los cálculos los cuales se muestran en la Ec. 3, para obtener los índices de viabilidad/proliferación.

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\text{Cel. tratadas}(570 \text{ nm}) - \text{NPs}(570 \text{ nm})}{\text{Cel sin tratamiento}(570 \text{ nm}) - \text{medio}(570 \text{ nm})} * 100 \quad (3)$$

4.2.2.3.2. xCELLIGENCE

El fundamento de la técnica del lector de placas xCELLigence consiste en medir las variaciones en la impedancia eléctrica mediante microelectrodos interdigitales integrados en el fondo de los pocillos de la placa. La presencia de las células sobre los electrodos afectará al ambiente local iónico en la interfase de electrodo/solución, conduciendo a un aumento de la impedancia registrada por el electrodo (Figura 10), ya que esta última nos proporciona la información cuantitativa sobre el estado biológico de las células, incluyendo el número de células, la viabilidad, y la morfología.

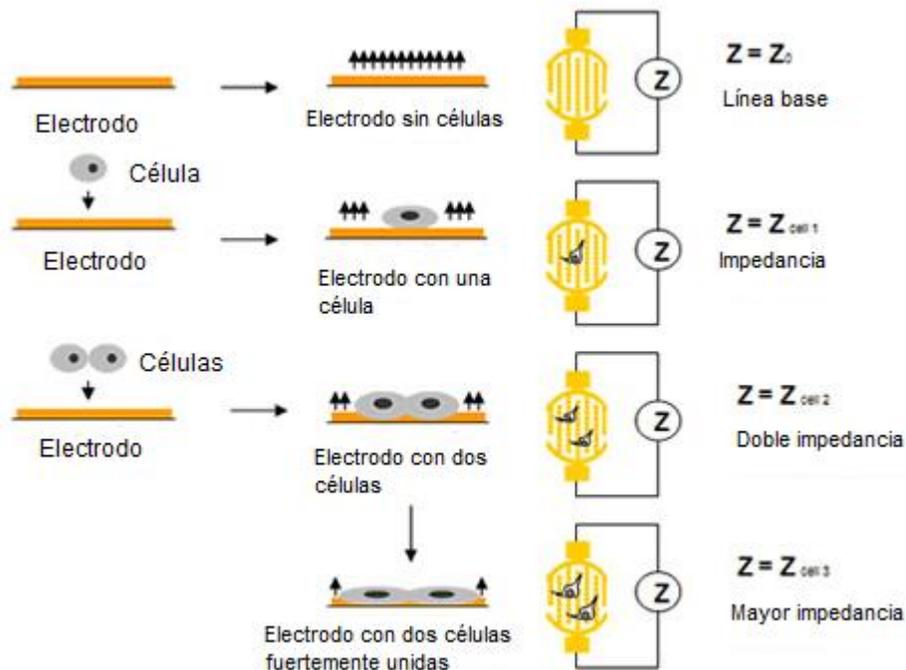


Figura 10. Esquema del funcionamiento del lector de placas xCELLIGENCE

Cuanto más células se ubican sobre los electrodos de los pocillos de la placa, los aumentos de la impedancia del electrodo resultan ser más grandes. Además, la impedancia depende de la calidad de la interacción de la célula con los electrodos. Por ejemplo, la adherencia de una célula aumentada o de la extensión conducirán a un cambio más grande de la impedancia de electrodo. Así, la impedancia de electrodo, que es mostrada como el índice de célula (CI), puede ser usada para supervisar la viabilidad de la célula, el número, la morfología, y el grado de adherencia en los ensayos celulares [100].

◆ Preparación de las muestras

En una placa de 16 pocillos xCELLIGENCE, se colocaron en los pocillos A-G, 10,000 células de la línea NCI-H460 en cada uno, inmersas en medio RPMI, y se incubaron 24 horas, en el lector de xCELLIGENCE. Después de pasado este tiempo, 100 μL de diferentes concentraciones de NPs en medio de cultivo RPMI, 500, 250, 125, 31.5 y 15.6 $\mu\text{g/mL}$ fueron añadidas de los pocillos A-F, los pocillos H1 y H2, se pusieron los controles: la

concentración mas alta de NPs y medio RPMI, respectivamente. Luego se colocó en el lector por 92 horas, para determinar la viabilidad celular y la LD50 (Figura 11).

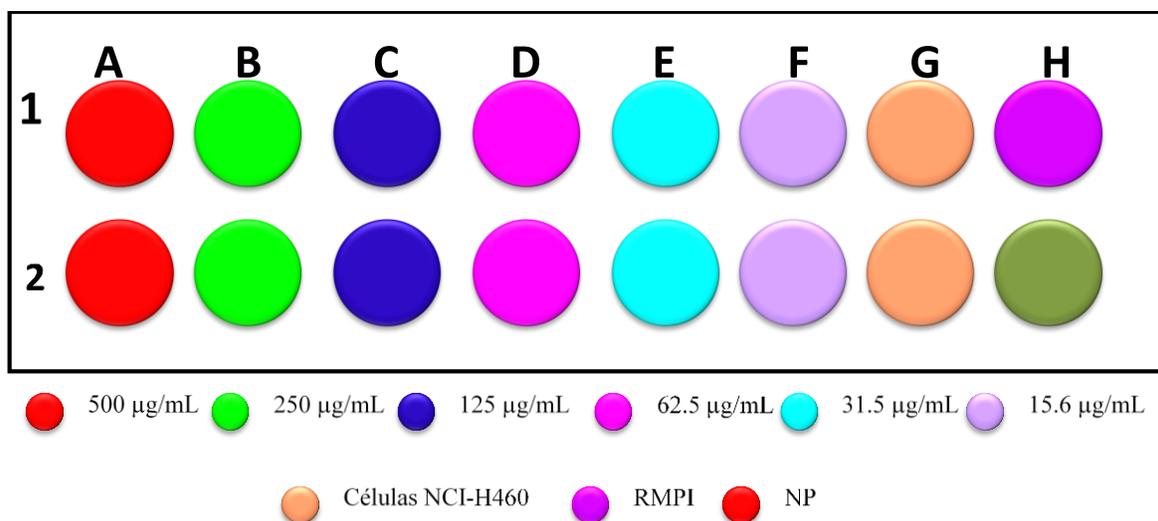


Figura 11. Representación de placa de xCELLigence de 16 pocillos

4.2.2.3.3. Activación del complemento

En este apartado se describe un método cualitativo para la detección de la activación del complemento por western blot. Este método usa el producto de corte del componente de C3 como marcador de la activación del complemento por alguna vía. En este protocolo, el plasma humano es expuesto a las NPs de ZnO y luego son analizados por medio de geles de electroforesis de acrilamida (PAGE) seguido de la adición de anticuerpos por western blot de anti-C3. Estos anticuerpos reconocen los componentes nativos de C3 del complemento y a los productos de escisión. Las cantidades de C3 y los productos de escisión de C3 son comparadas contra la cantidad en plasma control (no tratado) y el plasma tratado con un control positivo (Zimosan) para proporcionar una evaluación cualitativa rápida y barata de la activación del complemento [101].

◆ **Preparación de las muestras**

Se prepararon por duplicado soluciones acuosas de NPs que correspondían a 200 mg/mL y 20 mg/mL, las cuales fueron dispersadas mediante ultrasonido, durante 10 minutos, Una vez preparadas, las muestras fueron agitadas mediante un vortex e incubadas en un baño por 1h a 37°C.

Las muestras a evaluación fueron preparadas como se muestra en la siguiente Tabla:

Tabla 19. Preparación de muestras para activación del complemento

MUESTRA	50 µL Nps [] deseada
	50 µL Buffer PBS
	50 µL suero AB+
CONTROL +	50 µL Zimosan
	50 µL Buffer PBS
	50 µL suero AB+
CONTROL -	100 µL PBS 1x
	50 µL suero AB+

En este lapso fueron preparados geles de poliacrilamida, para determinar la activación del complemento mediante la técnica western blot. Luego de transcurrido el tiempo de incubación, 50 µL de las muestras y 50 µL Sample Buffer 5X con 0.25 de B-mercaptoetanol, fueron dispuestos en microtubos de 150 µL. Posteriormente las alícuotas preparadas se pasaron por un vórtex para homogenizar la muestra. Después las muestras fueron hervidas en un termociclador de BIO-RAD 5 min a 96°C. A continuación las muestras se pasaron por hielo y centrifugaron 30 min a una temperatura de 4°C y 13000 rpm.

El sobrenadante fue recogido en microtubos de 150 µL. Después los geles fueron colocados en la cubeta y los espacios entre los dos geles fueron rellenos con Running Buffer 1x y se vació este buffer hasta la marca que dispone el fabricante para dos geles.

Una vez llena la cubeta, se retiraron los peines y se procedió a cargar 3 μL de las muestras y 5 μL del marcador de peso molecular. Los geles fueron corridos a 200 V por 50 minutos en la cámara de electroforesis marca BIO-RAD. Una vez terminado el ensayo, los cristales fueron depositados en H_2O . Previamente se cortaron las membranas y los papeles whatman que deben ser del mismo tamaño del gel. La membrana (immuno blot PVDF catalog. 162.0176) se colocó unos segundos en metanol. Luego se pasó 5 min en H_2O_d (Agua destilada) y luego en Transfer Buffer 10-15 min. El gel se sacó despacio del H_2O_d y fue pasado a buffer transferencia. Se preparó el aparato de transferencia marca BIO-RAD y se colocaron los papeles, gel y la membrana como se muestra en la Figura 12.

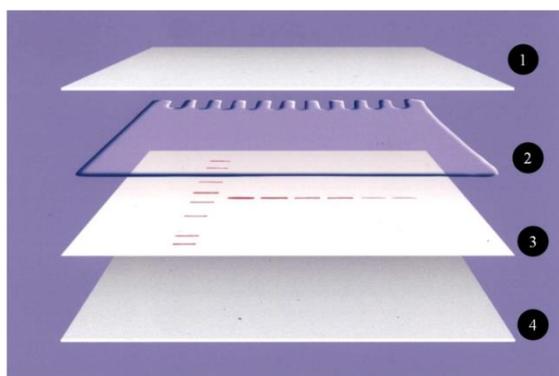


Figura 12. Ilustración de la transferencia de proteínas del gel a la membrana. 1. Papel, 2. Gel, 3. Membrana, 4. Papel.

El tiempo de transferencia fue de 30 min a 23V. Al término de la transferencia la membrana fue lavada con TBST 1X tres veces durante 5 min. La membrana es bloqueada toda la noche en TBST 1X al 5% de leche en agitación a 4°C. Nuevamente la membrana se lavó con TBS-T 1X, 3 veces durante 5 min e inmediatamente fue incubada con el anticuerpo primario monoclonal IgG2b mouse ANTI C3/C3b Human a una dilución 1/1000 (la dilución se realiza en TBS-T 1X al 5% Leche) durante 90 min a temperatura ambiente en agitación. Después del tiempo transcurrido, la membrana fue lavada con TBS-T 1X, 3 veces durante 5 min. Luego la membrana se incubó con el Anticuerpo secundario Goat anti-Ig mouse AP (DO486) a una dilución 1/2000 (la dilución se realiza en TBS-T 1X al 5% Leche), también durante 90 min a temperatura ambiente en agitación. Nuevamente la

membrana fue lavada como se describió anteriormente y se procedió al revelado con BCIP hasta que las bandas fueron visibles. En cuanto las bandas se observaron la membrana fue pasada a H_2O_d para detener la reacción y evitar que la membrana se quemara. Después la membrana fue secada a temperatura ambiente y las bandas fueron cuantificadas para determinar la activación del complemento en la imagen lab software de BIO-RAD.

4.2.2.3.4. Determinación de citocinas proinflamatorias

◆ Preparación de las muestras (separación de mononucleares de sangre periférica)

Se centrifugó el tubo que contenía la sangre a $400 \times g$ durante 8 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el tapón del tubo de sangre. Se traspasó el resto de la sangre hacia un tubo Falcon de 50 mL y se completó hasta 20 mL con RPMI 1640. Luego se homogeneizó el tubo que contenía la sangre-RPMI durante 30 min. Se añadieron 15,5 mL de Ficoll, y se centrifugó a 1000g durante 1 min.

Se aspiró, el exceso de Ficoll que pudiera quedar por encima de la membrana separadora del tubo Leucosep®. Se añadió por decantación al tubo Leucosep® la totalidad de la sangre-RPMI. Después se centrifugó a 800g 15 min. a temperatura ambiente Es muy importante que la centrífuga esté programada con rampas de aceleración y frenado lo más lentas posibles. Se obtienen mejores separaciones si la centrifugación se realiza a 18°C. Luego se aspiró con pipeta serológica toda la fase superior para traspasarla a un tubo Falcon de 50mL.

Nuevamente se aspiró y se desechó el sobrenadante cuidadosamente de no romper el pellet. Luego se añadieron 2 mL de RPMI con pipeta serológica, resuspendiendo y homogenizando el pellet celular. Finalmente se extrajo una muestra de 50-100 μ L y realizó un conteo total en cámara Thoma o similar para establecer el número total de células viables recuperadas. Luego las células fueron expuestas a 10 y 100 μ g de NPs por 24 horas. Después del tiempo, se evaluó la producción de citocinas proinflamatorias, mediante un kit

comercial de eBioscience y se siguieron las instrucciones del fabricante. Las mediciones se hicieron mediante un citómetro para la determinación de la producción de citocinas.

4.2.3. Preparación de los nanocompuestos poli(2-EHA/MMA/AA)/ZnO mediante polimerización en emulsión

La obtención de nanocompuestos se llevó a cabo con la incorporación de diferentes concentraciones (0.1, 0.2 y 0.3%) de NPs de ZnO sin y con modificación superficial con los agentes DMSO y APTES (Tabla 20), además se preparó un adhesivo PSA sin NPs para usarlo como comparativo.

Tabla 20. Porcentaje de NPs incorporadas al adhesivo acrílico

Nanocompuesto	% en peso de NPs de ZnO
PSA/ZnO	0.1
	0.2
	0.3
PSA/ZnO-DMSO	0.1
	0.2
	0.3
PSA/ZnO-APTES	0.1
	0.2
	0.3

La reacción de polimerización se realizó vía radicales libres en un reactor enchaquetado de vidrio de 100 mL donde se preparó una solución micelar del tensoactivo/H₂O desionizada, los cuales fueron colocados en agitación a 400 rpm durante 20 minutos junto con el buffer disuelto en 5g de H₂O desionizada. Cuando se incorporaron las NPs al sistema de reacción, estas fueron sonificadas con un equipo de ultrasonido de 750W a una potencia de 38% con el fin de mejorar su dispersión. Posteriormente se añadió la fase oléica compuesta por una mezcla de monómeros y el agente de transferencia de cadena (ATC), la cual se mantuvo en

agitación durante 10 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se adicionó el iniciador disuelto en 5 g de H₂O desionizada para así completar la mezcla de reacción. Los componentes de reacción, así como el porcentaje utilizado se muestran en la Tabla 21. La concentración de los monómeros principales 2-EHA/MMA fue de 8:20 respectivamente, mientras que la temperatura de polimerización fue de 80°C.

Tabla 21. Componentes de reacción

Componente	(phm*)
Iniciador	0.1
ATC	0.3
Buffer	0.15
Ácido acrílico	2
Tensoactivo	0.20

***phm**: partes por cien partes de monómero en peso

Durante la reacción se determinó el porcentaje de conversión, que consistió en tomar alícuotas a diferentes tiempos de reacción (10, 20, 30, 45, 60 min) y fueron colocadas en viales, precipitando el polímero, en presencia de 0.5 mL de una solución acuosa de hidroquinona a una concentración de 0.4g/100 mL de solución. Las muestras fueron congeladas a una temperatura de -50 °C durante 2 horas. El copolímero fue secado a peso constante en un liofilizador marca Labconco por 16 horas. Mediante el pesado de las alícuotas se calculó la conversión del monómero en función del tiempo mediante la siguiente fórmula (Ec. 4).

$$\text{Conversión (\%)} = \left(\frac{\text{fracción de polímero}}{\text{fracción de monómero}} \right) * 100 \quad (4)$$

4.2.3.1. Resonancia magnética nuclear (H^1 RMN)

La caracterización se llevó a cabo mediante la disolución de 10 mg de los copolímeros en $CDCl_3$ grado espectroscópico a temperatura ambiente. Se realizaron espectros de resonancia para obtener la composición de los siguientes nanocompuestos: PSA/ZnO 0.3%, PSA/ZnO-DMSO 0.3%, PSA/ZnO-APTES 0.3% y como control el PSA 0%.

4.2.3.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se utilizó un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo JEOL JSM-7401F, en modo STEM, utilizando voltajes de 0.5 a 30 kV con detector LEI (Low Electron Image) para observar la morfología de los nanocompuestos obtenidos. Los látex estudiados fueron evaluados haciendo diluciones de las muestras 1:10,000 en agua, de la cual posteriormente se colocó una pequeña gota en una rejilla de cobre especial para realizar el análisis en el microscopio, dejando secar la gota y por último introducirla al microscopio para apreciar la morfología y la dispersión de las NPs en la muestra.

4.2.3.3. Determinación de la temperatura de transición vítrea mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Las muestras de polímeros fueron preparadas por el pesado de 2g de látex de polímero que luego fueron secados en una estufa a $130^\circ C$ por 45 min. Aproximadamente 10 mg del polímero fueron depositados en charolas de aluminio. La T_g fue determinada usando DSC. El análisis se llevó a cabo con una modulación de amplitud de $\pm 1^\circ C$ cada 60s. La muestra fue enfriada a $-80^\circ C$ para ser luego calentada a $10^\circ C/min$ hasta temperatura ambiente.

4.2.3.4. Determinación de la actividad antimicrobiana de los nanocompuestos

Se evaluó la actividad antimicrobiana de los nanocompuestos obtenidos. El método se fundamenta en la inhibición de crecimiento microbiano, mediante la difusión del principio

activo en un medio de cultivo sólido, que se evidencia en la formación de un halo de inhibición.

◆ **Preparación de parches con los nanocompuestos adhesivos**

Los látex con NPs de ZnO modificadas y sin modificar, se depositaron en una película de poliuretano y fueron secados a temperatura ambiente por 48 horas, para evaporar el agua y el monómero residual. Luego, los parches fueron cortados en pequeños rectángulos de aprox 2.5 cm de largo x 1.5 cm de ancho y fueron esterilizados con luz ultravioleta por un periodo de 1 hora.

◆ **Preparación del inóculo**

El inóculo se preparó tomando con un hisopo una muestra de un cultivo de 24 h y se colocó en solución salina. Esta suspensión se ajustó al 0.5 de McFarland, usando un nefelómetro marca Phoenix, la cual corresponde a 1.5×10^8 UFC/mL. Las bacterias evaluadas en este ensayo se describen en la Tabla 6.

◆ **Determinación de la sensibilidad bacteriana a diferentes nanocompuestos adhesivos**

La suspensión bacteriana se extendió en 3 planos sobre la superficie de la placa de agar sangre (AS) para *S. pyogenes* y Mueller Hinton (MH) para las cepas restantes usando un hisopo de algodón. Los parches adhesivos con diferentes concentraciones de NPs se colocaron sobre el agar inoculado, con al menos 3cm de separación una de otro y no más de 5 discos por placa de agar, como lo marca el CLSI (Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio). Las placas con agar se incubaron en un ambiente aeróbico a 37°C, de 18 a 24 horas. Al día siguiente se registraron las zonas de inhibición, de cada parche en estudio,

para cada una de las bacterias analizadas, y finalmente se realizaron los cálculos respectivos para obtener la media de las repeticiones.

4.2.3.5. Determinación de peel

Una de las principales pruebas que caracterizan el desempeño de los PSA, se basa en el mecanismo de adhesión y desprendimiento del material, como lo es el ensayo peel. Esta prueba se realizó en cintas de 25.4 mm (1.0 pulgadas) de ancho preparadas mediante un recubrimiento preciso de 0.03 mm de espesor de látex en un soporte estándar, es decir, una delgada película de acetato de celulosa de 0.025-0.050 mm, ya que esta película elimina las posibles contribuciones ocultas del material a las mediciones del adhesivo. Las pruebas de los PSA requieren los mismos protocolos de medición de todos los adhesivos como, preparación cuidadosa de las muestras, sustratos limpios y reproducibles, etc. Los PSA son materiales viscoelásticos, por lo tanto los resultados son muy sensibles a la velocidad a la que se llevan a cabo las pruebas y a las condiciones ambientales de temperatura y humedad. Para reducir los efectos de la temperatura y la humedad del ambiente, los estándares de ASTM fijaron las condiciones de prueba a 23°C y 50% de humedad relativa.

Los procedimientos para la evaluación de los materiales sintetizados en este trabajo son los establecidos por la ASTM Peel; D3330, la cual marca una velocidad de prueba de 300 mm/min. Se utilizó un rodillo de 2.06 Kg, el cual se pasó tres veces por la muestras para ejercer presión sobre ella. El ensayo se llevó a cabo en una máquina de ensayos universales Instron, como se muestra en la fotografía (Figura 13).

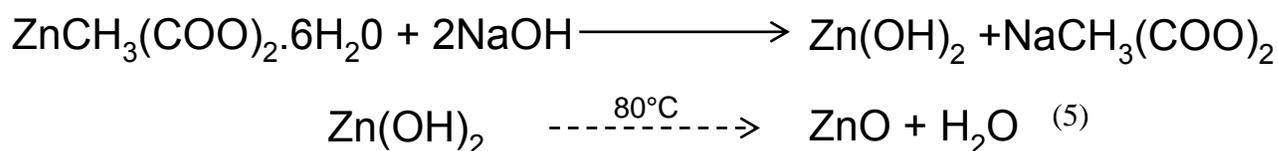


Figura 13. Ensayo de peel en maquina de ensayos universales marca Instron

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Nanopartículas de óxido de zinc

Las NPs de ZnO fueron obtenidas usando el método de precipitación química. La formación de las NPs de ZnO puede ser explicado en la Ec. 5 y las reacciones siguientes [67]:



5.1.1. Caracterización de NPs de ZnO con y sin modificación

5.1.1.1. Difracción de Rayos X de ángulo amplio (XRD)

En la Figura 14 se muestra el difactograma de rayos x del ZnO obtenido de la base de datos del equipo (JCPDS) y el de las NPs obtenidas mediante el método de precipitación. En la Figura se observa que las señales del difractograma muestran una estructura cristalina tipo wurtzita, correspondiente al ZnO. Las señales asignadas a las difracciones de varios planos corresponden al empaquetado hexagonal de la estructura de ZnO. Las señales de $2\theta = 32.02^\circ, 33.02^\circ, 36.94^\circ, 47.73^\circ, 56.57^\circ, 59.05^\circ, 67.85^\circ$ son asignados a (100), (002), (101), (102), (110), (103), (112) [67].

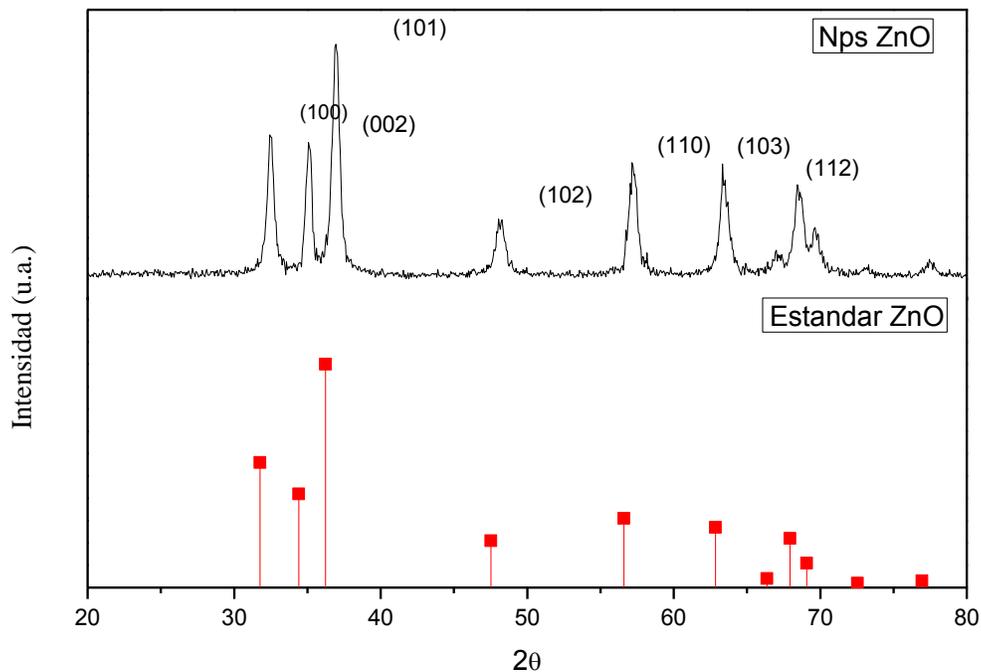


Figura 14. Difractograma de rayos x de NPs de ZnO

Mediante esta técnica es posible determinar el diámetro de las utilizando la Ec. 6 de Debye-Scherrer [67]:

$$D = \frac{K\lambda}{\beta_1 \cos\theta} \quad (6)$$

Donde, D es el diámetro de la partícula, k es la constante de scherrer, λ es la longitud de onda de los rayos X, β la anchura del pico a la mitad del máximo, θ es el ángulo de difracción de Bragg. De acuerdo a esta ecuación el diámetro determinado de las NPs de ZnO mediante esta técnica fue de 12.6 nm aproximadamente.

5.1.1.2. Espectroscopía infrarroja (FT-IR)

En la Figura 15, se muestra el espectro infrarrojo de las NPs de ZnO con y sin modificación obtenidos a temperatura ambiente. En esta Figura se puede apreciar la presencia de una banda de absorción aproximadamente entre los 3420 cm^{-1} , debido al estiramiento del

enlace O-H perteneciente a los grupos hidroxilos que se encuentran presentes en cada una de las muestras, esto puede deberse a la reabsorción de moléculas de agua del medio ambiente [102], así mismo se pueden apreciar dos bandas pequeñas 2925 y 2848 cm^{-1} , que pertenecen a las vibraciones de los enlaces C-H, las cuales se observan más evidentes en las NPs de ZnO modificadas con dimetil sulfóxido, debido a los grupos metilos de este último. Y como era de esperarse en 547 cm^{-1} se presenta la banda que pertenece a estiramientos del enlace Zn-O [103].

En el infrarrojo perteneciente a las nps de ZnO-DMSO, las bandas de 1562 y 1402 cm^{-1} corresponden la flexión del enlace C-H. La banda de 1020 cm^{-1} , corresponde al estiramiento del enlace S-O del DMSO asociado con agua y finalmente en 567 cm^{-1} aparece la banda que pertenece a estiramientos del enlace Zn-O [104].

Las nps ZnO-APTES, tienen unas nuevas vibraciones las cuales se observan en 1583, 1110, 998 y 923 y pueden ser asignadas a las vibraciones de estiramiento del enlace $-\text{SiOH}$ y Zn-O-Si y Si-O-Si a las vibraciones simétricas de estiramiento respectivamente [105].

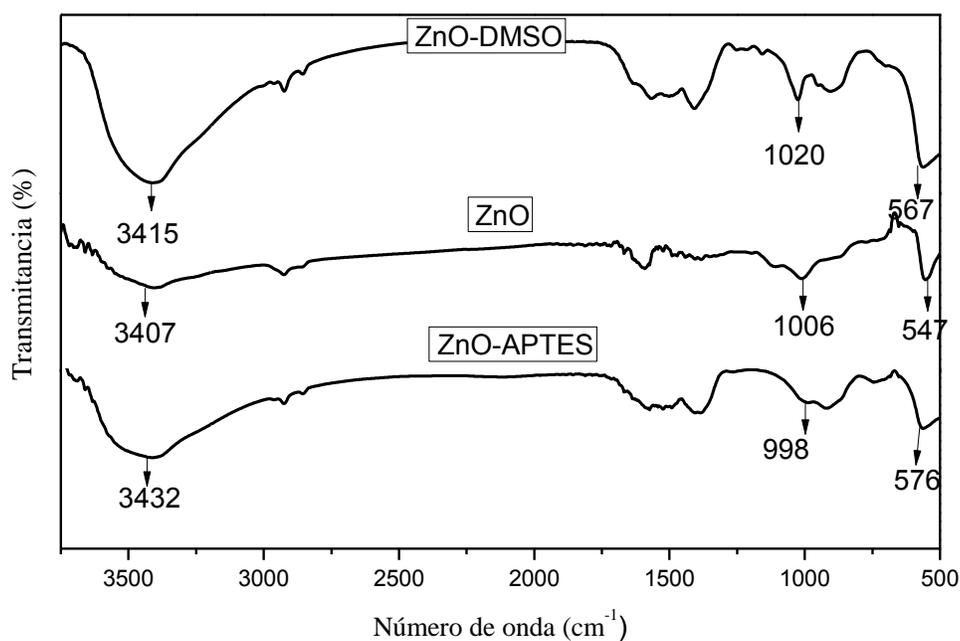


Figura 15. Espectro infrarrojo de NPs de ZnO con y sin modificación superficial

En la Tabla 22 se resumen las bandas características de cada nanopartícula analizada.

Tabla 22. Bandas características de NPs de ZnO, ZnO-DMSO y ZnO-APTES

Enlace	Bandas características (cm⁻¹) ZnO	Bandas características (cm⁻¹) ZnO-APTES	Bandas características (cm⁻¹) ZnO- DMSO
O-H	3407	3472	3415
C=O	1585	1583	1562
Zn-O	547	572	567
N-H	---	3472	---
C-H	2931	2931	2925 y 2848
Si-O	---	1016	---
S=O	---	---	998

5.1.1.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La Figura 16 muestra la micrografía a 100,000 X obtenida mediante SEM, correspondiente a las NPs de ZnO sintetizadas por el método de precipitación química (lado derecho). En esta figura se aprecia claramente la morfología semiesférica que poseen las NPs de ZnO. Se logró realizar un análisis de la distribución de tamaño de partícula mediante la elaboración de un histograma, el cual se muestra en el lado izquierdo de la misma figura. Con la ayuda de un analizador de imágenes (imageJ) se llevó a cabo la medición de alrededor de 300 partículas, que presentaron un diámetro promedio alrededor 26 nm.

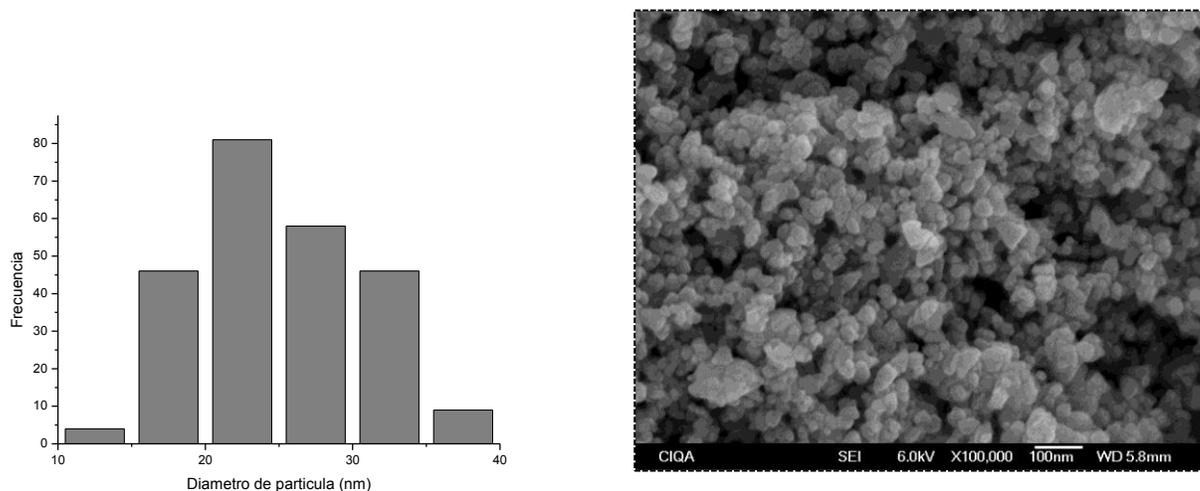


Figura 16. Distribución de tamaño de partícula (nm) del ZnO y micrografía obtenida mediante SEM.

En la Figura 17 se muestran las micrografías de las NPs sin y con modificación con DMSO (derecha) y APTES (izquierda) obtenidas por SEM. Mediante la medición de 300 partículas se obtuvo un promedio de diámetro de 28 nm y 39 nm para NPs de ZnO-DMSO y ZnO-APTES respectivamente. Aunque se observa solo ligeramente el recubrimiento, envolviendo racimos de NPs, el aumento del diámetro de estas indica que la modificación de las NPs se llevó a cabo exitosamente.

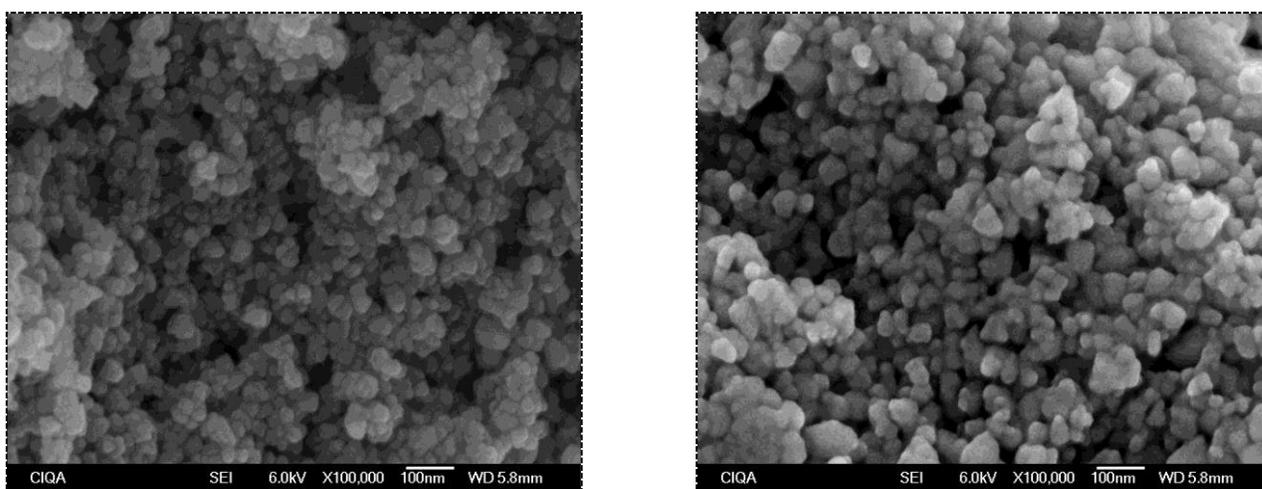


Figura 17. Micrografías de NPs de ZnO-APTES y DMSO

5.1.2. Actividad antimicrobiana de NPs de ZnO

5.1.2.1. Ensayo de sensibilidad. Método semicuantitativo de difusión en agar

En la Tabla 23 se muestran los resultados del análisis cualitativo de la prueba de difusión de disco en agar con los microorganismos *E. aerogenes*, *E. coli*, *K. Oxytoca*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *S. Pyogenes* para las NPs de ZnO sin y con modificación con DMSO y APTES con morfología semiesférica las cuales presentan diferente susceptibilidad bacteriana para cada uno de los microorganismos.

Tabla 23. Actividad antimicrobiana de las NPs de ZnO, ZnO APTES y ZnO DMSO en términos del diámetro de la zona de inhibición

Nanopartícula	Halo de inhibición (mm)					
	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. Pyogenes</i>
ZnO	4	4	7	0	16	6
ZnO APTES	9	7	12	0	12	6
ZnO DMSO	5	3	7	8	10	6

En la Tabla anterior se observan ciertas diferencias en los halos de inhibición debido a que las NPs sin y con modificación superficial podrían frenar la proliferación bacteriana dependiendo del microorganismo evaluado. Es evidente que las NPs modificadas con APTES mostraron una alta actividad microbicida para casi todos los microorganismos excepto para la *P. aeruginosa*, esto debido a que como es una bacteria gram negativa, estas presentan una pared celular gruesa compuesta por numerosas capas de peptidoglicano por lo que las partículas tienden a interactuar más fuertemente con las gram positivas afectando directamente la membrana externa de la bacteria induciendo a que esta se rompa e inhiba el crecimiento [106, 107]. Además de que las diferentes modificaciones que puedan tener las NPs de ZnO podrían frenar la proliferación celular. La actividad antibacteriana de las NPs puede ser debida al aumento de la relación superficie a volumen y por lo tanto estas tienden a tener una mayor capacidad de penetración [42]. También se observa que se obtuvieron halos de mayor diámetro para la bacteria *S. aureus*, para las NPs

de ZnO con y sin modificación, esto concuerda con lo reportado por diversos autores, [108, 109] los cuales obtuvieron mejores resultados contra bacterias gram positivas, cuando evaluaron diferentes NPs de ZnO, esto puede ser atribuido a las diferencias en la pared celular de las bacterias gram positivas, su fisiología celular, metabolismo o el grado de contacto [110]. Así mismo, en la Figura 18 se muestran las fotografías acerca de los resultados obtenidos en el ensayo antibacteriano de NPs de ZnO mediante difusión en agar frente a las diferentes bacterias.

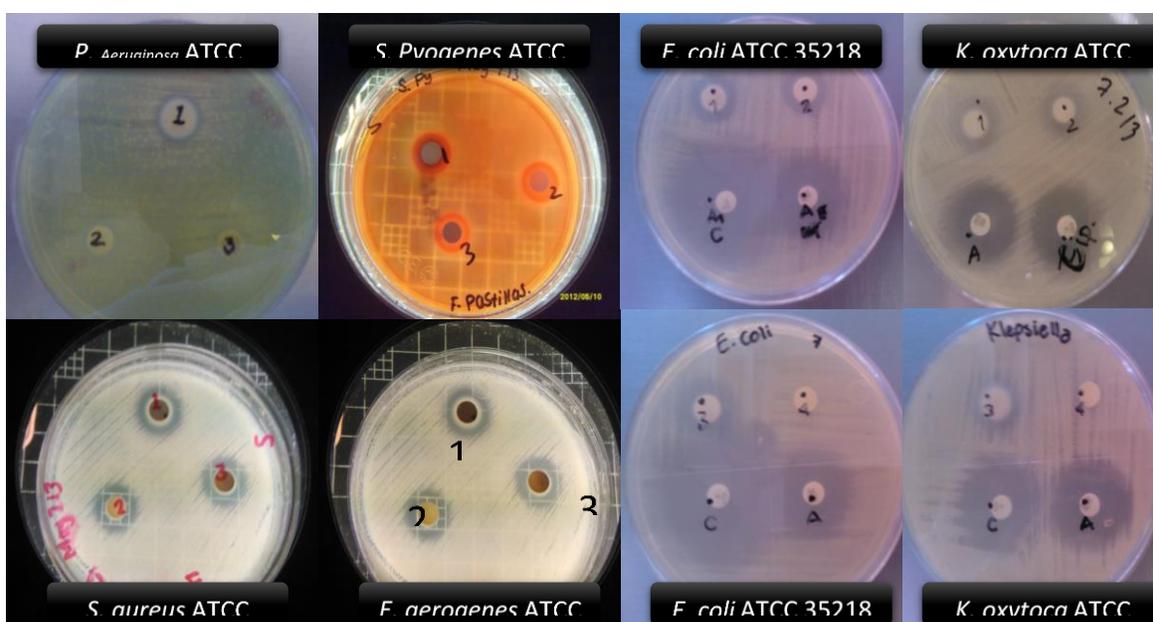


Figura 18. Análisis cualitativo antimicrobiano de NPs de ZnO mediante difusión en agar frente a diversos microorganismos

1) ZnO, 2) ZnO-DMSO, 3) ZnO-APTES, Ay C: controles positivos C= ciprofloxacino A= Amikacina

Las diferencias en el efecto antimicrobiano de las NPs de ZnO sin y con modificación son atribuidas a las diferencias en las vacantes de oxígeno con las propiedades cambiantes del ZnO. Un aumento en las vacantes de oxígeno hace que las NPs tiendan a ser cargadas positivamente y por lo tanto, aumentan las interacciones electrostáticas entre las NPs con

carga positiva y la superficie de la pared celular negativa. Para el caso de las NPs modificadas con APTES el efecto inhibitorio es debido a la presencia del enlace Si-O que proporciona una buena cobertura de la superficie de las NPs de ZnO debido a que actúa como una barrera energética y según Dutta y col [111], la modificación superficial con Si-O ayuda a la pasivación de la superficie, reduciendo el defecto de oxígeno y, por lo tanto, incrementa el efecto de inhibición de las NPs. La modificación superficial de las NPs provoca un aumento en la permeabilidad de la membrana y la internalización celular de estas NPs. Lo que produce que el nivel de las proteínas de las bacterias disminuya con la concentración de las NPs debido a que el ZnO es reactivo frente algunas proteínas.

Las NPs de ZnO tienen efecto bactericida por lo que causan una desorganización en la membrana del organismo gram positivo (*S. pyogenes* y *S. aureus*), generando un incremento en las moléculas de oxígeno activo lo que conduce a la muerte celular, estos resultados concuerdan con lo reportado por Mirhosseini y col. (2013) [112] también reportan mayor inhibición para bacterias gram positivas que para bacterias gram negativas. Las NPs se adhieren a la superficie de la membrana de la célula alterando la respiración ya que interactúan con las enzimas de las cadenas de respiración de las bacterias provocando que esta se inhiba, causando así la muerte del microorganismo [107].

5.1.2.2. Determinación de la CMI y CMB

En la Tabla 24 se presentan los valores de CMI y CMB registrados para la prueba de dilución en caldo que se realizó a las NPs de ZnO con y sin modificación contra 6 diferentes bacterias (a) *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, b) *Escherichia coli* ATCC 35218, c) *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724, d) *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27835, e) *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, f) *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615), en esta Tabla se comparan las diferencias entre cada uno de los microorganismos al momento ser expuestos a las NPs de ZnO, y se encontró que la actividad antimicrobiana de las NPs inorgánicas depende de diversos factores: en particular los factores endógenos de los microorganismos evaluados. Similarmente, el efecto antibacteriano entre las bacterias gram negativas y gram positivas frente a las NPs de ZnO, probablemente se deba, primeramente

a la naturaleza y diferencia entre la pared celular o las estructuras de las capas externas de las bacterias gram negativas y las bacterias gram positivas [73], de la naturaleza del ligando unido a las NPs, así como de la concentración de las mismas [102].

Tabla 24. CMI y CMB de Nps ZnO frente a diferentes bacterias

Agente antibacterial	CMI (CMB) $\mu\text{g/mL}$					
	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. Oxytoca</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. Pyogenes</i>
ZnO	200 (**)	400(**)	400 (3200)	* (**)	*** (**)	*** (100)
ZnO APTES	800(0.2)	1600 (**)	400 (1600)	* (**)	400 (**)	100(100)
ZnO DMSO	400(400)	800 (3200)	800 (800)	* (**)	400(**)	1600 (1600)

* No muestra inhibición a las concentraciones probadas

**No muestra actividad bactericida a las concentraciones probadas

***Muestra inhibición hasta 100 $\mu\text{g/mL}$

En la Tabla 24 se observa que existe una variabilidad en los resultados de CMI y CMB a las concentraciones 100 a 3200 $\mu\text{g/mL}$ de NPs dependiendo de la cepa bacteriana. En esta Tabla se aprecia también que las NPs presentan un efecto antibacteriano para ambas bacterias gram positivas y gram negativas, mostrando alta actividad antibacteriana para *E. coli*, *S. pyogenes*, *K. oxytoca* y *E. aerogenes* excepto para *P. aeruginosa*, todo esto debido a que los polvos depositados en el caldo podrían reaccionar mediante la liberación de algunos de los ingredientes presentes, mientras que la liberación en el agar se reduce. Esto sugiere que la distribución de los polvos antibacterianos en el caldo fue más homogénea debido al proceso de agitación que se lleva a cabo al momento de realizar la prueba. Motivo por el cual la prueba de dilución en caldo es altamente recomendada para determinar la susceptibilidad de los agentes inorgánicos insolubles [113]. Sin embargo para la bacteria *P.*

aeruginosa las NPs de ZnO sin modificar y modificadas no mostraron un efecto inhibitorio ni bactericida, lo que quiere decir que posiblemente se necesita mayor concentración de NPs para mostrar su efecto. A pesar de que no existió una inhibición del 100 % para *P. aeruginosa*, se ha demostrado que los iones Zn^+ al igual que los de Cu^{2+} y Ag^+ también son lo suficientemente pequeños para romper las membranas celulares de las bacterias con el fin de interrumpir la función enzimática. Es importante mencionar que los efectos indirectos a través de cambios en el entorno que rodea la carga también pueden influir en la eficacia de las NPs metálicas contra los microorganismos [104].

Según Fang [113] una teoría especula que una pequeña cantidad de iones de Zn^+ entran a la bacteria e inhiben el sistema respiratorio del microorganismo, el sistema de transporte de electrones y de enzimas, mientras que otra teoría menciona que los iones de zinc cambian el oxígeno o lo disuelven en agua para activarlo, con el fin de lograr un efecto bactericida.

En la Figura 19 se presenta el porcentaje de inhibición calculado para cada una de las bacterias evaluadas con las diferentes NPs de ZnO, en la cual se aprecia que al incrementar la concentración de NPs de ZnO, el porcentaje de inhibición también se incrementa. Como ya se ha descrito anteriormente, las NPs de ZnO sin modificar y modificadas superficialmente no lograron inhibir exitosamente el desarrollo de *P. aeruginosa*, sin embargo, se destaca que las NPs de ZnO modificadas con dimetil sulfóxido, lograron inhibir en 80.45%, esto debido a que se ha demostrado que el DMSO [114, 115], por si solo posee actividad bacteriostática frente a este microorganismo, lo que probablemente ejerza una actividad sinérgica entre estos dos compuestos, incrementando la actividad bacteriostática del agente.

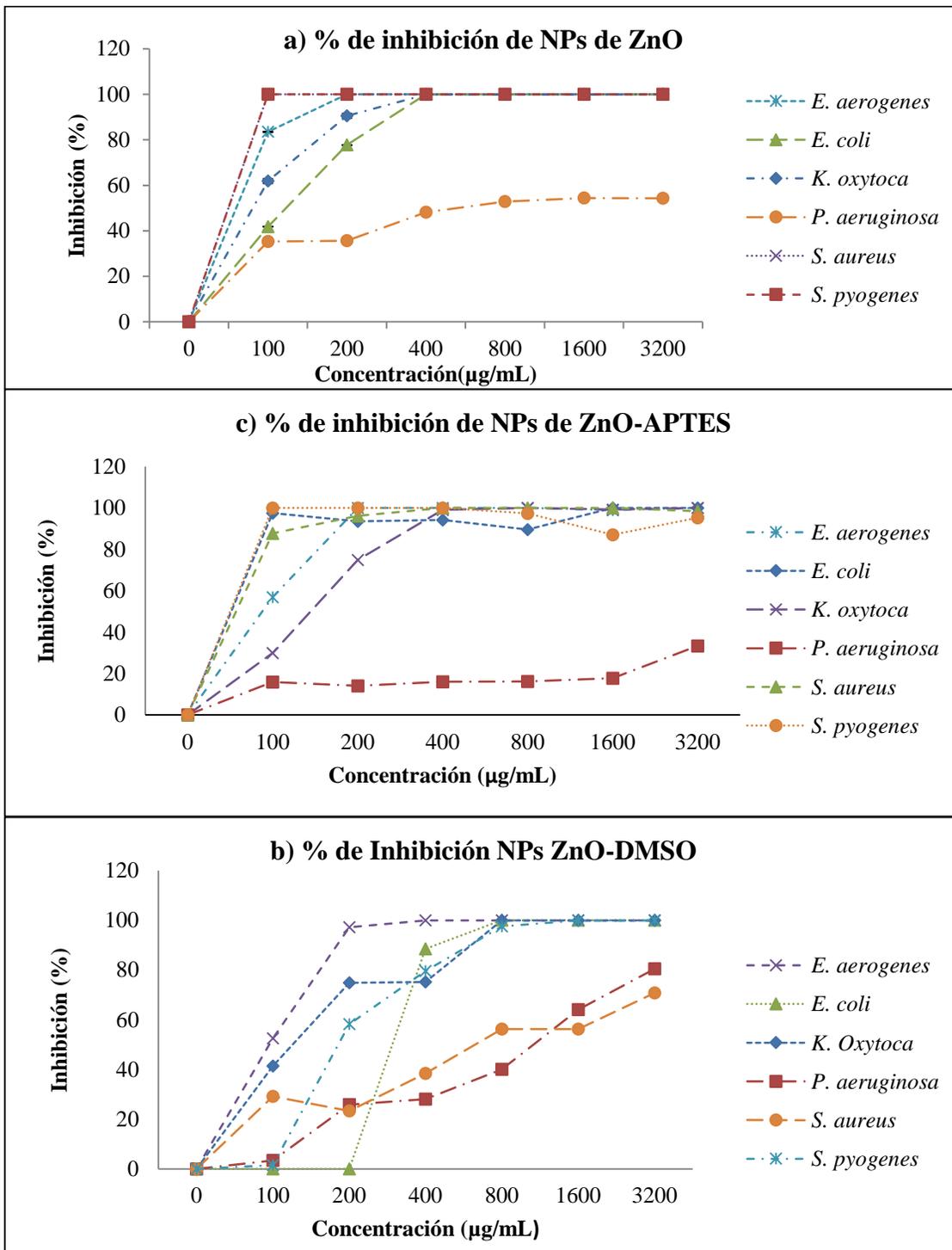


Figura 19. Porcentaje de inhibición de NPs ZnO, ZnO-DMSO, ZnO-APTES

La Figura 20 presenta la microplaca de ELISA de fondo en U, en la cual, se puede apreciar, el cultivo en medio líquido de *P. aeruginosa* cuando es sometida a diferentes concentraciones de NPs de ZnO, en presencia de medio de cultivo, Mueller-Hinton, *P. aeruginosa* adquiere un color verde fluorescente, ya que esta bacteria sintetiza un pigmento hidrosoluble llamado pioverdina [116], por lo tanto, como se observa a simple vista, existe crecimiento de esta bacteria en todos los pocillos, que se ha colocado el estímulo, por lo tanto, como ya se mencionó antes, las NPs de ZnO utilizadas en este estudio no lograron aniquilar esta bacteria.

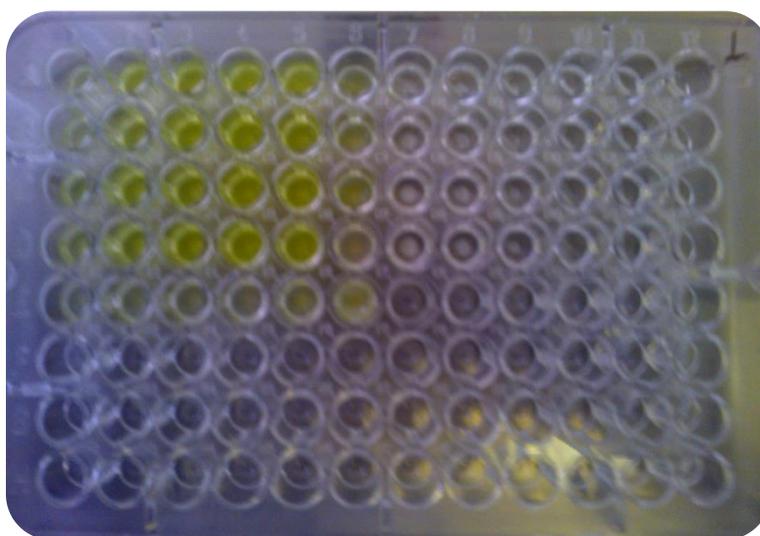


Figura 20. Cultivo de *P. aeruginosa* ATCC 27853 en microplaca fondo en U con diferentes concentraciones de NPs

5.1.3. Citotoxicidad de NPs de ZnO

5.1.3.1. MTT

La citotoxicidad de las NPs de ZnO ha sido ampliamente discutida, puesto que los resultados obtenidos sobre este tema no son muy concluyentes, y algunas veces suelen ser contradictorios de un autor a otro.

En este apartado se presentan los resultados obtenidos mediante la técnica colorimétrica MTT para las dos líneas celulares analizadas, frente a diferentes estímulos: NPs ZnO, ZnO-DMSO y ZnO-APTES.

◆ Línea celular HeLa

La Figura 21 muestra los resultados obtenidos para la línea celular HeLa, 24 horas después de la exposición a diferentes NPs de ZnO. Los resultados muestran, que al incrementar la concentración de NPs de ZnO, ZnO-DMSO y ZnO-APTES, la viabilidad celular se ve disminuida, por lo tanto las NPs de ZnO y sus derivados, son responsables de la muerte celular al ser expuestas a altas concentraciones de NPs. Sin embargo el comportamiento con diferentes NPs de ZnO, también es evidente.

En este ensayo se destaca, que para esta línea celular, las NPs de ZnO, sin modificación, resultaron ser las menos tóxicas, puesto que se obtiene un mayor porcentaje de viabilidad, a bajas concentraciones. Estos resultados son consistentes, con lo que se ha reportado anteriormente. Es bien sabido que el DMSO, por si solo posee efectos citotóxicos, se ha demostrado, que concentraciones de 0.1 a 0.25% pueden causar daño celular [117]. Las alteraciones ultraestructurales, ocasionadas por el DMSO pueden variar de célula a célula. Los cambios estructurales más frecuentes y menos severos, incluyen la acumulación de lípidos, incremento del número de lisosomas, dilatación y degranulación de la superficie rugosa del retículo endoplásmico, así como el hinchamiento de las mitocondrias y el daño a las membranas mitocondriales. Las lesiones celulares más severas causan un daño mas extensivo en las membranas celulares, cariorrexis, liberación total de las estructuras internas de la mitocondria y áreas de completa pérdida del hialoplasma [118].

Por otro lado, también se ha demostrado que la toxicidad relativa de las NPs modificadas con APTES puede ser debida a los grupos aminos en la superficie, esto debido a las interacciones electrostáticas entre las partículas cargadas positivamente y la membrana celular cargada de manera negativa [119]. Otro factor importante que influye en la citotoxicidad de las NPs, es el tamaño, ya que pueden interactuar fuertemente con la membrana plasmática cargada negativamente, y de ese modo inducir efectos toxicológicos.

En estos resultados se demostró que los efectos citotóxicos de las NPs de ZnO están altamente relacionados con la carga superficial de la nanopartícula [76].

Así, entonces, la toxicidad de las NPs de ZnO modificadas es mayor a bajas concentraciones, respecto a las NPs de ZnO sin modificar, ya que aunadas a la toxicidad que poseen por si solas, se suma a la toxicidad ejercida por los agentes modificantes. En general la toxicidad de las NPs de ZnO es debida a que estas inducen un incremento en los niveles de peróxido de hidrógeno y los radicales hidroxilo, disminuyen los niveles de oxígeno y glutatión [69].

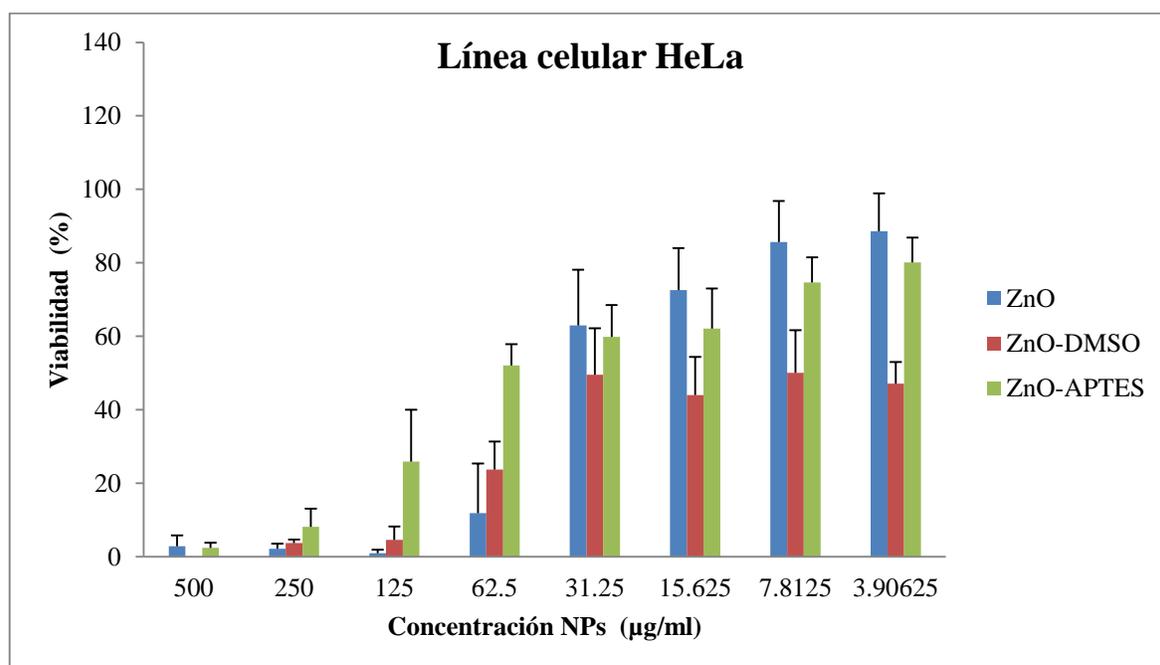


Figura 21. Citotoxicidad de diferentes NPs de ZnO en HeLa mediante MTT

Yufeng y col. (2009) al evaluar células HeLa, frente a concentración de 400 µg/mL de Nps ZnO de aprox. 20 nm, se observa una disminución de la viabilidad celular la cual corresponde a 14.91% [44]. Contrario a esto Wahab y col. (2011) muestran que a una concentración de 100 µg/mL de NPs de ZnO, la viabilidad celular disminuye hasta 40% [120]. Comparados con los resultados obtenidos en este ensayo, muestran resultados muy similares cuando son expuestos a 125 µg/mL, para las NPs de ZnO modificadas con

APTES. La citotoxicidad de las NPs de ZnO resulta ser mayor a la de las NPs de Ag, por ejemplo Miura y col. (2009) reportaron que a una concentración de 80 $\mu\text{g/mL}$ la viabilidad en células HeLa se observa considerablemente disminuida [121]. De igual manera Sukirtha y col. (2012) reportaron para las NPs de Ag una LD50 de 300 $\mu\text{g/mL}$ en células de esta misma línea [122]. Sin embargo, las NPs de ZnO resultan ser algunas ventajas en comparación a las NPs de Ag ya que poseen una potente actividad cicatrizante.

En la Figura 22 se presenta el ensayo de MTT en microplacas de cultivo de 96 pocillos. En la fotografía se puede apreciar que el color violeta es proporcional a la cantidad de células vivas en el pocillo.

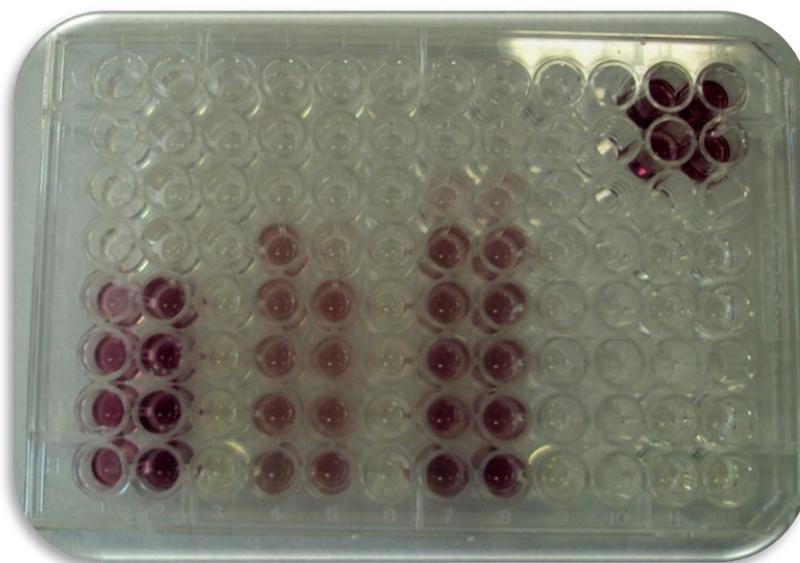


Figura 22. Ensayo de citotoxicidad de MMT

◆ Línea celular NCI

En la Figura 23 aprecian los resultados obtenidos para la línea celular NCI-H460 cuando se expone a diferentes concentraciones de NPs de ZnO con y sin modificación. En esta Figura, se puede observar que de igual manera que en el caso anterior, al incrementar la concentración del estímulo, la viabilidad celular disminuye. Concentraciones de 15.6

$\mu\text{g/mL}$, disminuyen la viabilidad celular. También en esta Figura se observa que en la línea celular HeLa, las NPs de ZnO resultaron ser las menos tóxicas, seguidas de el ZnO modificado con APTES y las NPs de ZnO modificadas con DMSO, pues a concentraciones tan pequeñas de $3.9 \mu\text{g/mL}$, la viabilidad celular alcanza apenas 84% aprox.

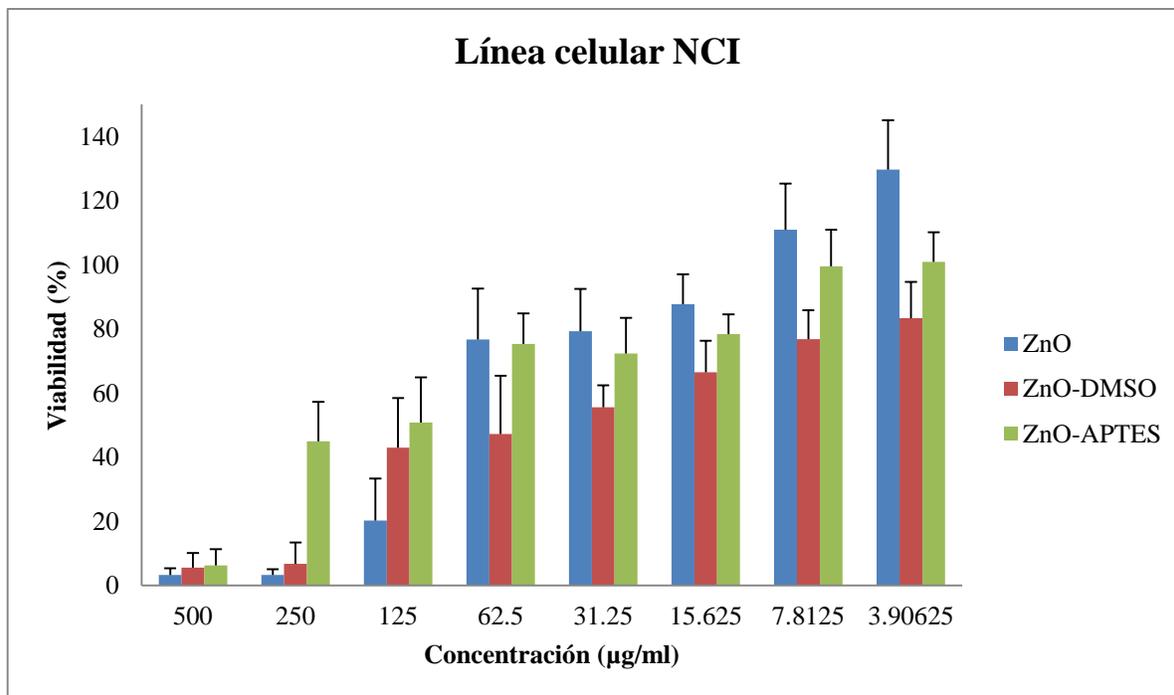


Figura 23. Viabilidad celular de NCI-H460 frente a diferentes NPs mediante MTT

Sin embargo, resulta interesante, que en el caso de las nps ZnO sin modificar a concentraciones pequeñas de 7.8 y $3.9 \mu\text{g/mL}$, se evidencia una mayor proliferación celular comparada con las células control utilizadas para el estudio. Esto puede ser explicado debido al rol que presenta el Zn en la proliferación y crecimiento celular. El Zn participa en la regulación de la proliferación celular en muchas rutas, es esencial para los sistemas enzimáticos que influyen en la división y proliferación celular, por ejemplo, la disminución del zinc en el medio extracelular trae como consecuencia el decremento en la actividad de la enzima deoxitimidina kinasa y por lo tanto se reducen los niveles de adenosina (5') tetrifosfato (5')-adenosina. Por lo tanto el zinc regula directamente la síntesis de DNA. El

zinc también puede influenciar la regulación hormonal de la división celular [123]. Entonces para esta línea celular, las NPs de ZnO, resultan ser tóxicas en grandes concentraciones de 500 a 125 $\mu\text{g/mL}$, mientras que al disminuir la concentración hasta 62.5 $\mu\text{g/mL}$, la toxicidad de estas NPs disminuye, incrementándose la toxicidad de las NPs modificadas con APTES y DMSO.

Es importante mencionar que la citotoxicidad de las NPs de ZnO, además de influir de una concentración a otra, también depende de una línea celular a otra, eso es debido a las diferencias morfológicas de cada célula.

5.1.3.2. xCELLIGENCE

En este ensayo en el que se mide la impedancia, solo se evaluó, la citotoxicidad en células NCI-H460, ya que estas células poseen un índice celular alto, siendo esto un requisito para la realización de este ensayo. En este ensayo, se muestran resultados obtenidos, a cerca de la citotoxicidad de nps ZnO, ZnO-DMSO y ZnO-APTES, las cuales se evaluaron concentraciones de 500, 250, 125, 62.5, 31.5, y 15.6 $\mu\text{g/mL}$ de NPs.

En la Figura 24 se aprecian las gráficas de viabilidad celular después de 92 horas de aplicado el estímulo. La gráfica a, que corresponde a las NPs de ZnO sin modificar, indica que a concentraciones de 62.5 $\mu\text{g/mL}$, la viabilidad celular disminuye, mientras que concentraciones de 31.5 $\mu\text{g/mL}$, 15.6 $\mu\text{g/mL}$ resultan inocuas para las células.

En cambio en la gráfica b, la cual corresponde al análisis de las Nps ZnO-DMSO, se muestra que a una concentración 125 $\mu\text{g/mL}$, existe una total muerte celular. Finalmente en la **gráfica c**, correspondiente a nps ZnO-APTES se muestra que de igual manera una concentración de 125 $\mu\text{g/mL}$, se muestra una disminución en la viabilidad celular.

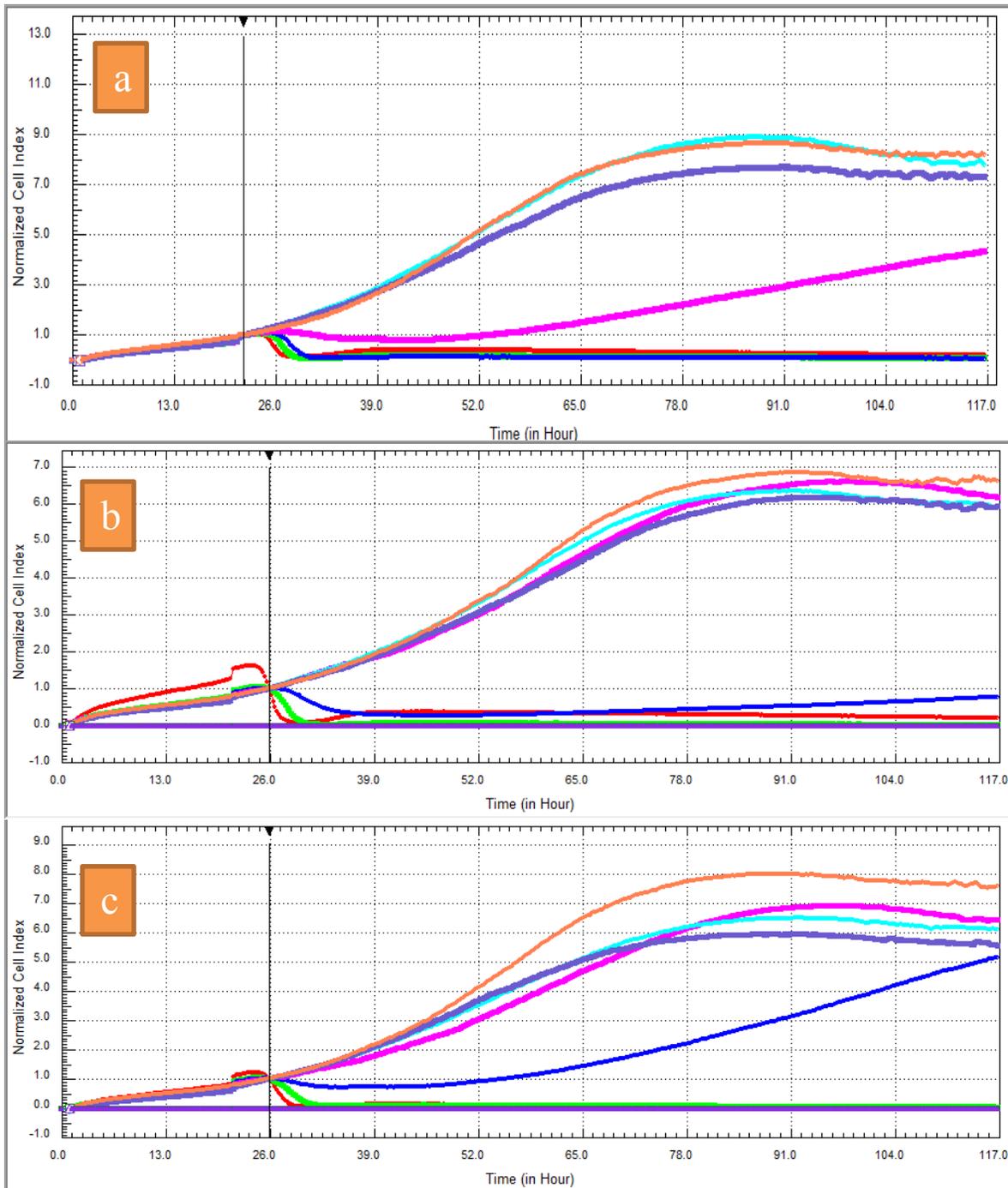


Figura 24. Resultados de viabilidad celular frente a diferentes NPs mediante
xCELLIGENCE

a) NPs de a (ZnO), b (ZnO-DMSO), c (ZnO-APTÉS)

Mediante un análisis en este programa también se determinó la dosis letal media para cada nanopartícula evaluada en este experimento. La dosis letal media de **55.6** $\mu\text{g/mL}$ para NPs ZnO, **86.2** $\mu\text{g/mL}$ para Nps ZnO-DMSO y Nps ZnO-APTÉS, **140.8** $\mu\text{g/mL}$. La dosis letal media obtenida para estas células es comparable con los resultados obtenidos mediante colorimetría.

De acuerdo a los resultados registrados en los estudios mediante colorimetría (MTT) y los resultados obtenidos con xCELLIGENCE, las NPs de ZnO resultaron ser las más tóxicas a concentraciones altas, seguidas de las NPs de ZnO modificadas con DMSO y por último las NPs de ZnO modificadas con APTÉS, mientras que a concentraciones bajas las NPs de ZnO resultaron ser beneficiosas para la proliferación celular.

Algunas de las diferencias entre los resultados obtenidos, entre los dos métodos de evaluación (MTT y Xcelligence) pueden deberse a la interferencia que presentan las NPs de ZnO debido a la capacidad de absorción y actividad óptica que éstas presentan [124].

5.1.3.3. Activación del complemento

El complemento es un importante regulador en ambos sistemas, inmunidad adaptativa e inmunidad inata. Este proceso puede inducir respuestas inflamatorias, con liberación de anafilo-toxinas, atracción de células inmunitarias a la zona de inoculación y posterior destrucción celular [125]. En la Figura 25 se presentan los resultados obtenidos acerca de la activación del complemento de las NPs de ZnO analizadas. Las NPs de ZnO, exhiben un comportamiento dosis-dependiente, es decir, que al incrementar la concentración de NPs, la activación del complemento también es mayor. Sin embargo, la capacidad de activación del complemento de las NPs a la concentración más alta para todos los casos fue menor al

control positivo. Estos resultados muestran la baja capacidad de las NPs para activar el complemento, por lo que el riesgo de reacciones adversas puede ser considerado como bajo, en este caso. Estos datos sugieren que el diseño de la química de superficie de NPs se puede utilizar para controlar la activación del complemento en biomateriales inmunoterapéuticos [126].

En este caso la activación del complemento no fue considerable comparada con otros estudios que han detectado que determinadas nanoestructuras como los liposomas [127], o NPs recubiertas de PEG [128], pueden llevar a una activación en la cascada del complemento.

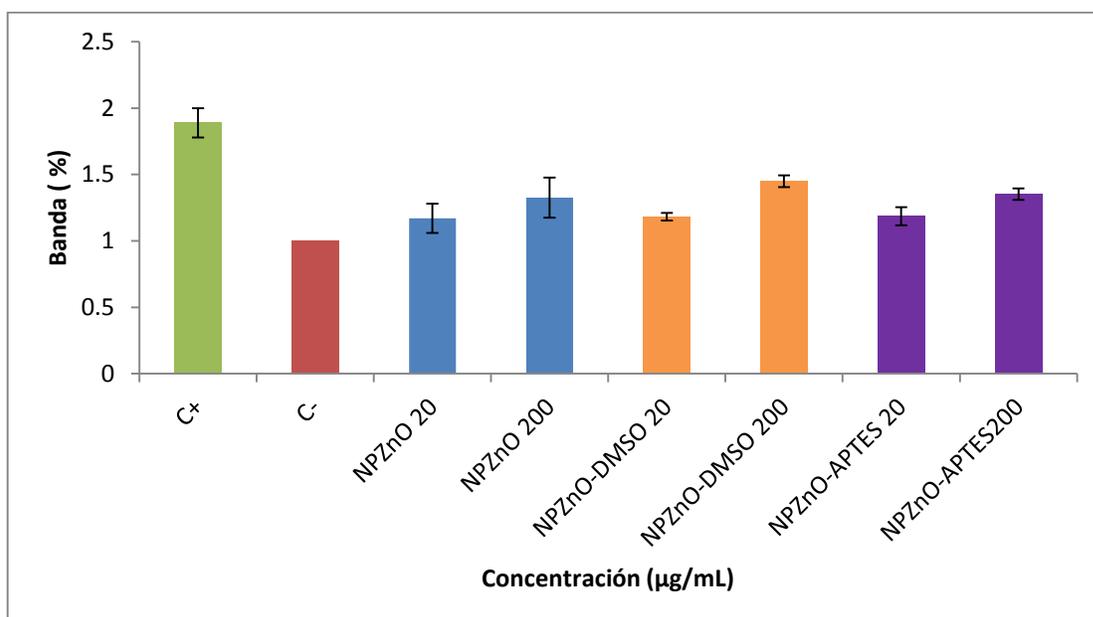


Figura 25. Medición de la activación del complemento de diferentes NPs de ZnO

En la Figura 26 se observa el western blot de las NPs analizadas, en la Figura se puede apreciar los fragmentos de C3, los cuales son utilizados para medir la capacidad de activación del complemento por alguna de las 3 vías: vía clásica, vía alterna y vía de las lectinas.

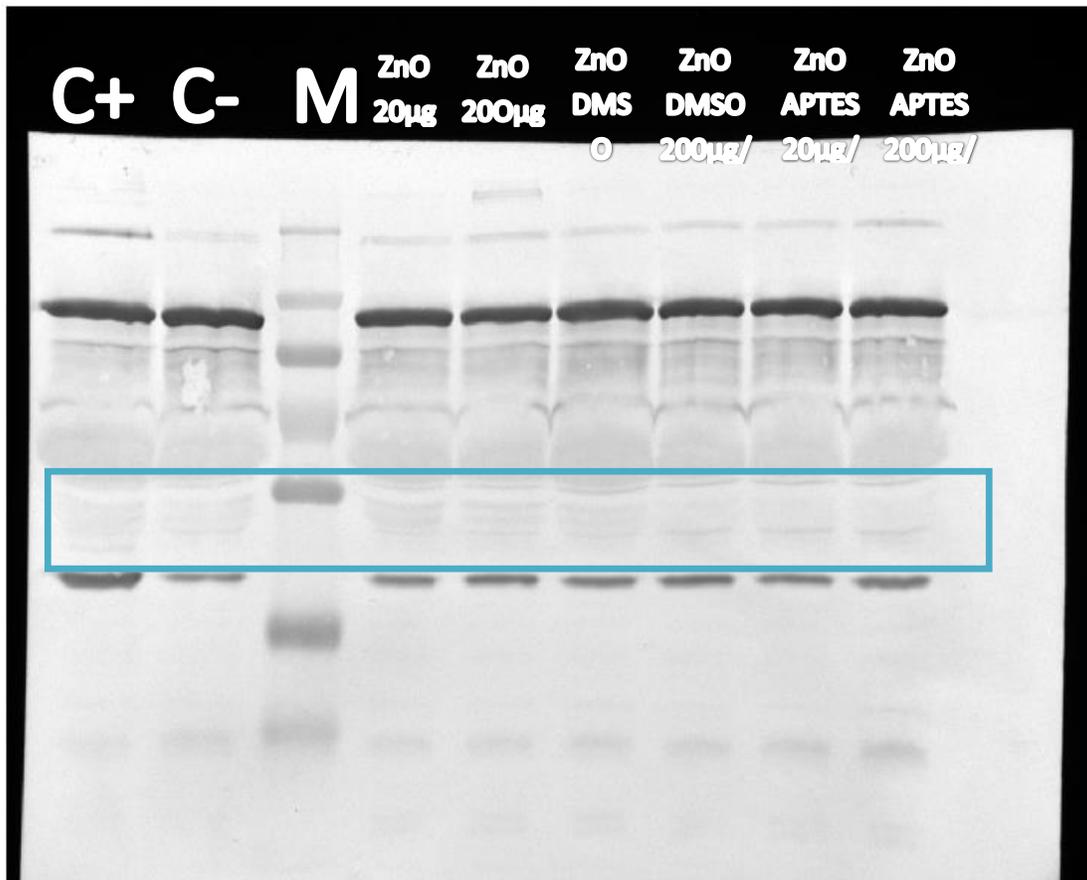


Figura 26. Western blot de NPs de ZnO para la determinación de activación de complemento

C+: Control positivo, C-: Control negativo, M: Marcador de peso molecular

5.1.3.4. Medición de citocinas proinflamatorias

Una importante tarea de la nanobiotecnología es el entendimiento del efecto que tienen estos materiales para modular la expresión de citocinas, las cuales son proteínas biológicas mensajeras que regulan el sistema inmune. Estudios publicados han demostrado que la habilidad de ciertos materiales para inducir la producción de citocinas, depende de una gran variedad de factores, incluyendo la composición del material, el tamaño y el mecanismo de liberación. Sin embargo aun hay muchas incógnitas con lo referente a las NPs de ZnO [129, 130].

En esta ocasión se evaluó la producción de las citocinas proinflamatorias IFN- γ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-1b y TNF- α . Estas citocinas particulares se eligieron porque representan las vías críticas implicadas en la respuesta inflamatoria y los procesos de diferenciación [131].

Los resultados (Figura 27) obtenidos para la NPs analizadas (NPs ZnO, Nps ZnO-DMSO y ZnO-APTES), indican que estas inducen la producción de citocinas proinflamatorias, excepto INF- γ e IL-10. Otros estudios también señalan que las NPs de ZnO son capaces de inducir una gran cantidad de citocinas proinflamatorias incluyendo TNF- α , IFN- γ and IL-12, in vitro e in vivo[132], sin embargo este no fue el caso.

Además los resultados también exponen que la producción de citocinas es dosis-dependiente, ya que a la concentración más alta la cual corresponde a 100 $\mu\text{g/mL}$, la concentración de citocinas es mayor que cuando se expone a una concentración más baja (10 $\mu\text{g/mL}$) de NPs. Los estudios también revelan que las NPs tienen un mayor potencial para desencadenar la producción de citocinas debido a que su tamaño pequeño ayuda a evadir la respuesta de los macrófagos [133].

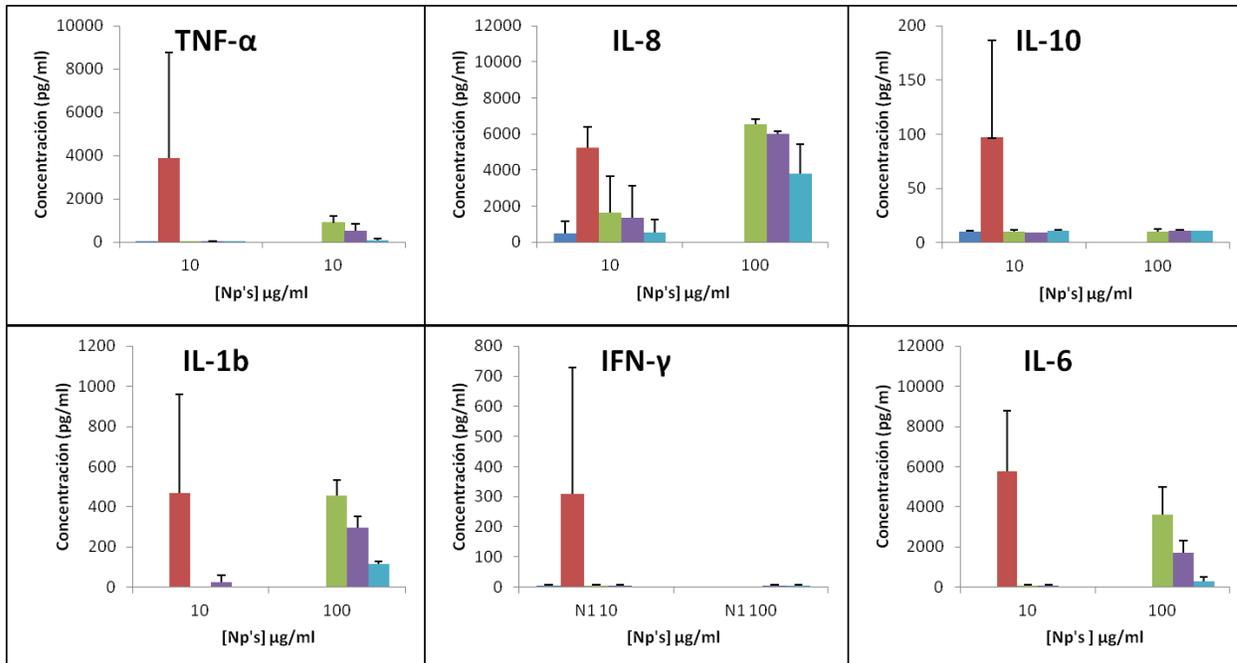


Figura 27. Producción de citocinas en donantes, después de ser estimulados con NPs de ZnO.

Los resultados también indican que las NPs de ZnO sin modificar inducen una mayor producción de citocinas proinflamatorias para todos los casos. La IL-8, resultó ser la interleucina que se produce en mayor cantidad por los mononucleares, cuando son expuestos a diferentes concentraciones de NPs. La IL-8, es una citocina, relacionada con los procesos infecciosos agudos y con la activación de células de la inflamación, ya que juega un papel importante en la inflamación mediada por neutrófilos [134].

La producción de IL-8 en este caso, fue 6000 picogramos/mililitro (pg/mL) cuando se tiene una concentración de 100 µg/mL de NPs de ZnO sin modificar, mientras que Monteiro-Rivere y col. (2005) [135] reportan un máximo de 1300 pg/mL de IL-8 cuando las células son expuestas a MWCNT a una concentración de 400µg/mL.

Esto demuestra que las NPs de ZnO son capaces de internalizarse en las células, así como inducen un efecto biológico manifestado por el incremento de IL-8, aunque, el mecanismo de penetración y los efectos no han sido completamente elucidados [135], sin embargo se sugiere que la superficie aumenta a medida que el tamaño de partícula se hace más pequeño, por lo tanto una dependencia de la dosis en el área de superficie puede explicar la mayor toxicidad de las NPs. El mecanismo sugerido de área de superficie para las NPs poco solubles que inducen la inflamación, es la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), que conduce al estrés oxidativo en las células. Se ha visto que las NPs inducen daño oxidativo tanto *in vivo*, como *in vitro* [136].

Entonces, la habilidad de las NPs de ZnO para inducir las citocinas proinflamatorias a concentraciones por debajo la dosis que causa muerte celular sugiere que, cuando son aplicadas a concentraciones adecuadas, podrían tener efectos positivos en el organismo, por ejemplo, la estimulación de TNF- α (factor de necrosis tumoral), el cual posee una potente actividad antitumoral, por lo tanto a concentraciones adecuadas podría combatir esta enfermedad [132].

En conjunto, estos resultados subrayan la necesidad de una evaluación cuidadosa de los efectos de las NPs de ZnO a través de una variedad de tipos de células relevantes al considerar su uso para nuevas aplicaciones potenciales biológicas basados en la nanotecnología [131].

5.2. Nanocompuestos PSA-ZnO con y sin modificación

5.2.1. Caracterización

5.2.1.1. Resonancia Magnética Nuclear de protón (RMNH¹)

Se llevó a cabo la caracterización mediante resonancia magnética nuclear de protón, para asegurarse que se trataba del terpolímero PSA acrílico, poli (2-EHA/MMA/AA). La Figura 28 describe el espectro de RMNH¹, el cual corresponde al PSA sin NPs. En esta figura se muestran las señales características de cada una de las unidades monoméricas del polímero. En el caso de 2-EHA, el pico corresponde a los protones del grupo OCH₂, mientras que en el caso del MMA, estos corresponden a los protones del grupo OCH₃. Las señales correspondientes al grupo carboximetilo del MMA se dividen en dos señales, correspondientes a 3.58 y 3.64 ppm, la señal en 3.58 ppm puede ser asignada a las secuencias homopoliméricas de PMMA, mientras que la señal de aproximadamente 3.64 ppm, corresponde a las unidades MMA vinculadas a unidades 2-EHA en secuencias copoliméricas. El mismo comportamiento se observa en la señal de 2-EHA, dividida en dos pequeñas señales en 3.94 y 3.91 ppm, donde la primer señal corresponde a segmentos de copolímeros, mientras que la segunda corresponde a segmentos de homopolímeros [15]. Las asignaciones de los demás protones se muestran a detalle en la ilustración.

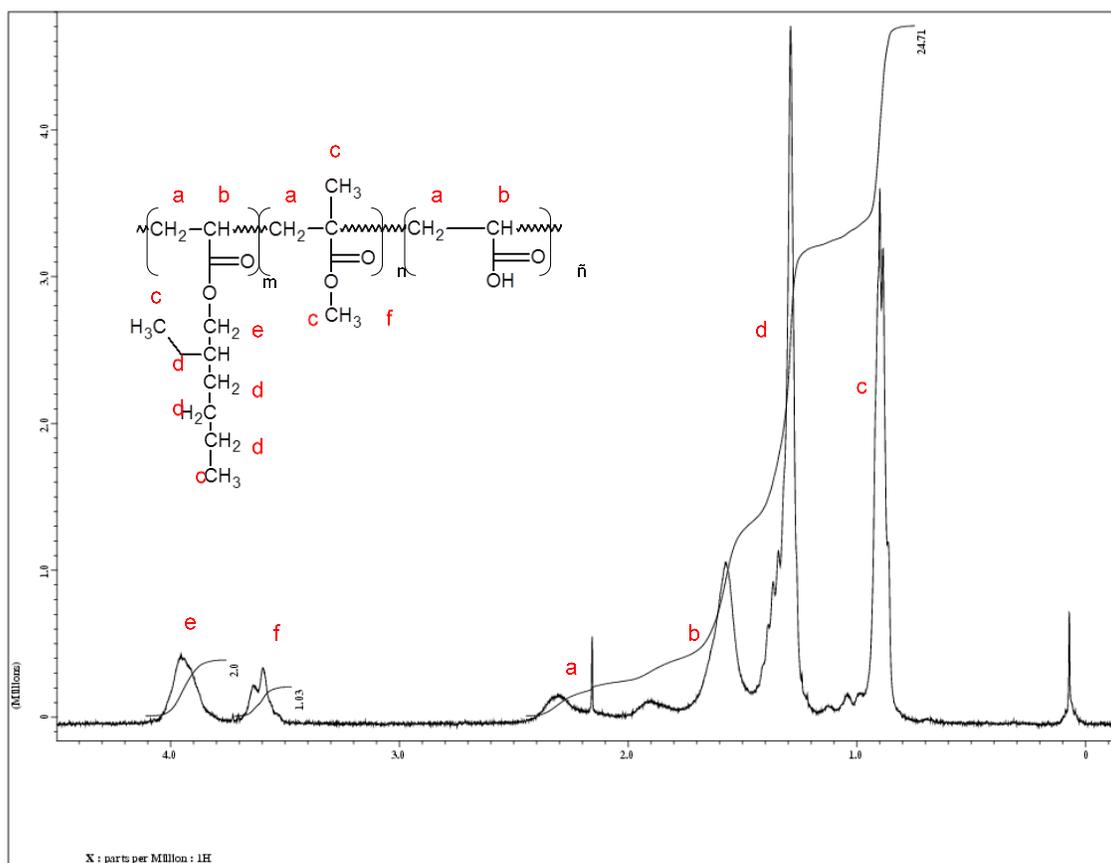


Figura 28. Espectro RMN H¹ de PSA

Por medio de esta técnica se determinó la composición de los adhesivos PSA 0.1%, PSA-ZnO 0.3%, PSA-ZnO-DMSO 0.3% y PSA-ZnO-APTES 0.3%. En la Tabla 25 se muestran los resultados obtenidos. Desafortunadamente debido a la baja concentración de ácido acrílico, no se pudo obtener la composición de este, por lo que en la tabla solo se presenta una relación en peso de los monómeros 2-EHA/MMA.

Tabla 25. Relación en % de peso (2-EHA/MMA) de copolímeros PSA-NPs ZnO con y sin modificación superficial

Nanocompuesto	Relación % peso	
	2-EHA (Acrilato de 2-etilhexilo)	MMA (Metil metacrilato)
PSA	84.8%	15.2%
PSA-ZnO 0.3%	83.3%	16.6%
PSA-ZnO-DMSO 0.3%	80%	20%
PSA-ZnO-APTÉS 0.3%	72.7%	27.2%

En esta Tabla se puede apreciar que la relación en peso de los diferentes copolímeros, varía cuando se incorporan las NPs de ZnO, esto indica que las NPs tienen un efecto en la composición final de los copolímeros. Se observa que al incorporar NPs la relación en peso de 2-EHA, es menor, en comparación al PSA sin NPs. Esto podría deberse a la interacción que tienen los agentes de modificación con los monómeros, debido a que se observa una disminución en relación en peso considerable de 2-EHA, cuando las NPs son modificadas con APTÉS y DMSO.

5.2.1.2. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

En la Figura 29, se aprecian las micrografías de los nanocompuestos, obtenidas mediante TEM, en el apartado a se observan las gotas de látex PSA sin NPs. En esta imagen se observa que la distribución de tamaño no es homogénea. Mientras que en la figura b presenta el PSA/ZnO-APTÉS 0.3%; en esta micrografía se muestran las gotas de látex del terpolímero acrílico, y se aprecia que las NPs ZnO-APTÉS, se encuentran rodeando la gota, lo que demuestra que las NPs no fueron encapsuladas. Esta morfología es consistente con la reportada por Chen y col, cuando utilizaron AIBN como iniciador en la preparación de nanocompuestos PS/ZnO, como se mostró en la Figura 5, anteriormente mencionada [91]. Sin embargo no se observan grandes aglomerados de NPs lo cual destaca que la dispersión de estas en el látex se llevó a cabo de manera adecuada.

En la figura c se muestra el nanocompuesto PSA-ZnO 0.3% en peso a 3000x ampliificaciones. En esta imagen se puede apreciar, como las NPs se encuentran en la periferia de las gotas de látex, sin embargo en mayor parte se encuentran encapsuladas en la matriz polimérica. La morfología concuerda con reportado con Chen y col. (2008), cuando se utiliza persulfato de potasio como iniciador, en este caso se utilizó, persulfato de amonio, sin embargo pertenecen al mismo grupo de iniciadores [96].

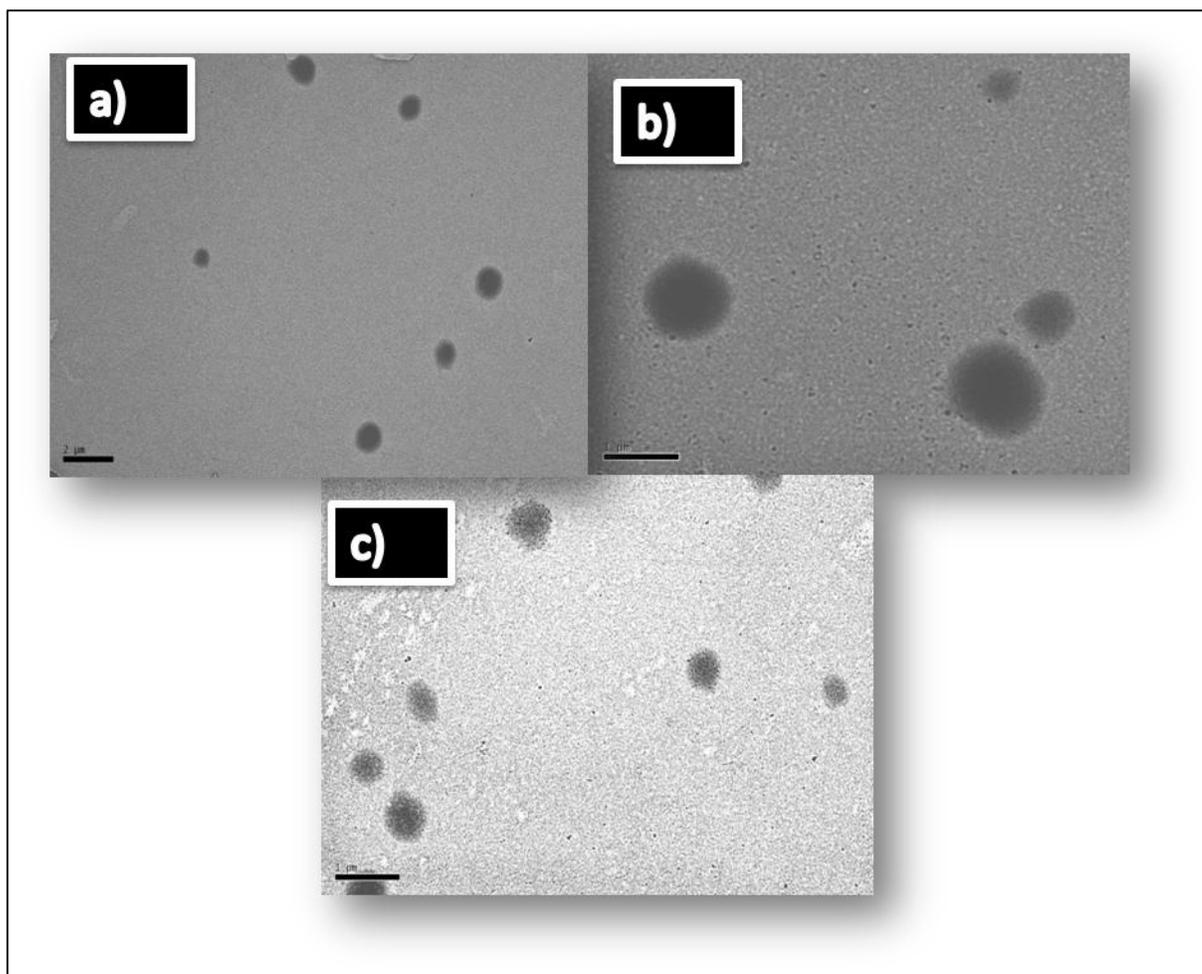


Figura 29. Micrografías obtenidas por TEM de nanocompuestos PSA-ZnO

5.2.1.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se determinó la temperatura de transición vítrea para el copolímero adhesivo (PSA) y para los nanocompuestos obtenidos. En la Figura 30 se muestran los resultados obtenidos para los adhesivos sensibles a la presión en los cuales tienen incorporados en sus cadenas NPs de ZnO modificadas y sin modificar, comparados con el PSA sin NPs. Los resultados muestran una Tg de -59.35°C para PSA, -50.29°C cuando se incorpora 0.1 % en peso de NPs de ZnO a las cadenas de la matriz polimérica, -47.9°C cuando se incorpora 0.2% de NPs de ZnO en peso y -50.71°C cuando el contenido de NPs de NPs de ZnO es de 0.3% en peso. Como se indica, la Tg aumenta, cuando se incorporan NPs de ZnO al terpolímero acrílico, y aunque se esperaría que la Tg aumentara de la misma forma en la que se incrementa la concentración de NPs, en este caso no fue así. Tal vez esto sea debido a la dispersión de las NPs de ZnO en la matriz polimérica.

De igual manera, la Figura 30 muestra las temperaturas de transición vítrea para los nanocompuestos con NPs de ZnO-DMSO, en las cuales se puede apreciar, que también al incorporar estas NPs al polímero la Tg, se incrementa, a comparación del adhesivo sin NPs. La Tg para el nanocompuesto PSA/ZnO-DMSO 0.1% en peso, corresponde a -51.9°C , mientras que para PSA/ZnO-DMSO 0.3% fue de -48.3°C . La Tg para el nanocompuesto PSA/ZnO-DMSO 0.3%, no se observa claramente, solamente las transiciones secundarias correspondientes a 2-EHA.

También en esta Figura se muestran los resultados de DSC obtenidos para los nanocompuestos PSA que incorporaron NPs de ZnO-APTES. Igualmente que en los casos anteriores la Tg se incrementa en comparación del adhesivo sin NPs. Cuando se incorpora 0.1 % de NPs la Tg se muestra en -49.25°C , mientras que cuando se incorpora 0.2%, la Tg se incrementa -49.51°C y finalmente cuando se incorpora 0.3% de NPs la Tg puede observarse en -48.73°C .

En los termogramas también se aprecian relajaciones de alrededor de -70°C , estas corresponden a transiciones de segmentos de 2-EHA, esto indica una composición heterogénea de los copolímeros. Aunque se esperaría que el copolímero tuviera una composición homogénea, ya que se copolimerizó en batch, la diferente reactividad de los

monómeros y la velocidad de difusión, hace posible que se formen partículas encapsuladas [15]. Las transiciones secundarias en aproximadamente $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, las cuales corresponden a los microdominios de 2-EHA, probablemente sean los centros de la partícula de polímero mientras que la segunda porción pertenezca probablemente a la capa externa de la partícula de polímero [13, 15].

Estudios revelan que el incremento de la Tg al incorporar NPs a una matriz polimérica es debido a que la movilidad de las cadenas poliméricas se encuentra restringida [89], sin embargo, en este caso, la cantidad de NPs incorporadas al terpolímero acrílico, es muy pequeña, por lo que estos resultados apuntan a que la composición del copolímero seguramente afecta a la Tg, y por ende, la microestructura de los copolímeros es diferente cuando se añaden NPs

Estos resultados son muy interesantes debido a la Tg es la principal propiedad que determina la adhesión de estos polímeros, un pequeño incremento en la Tg puede mejorar las propiedades de Tack y adhesión [137], además de que esto nos indica que las NPs de ZnO tiene una alta estabilidad térmica, ya que retrasa la transmisión rápida de calor y lo que puede limitar la descomposición del nanocompuesto [138].

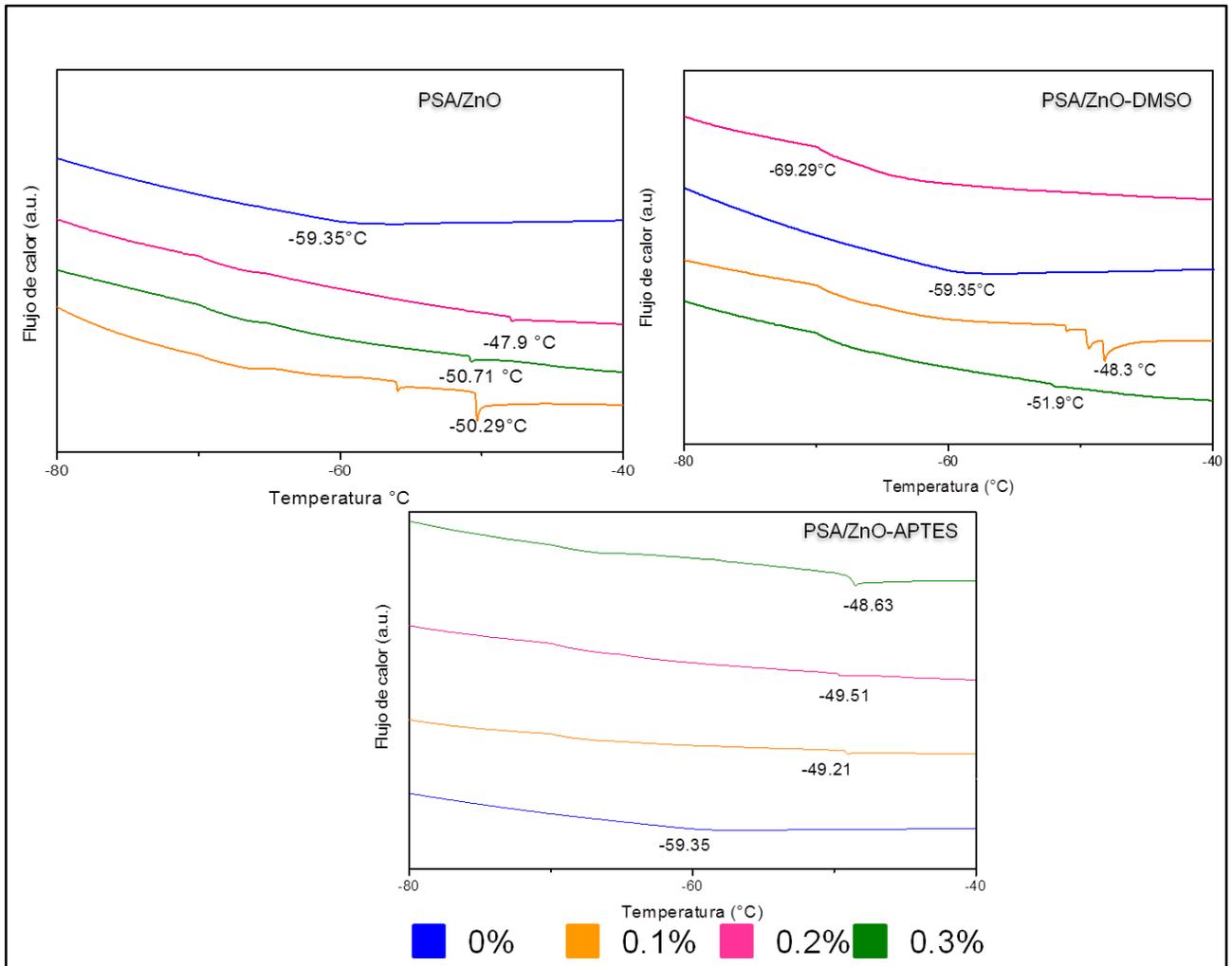


Figura 30. Tg de nanocompuestos PSA-ZnO, ZnO-DMSO, ZnO-APTES

5.2.1.4. Conversión por gravimetría

En la Tabla 26 se muestra la conversión total, llevada al cabo de una hora de polimerización. Los resultados muestran, que al incrementar el contenido de partículas nanométricas, la conversión también disminuye. Sin embargo, cabe destacar que se obtuvo una mayor conversión para los nanocompuestos PSA/ZnO-DMSO.

Tabla 26. Por ciento de conversión del PSA acrílico-Nps ZnO

Nanocompuesto	ZnO por ciento en peso (%)	Conversión total
PSA/ZnO	0.1	98.4853
	0.2	73.8052
	0.3	72.1706
PSA/ZnO-DMSO	0.1	94.5261
	0.2	89.9990
	0.3	50.6959
PSA/ZnO-APTES	0.1	77.7807
	0.2	50.3410
	0.3	52.2286

En la Figura 31 se muestra, la conversión a diferentes tiempos de transcurrida la polimerización, se puede observar, como la conversión se incrementa, a la vez que ha transcurrido el tiempo de la polimerización. En el apartado a se muestra el porcentaje de conversión de los nanocompuestos PSA, a los cuales se les incorporó 0.1, 0.2 y 0.3% en peso de NPs de ZnO, la conversión total fue de 98.48, 73.80 y 72.17 % respectivamente. De igual manera, en el apartado b de la Figura 31, se muestra el por ciento de conversión frente al tiempo, de los nanocompuestos PSA/ZnO-DMSO. En el apartado c se muestra el porcentaje de conversión para los nanocompuestos PSA/ZnO-APTES. También en este caso, el contenido de NPs disminuye la conversión cuando es comparado con el PSA sin

NPs. La conversión para el PSA-DMSO 0.1 % en peso fue de 77.78%, cuando se incorporan 0.2% en peso de estas NPs la conversión disminuye hasta 50.34%, mientras que cuando se añaden 0.3% en peso la conversión es de 52.22%, los resultados obtenidos en este caso, muestra una conversión inferior a las obtenidas cuando se incorporan NPs de ZnO y ZnO-DMSO en esta misma concentración. De manera general, de acuerdo con los resultados obtenidos para todas las muestras, se observa que al incrementarse el contenido de NPs de ZnO modificadas y sin modificar, la conversión total se disminuye.

En la literatura no han encontrado reportes a cerca de la incorporación de NPs de ZnO a adhesivos sensibles a la presión. Sin embargo, Qi y col. (2006) reportan un comportamiento similar sobre la conversión, cuando el porcentaje en peso de NPs de sílica se incrementa en copolímeros de MMA/BA preparados por polimerización en miniemulsión [139]. De igual manera Tong y col. (2006) también reportaron que al incrementar el contenido de arcillas en nanocompuestos PS-Saponita la velocidad de polimerización y el porcentaje de conversión también disminuyen. En general se ha reportado que la adición de partículas inorgánicas como SiO₂, TiO₂, CaCO₃ y Ag, reducen la conversión de monómero y la velocidad de reacción. Se sugiere que la reactividad de los radicales y las cadenas en crecimiento es menor en la presencia de partículas inorgánicas debido a la adsorción de estas especies activas en la superficie de las partículas inorgánicas. También se ha encontrado que el tamaño de partícula promedio y polidispersidad de los productos finales aumenta ligeramente tras la adición partículas inorgánicas [140].

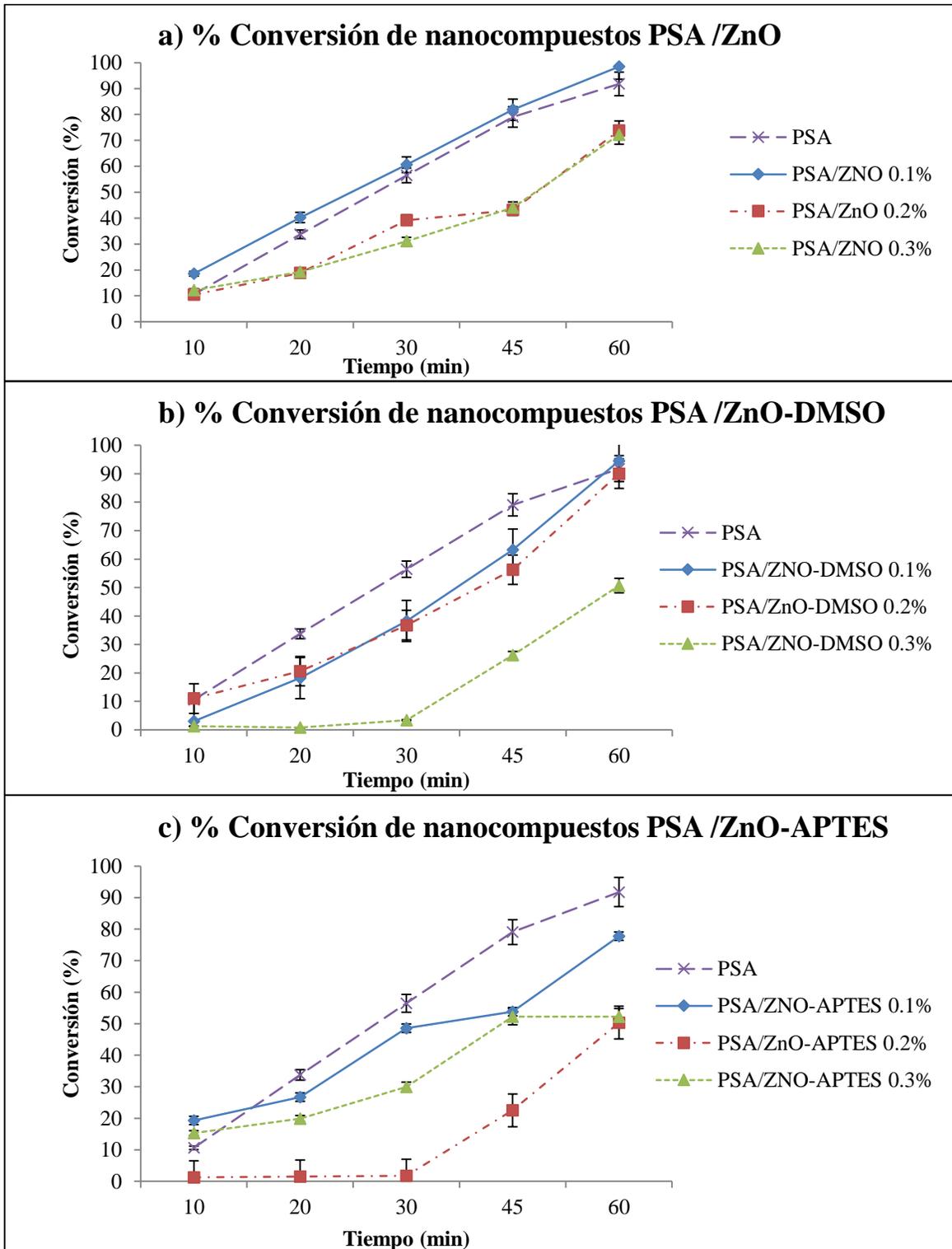


Figura 31. Por ciento de conversión de nanocompuestos PSA/ZnO

5.2.2. Actividad antimicrobiana. Método de difusión en agar

La incorporación de NPs de ZnO modificadas y sin modificar pretende proporcionar actividad antimicrobiana a los PSA. La Tabla 27 muestra los resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana de los nanocompuestos obtenidos mediante el método cualitativo de difusión en agar. Los resultados muestran que al incrementar la concentración de NPs en los nanocompuestos preparados, el tamaño del halo de inhibición también se incrementa. Sin embargo, para el caso de todos los nanocompuestos, a las concentraciones probadas, solo se obtuvo inhibición para los microorganismos gram positivos. Para *S. aureus*, en nanocompuestos PSA con 0.1, 0.2 y 0.3 % de Nps ZnO, los halos de inhibición obtenidos fueron de 1, 1 y 2 mm respectivamente, mientras que para PSA 0.1, 0.2 y 0.3 % de ZnO-DMSO los halos corresponden a 2, 4.5 y 12 mm y finalmente para PSA's 0.1, 0.2 y 0.3 % de Nps ZnO-APTES, los halos tienen un diámetro de 1, 2 y 3 mm, al igual que para el primer caso. Jones y col. afirman que las NPs de ZnO, presentan mayor actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, que NPs de otros óxidos. [108, 141]. Para *S. pyogenes* la respuesta antimicrobiana fue mucho menor, para los nanocompuestos PSA-ZnO, solo se obtuvo un halo de inhibición a la concentración de 0.3% de solo 1 mm, de igual manera sucedió para PSA-APTES en la que los halos de inhibición fueron para 0.2 y 0.3% de 1 mm cada uno. Los halos de mayor tamaño se obtuvieron para los nanocompuestos PSA-ZNO-DMSO, para 0.1, 0.2 y 0.3%, se obtuvieron halos de 1, 1 y 2 mm.

Estos resultados pueden ser debidos, a que las nps ZnO-DMSO presentan mayor compatibilidad con la matriz polimérica, y la dispersión de las NPs en este caso es mayor. Además que el DMSO por si solo posee actividad bacteriostática, como ya se había mencionado anteriormente.

Por otro lado, los resultados de citotoxicidad mediante el método colorimétrico MTT, señalan, que las NPs ZnO-DMSO resultan también ser las más tóxicas a concentraciones pequeñas para las células HeLa y NCI, lo que demuestra que estas NPs no tienen selectividad entre organismos eucariotas (células humanas) y procariotas (bacterias). Sin

embargo, las concentraciones que resultaron efectivas frente a bacterias gram positivas, son muy pequeñas frente lo que han reportado por diversos autores.

Por ejemplo, Ma y col. (2008) reportan que se requiere al incorporar 2% de NPs de ZnO en una matriz de poliuretano, para que exista una inhibición en la supervivencia bacteriana, cuando es evaluado frente a *E. coli*, y que se requiere de 4% de NPs frente a *S.aureus*. De igual manera, Ma y col. (2009) incorporaron diferentes concentraciones de NPs de ZnO 0.5, 1, 3, y 5 % a fibras de poliamida 6 y polipropileno, obteniendo mayor inhibición a concentraciones más altas de NPs [142].

Entonces, el uso de PSA podría proporcionar una liberación controlada del principio activo en este caso de las NPs de ZnO que son capaces de difundirse de forma iónica Zn^{+2} , en el medio. Por lo que sería necesaria la evaluación y cuantificación del ion zinc, capaz de difundirse, así como evaluar la citotoxicidad del parche adhesivo incorporando las NPs para poder un resultado definitivo a cerca de la toxicidad de estos materiales en conjunto.

Tabla 27. Halos de inhibición de PSA-Nps ZnO frente a diferentes microorganismos

Nanocompuesto		<i>E. aerogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. Oxytoca</i>	<i>E. coli</i>
		Promedio de halo de inhibición (mm)					
PSA/ZnO	0.1%	0	1	0	0	0	0
	0.2%	0	2	0	0	0	0
	0.3%	0	2	1	0	0	0
PSA/ZnO - DMSO	0.1%	0	2	1	0	0	0
	0.2%	0	4.5	1	0	0	0
	0.3%	0	12	2	0	0	0
PSA/ZnO- APTES	0.1%	0	1	0	0	0	0
	0.2%	0	2	1	0	0	0
	0.3%	0	2	1	0	0	0

La Figura 32 muestra el ensayo de difusión en agar, en el apartado a, se observan los diferentes nanocompuestos frente a *S. aureus*, mientras que en el apartado b y c, se muestran los diferentes nanocompuestos cuando son expuestos a *S. pyogenes*. El apartado c, muestra una ampliación de los halos de inhibición vistos en un estereoscopio, ya que al ser halos de 1mm, solo se pueden apreciar claramente a través de este equipo.

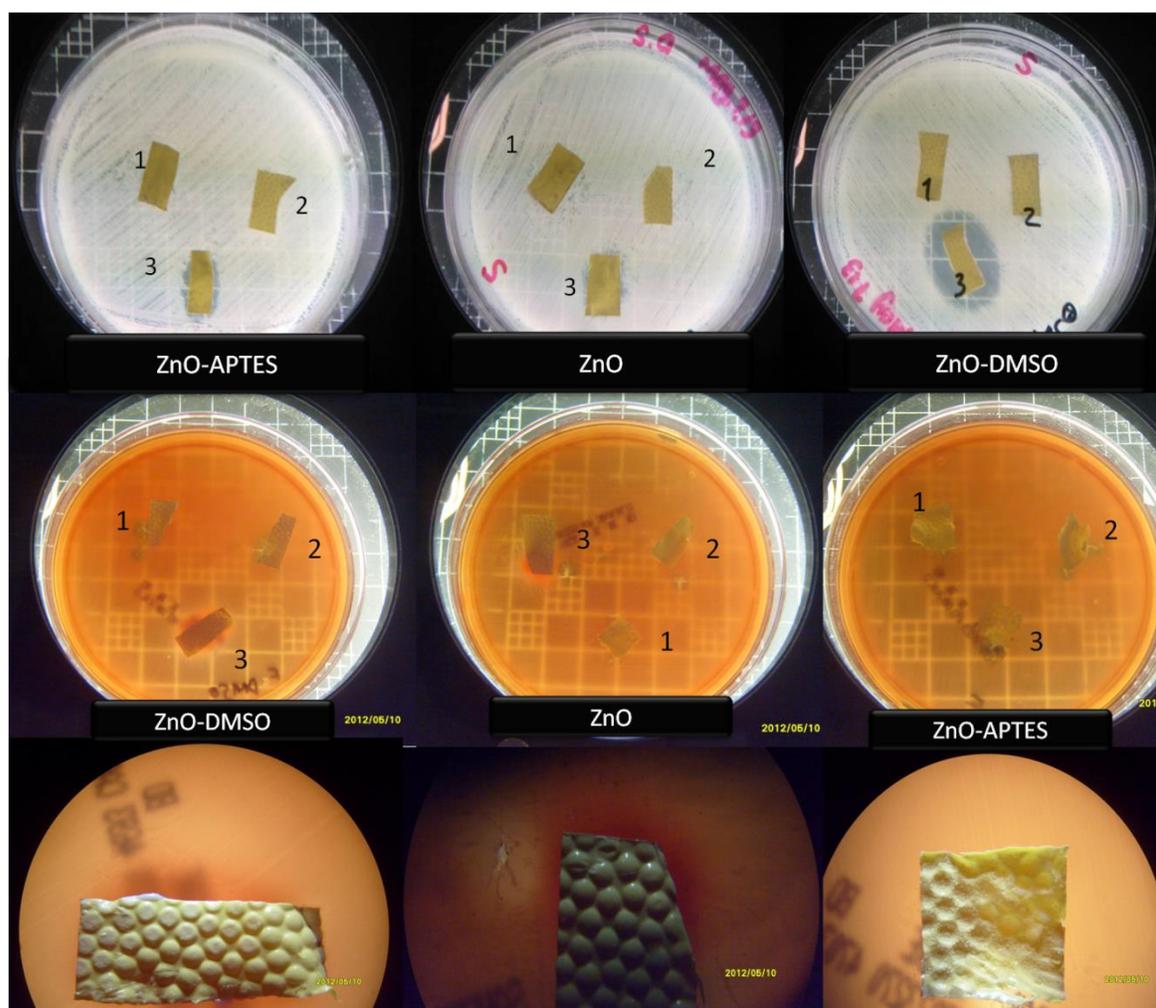


Figura 32. Análisis Cualitativo antimicrobiano de los nanocompuestos PSA-ZnO mediante difusión en agar frente a microorganismos gram positivos

a) *S. aureus* b) *S. pyogenes*. , a concentraciones de 1) 0.1%, 2) 0.2%, 3) 0.3% en peso.

5.2.3. Prueba de Peel

Para determinar las propiedades de adhesión del producto en desarrollo fue necesario evaluar las propiedades mecánicas, que son las que definen el desempeño y uso final de los PSA, es de importancia mantener un buen balance de estas propiedades en el material para asegurar su buen desempeño. Identificando los factores que tienen una influencia notable en el desempeño del material.

Peel, es un factor muy importante en esta clase de adhesivos. En este caso se evaluaron las muestras con mayores propiedades antimicrobianas, es decir, los nanocompuestos PSA que contienen 0.3% en peso de NPs de ZnO, ZnO-DMSO y ZnO-APTES, los cuales fueron comparados con el PSA sin NPs. En la Figura 33 se muestran los resultados obtenidos para la prueba de peel cuando las muestras son analizadas a 180°. Los resultados exponen una mayor fuerza de despegue para el nanocompuesto PSA-ZnO 0.3% 1.11 N/25mm, seguido del PSA sin NPs 0.59 N, luego el PSA/ZnO-APTES con 0.17N/25mm y finalmente PSA/ZnO-DMSO con 0.12 N/25mm.

Estos resultados podrían relacionarse con las diferencias en la composición de los copolímeros cuando se añaden NPs, lo que da lugar a diferencias en la Tg como se mostró anteriormente. Es bien sabido que la Tg se relaciona con este fenómeno, puesto que el incremento en la Tg, tiene efecto en la adhesión, tal como lo reportan Wu y col. (2009) quienes observaron que se obtiene una mayor adhesión, cuando la Tg se incrementa [141].

Además de estos factores, la adhesión (peel), es afectada también por las condiciones de reacción que a su vez también afectan las propiedades del látex como la distribución de pesos moleculares y la distribución del tamaño de partícula [143].

Sin embargo, para las aplicaciones que es requerido se obtuvo una fuerza adecuada de peel, para el adhesivo PSA-ZnO al 0.3%, ya que un apósito médico debe pegarse de manera segura a la piel alrededor de la herida, pero también, es esencial que se pueda quitar fácilmente y sin dolor después de algún tiempo, sin causar daño a la piel o una herida. Chivers y col. (2001) reportaron que PSA con valores de 1 hasta 5 N en pelaje, muestran

menos trauma al remover el PSA de la piel, mientras que valores mayores a este representan mayor dolor al desprendimiento del adhesivo [144].

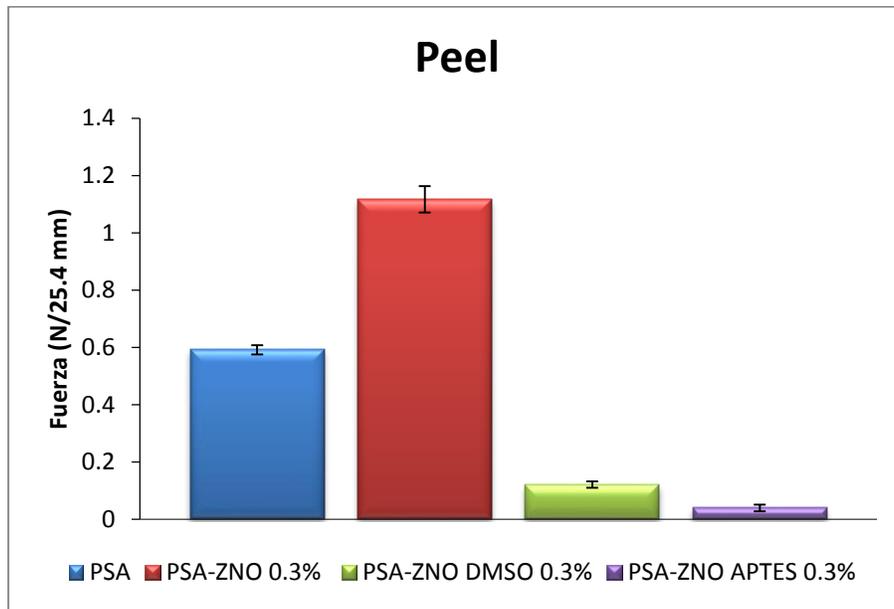


Figura 33. Fuerza de peel en los diferentes nanocompuestos preparados PSA

VI. CONCLUSIONES

Nanopartículas de óxido de zinc

- ◆ Se obtuvieron NPs de ZnO de 26 nm (SEM) y 16 nm (XRD), por el método de precipitación y fueron exitosamente recubiertas con DMSO y APTES.
- ◆ Las NPs de ZnO con y sin modificación poseen, actividad antimicrobiana frente a *E. aerogenes*, *E. coli*, *K. oxytoca*, *S. aureus*, *S. pyogenes* y *P. aeruginosa*, en esta última solo se obtuvo actividad bacteriostática, a las concentraciones evaluadas, sin embargo se obtuvieron resultados diferentes para cada bacteria, atribuido a las diferencias morfológicas de las bacterias, así como de las NPs.
- ◆ El porcentaje de viabilidad celular, depende de la concentración de las NPs, de la línea celular evaluada y la naturaleza química de las mismas. A bajas concentraciones, las NPs de ZnO sin modificar resultaron ser las menos tóxicas, mientras que a altas concentraciones resultaron las de mayor toxicidad para las células (HeLa y NCI).
- ◆ La técnica para la determinación del complemento, demostró que las NPs de ZnO con y sin modificación poseen un comportamiento dosis-dependiente. Sin embargo comparado con el control positivo, la activación del complemento fue mínima, lo que indica que las nps no desencadenan la cascada del mismo, ocasionando muerte celular.
- ◆ La producción de citocinas proinflamatorias tuvieron un comportamiento dosis-dependiente. Las NPs desencadenaron la producción de citocinas IL-6, IL-8, IL-1b y TNF- α y ausencia de citocinas INF- γ e IL-10. Se demostró que la producción de citocinas, se encuentra por debajo de la concentración en la cual pueden causar daño al ser humano.

Nanocompuestos

- ◆ La incorporación de NPs ZnO, a la matriz polimérica, incrementa la Tg del polímero, atribuido a las diferencias en composición de los copolímeros.

- ◆ Al incrementar la concentración de NPs, para todos los nanocompuestos obtenidos, la conversión total disminuye, debido a que la reactividad de los radicales es menor en la presencia de partículas inorgánicas.
- ◆ Los nanocompuestos PSA acrílicos-ZnO mostraron actividad antimicrobiana frente a microorganismos gram positivos, *S. aureus* y *S. pyogenes*, no observándose así la misma actividad para bacterias tipo gram negativas.
- ◆ Los nanocompuestos a base de NPs de ZnO modificadas con APTES y DMSO, presentaron menor adhesión (peel) entre nanocompuesto-sustrato.

VII. TRABAJO A FUTURO

1. Estudiar la interacción de las NPs de ZnO y sus homólogos modificados, en el PSA acrílico para uso médico.
2. Estudio de la liberación de las NPs de ZnO en los PSA sintetizados.
3. Evaluación de la actividad antimicrobiana de manera cuantitativa de nanocompuestos, frente a *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 y *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27835.
4. Determinación la toxicidad de los nanocompuestos acrílicos PSA con diferentes NPs de ZnO.
5. Realización de pruebas de cicatrización y actividad antimicrobiana de los nanocompuestos en animales.
6. Determinación de propiedades de tack y esfuerzo de corte en los diferentes nanocompuestos.

VIII. REFERENCIAS

1. Paul D.R., Robeson L.M. *Polymer*, 2008. 49(15): p. 3187-3204.
2. Reyes Rodríguez, P.M., síntesis y caracterización de NPs de cobre y óxido de cobre y su incorporación en una matriz polimérica y el estudio de sus propiedades antibacterianas. 2012. Centro de Investigación en Química Aplicada: Saltillo.
3. Dumville J.C., O'Meara S., Deshpande S., Speak K., *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2011(4).
4. Association, C.P.M. 2012.
5. Hirsch T., Spielmann M., Zuhaili B, Koehler T, Fossum M, Steinau HU, Yao F, Steinstraesser L, Onderdonk AB, Eriksson E, *BMC Surgery*, 2008. 8(5).
6. Church D., Elsayed S., Reid O., Winston B., Lindsay R., *Clin Microbiol Rev.*, 2006. 19(2): p. 403–434.
7. Betancourt-Galindo R., Paredes A.R., Mata Padilla M., Cabrera-Miranda B.A., Puente-Urbina B. A., Sánchez Valdés S., Rodríguez-Fernandez O., *ide@s CONCYTEG*, 2011. 6(72): p. 662-674.
8. Rajendran R., Balakumar C., Ahammed H., Jayakumar S., Vaideki K., Rajesh E.M. *International Journal of Engineering, Science and Technology* 2010. 2(1): p. 202-208.
9. Tan, H.S., Pfister W.R. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 1999. 2(2): p. 60-69.
10. Akyar D.I., *Wide Spectra of Quality Control*. 2011: InTech.
11. Mehdi, T. *Manufacturing & technology*, 2002.
12. Allevato M.A.. *Act Terap Dermatol*, 2007. 30(1): p. 154.
13. Fonseca G.E., McKenna T.F., Dubé M.A. *Chemical Engineering Science*, 2010. 65(9): p. 2797-2810.
14. Anderson K., Filiatrault D.T., Gaddam B.N, Joseph E.G., Lewandowski K.M., Lu Y.Y., Stofko. Pressure-sensitive adhesive containing silica nanoparticles 2009, 3M Innovative Properties Company: USA.
15. Aymonier A., Papon E., Villenave J.J., Tordjeman P., Pirri R., Gérard P. *Chem. Mater*, 2001. 13: p. 2562-2566.

16. Woo Y. Inelastic analysis of the loop tack test for pressure sensitive adhesives. 2002, the faculty of virginia polytechnic institute and state university: Blacksburg, Virginia.
17. Pizzi A. Handbook of adhesive technology. second edition ed. 2003: *Taylor and Francis group*.
18. Jin X., Bai Y.P., Shao L., Yang B.H., Tang Y.P. *Polymer Letters*, 2009. 3(12): p. 814–820.
19. Cheng Fung, Laurence D. *Pressure sensitive adhesive with enhanced adhesion to low surface energy substrates* 1995, Ashland Oil, Inc: USA.
20. Czech Z., Kowalczyk A., Kabatc J., Świdarska J. *Polym. Bull*, 2012. 69: p. 71-80.
21. H. Ismail, Ahmad Z., Yew F.W. *Journal of Physical Science*, 2011. 22(2): p. 51–63.
22. Cho, Y. Thermal Properties of Acrylic Emulsion Pressure Sensitive Adhesives (PSAs) with Micro-encapsulated Phase Change Material (PCM) and Application for Cooling Electric Devices. 2008, Seoul National University.
23. Czech Z., M.R., *Materials Science-Poland*, 2005. 23(4): p. 1015-1022.
24. Wang, T., Canetta E., Weerakkody T.G., Keddie J.L. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2009. 1(3): p. 631-639.
25. Gower, M.D., Shanks R.A. *Journal of Applied Polymer Science*, 2004. 93(6): p. 2909-2917.
26. Mare V.S., Bharti P.V., Vavia P.R. *Polym. Adv. Technol.*, 2001. 12: p. 466-474.
27. Sperry, P.R., Snyder B.S., O'Dowd, Lesko P.M. *Langmuir*, 1994. 10(8): p. 2619-2628.
28. Kemmere M.F., *Batch emulsion polymerization a chemical engineering approach*, in *Universiteit Eindhoven* 1999.
29. Anderson C.D. and D. E.S., *Emulsion Polymerisation and Latex Applications*. Vol. 14. 2003: iSmithers Rapra Publishing.
30. Matyjaszewski K., Davis T.P. The Kinetics of Free Radical Polymerization, in *HandBook of Radical Polymerization*. 2002: Jhon Wiley & Sons, Inc. Publications.

31. Odian, G., Emulsion Polymerization, in Principles of Polymerization. 2004: Wiley-Interscience.
32. Harkins, W.D., J. Am. Chemical Society, 1947. **69**(1428–1444): p. 217-251.
33. Okubo M., Takeya T., Tsutsumi Y., Kadooka T., Matsumoto T. *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition*, 1981. 19(1): p. 1-8.
34. López C.A., *Modelo de Estabilidad de Emulsiones Poliméricas*, in 2011, Universidad Nacional de Colombia
35. Oh, J.-K., *Synthesis and Adhesion Performance of Polyacrylate-clay Pressure-sensitive Adhesive as nanocomposite by in-situ polymerization* 2009, Seoul National University Seoul, Korea p. 111.
36. Rana, P.K. Sahoo P.K. *Journal of Applied Polymer Science*, 2007. 106(6): p. 3915-3921.
37. Ngawhirunpat T., Thipwichai S., Opanasopit P., Rojanarata T., Panomsuk S. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 2012. 11(4): p. 553-560.
38. Dnyanesh N.T., Vavia P.R., *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2003. 29(1): p. 71–78.
39. Shingade G.M., Quazi A., Sabale P.M., Grampurohit D., Gadhave M.V., Jadhav S.L., Gaikwad D.D., Patil K.T. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, 2012.(2)1.
40. Meruvu H., Meena V., Chippada S.C., Bammidi S.R. *Rasayan J. Chem*, 2011. 4(1): p. 217-222.
41. Auffan, M., Rose J., Bottero J.Y., Lowry G.V., Jolivet J.P., Wiesner M.R. *Nat Nano*, 2009. 4(10): p. 634-641.
42. Ashtaputre S., Marathe S., Wankhede M.E., Chimanpure J., Pasricha R., Urban J., Haram S.K., Gosavi S.W, Kulkarni S.K. *Journal of physics*, 2005. 65(4).
43. Garcia, M.A., Castro R.G., Ruíz M.L., Crespo P. Llopis J., González-Calbet, Hernando A., Fernández P., Quesada A. *Nano Letters*, 2007. 7(6): p. 1489-1494.
44. Bhatti, Gupta A., Verma N.K., Kumar S. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 2006. 17(4): p. 281-285.
45. Sharma D., Sharma S., Kaitha B.S., Rajputa J., Kaur M.. *Applied Surface Science*, 2011. 257: p. 9661-9672.
46. Yufeng Z., Ranzhong L., Yuedan W. *International Journal of Modern Physics B*. 2009. 23(06-07): p. 1566-1571.

47. Padmavathy N., Vijayaraghavan R.. *Sci. Technol. Adv. Mater.*, 2008. 9.
48. Sangeetha G., Rajeshwari S., Venckatesh R. *Materials Research Bulletin*, 2011. 46(12): p. 2560-2566.
49. ÖZGür U., Liu C., Teke A., Reshchikov M.A., Dogan S., Avrutin V., Cho S.J., Morkoc H. *J.Appl. Phys.*, 2005. 98.
50. Zhou Q., Lau S., Wu D., Shung K.K. *Progress in Materials Science*, 2011. 56(2): p. 139-174.
51. Solís Pomar, F.J., Síntesis de nanoestructuras en 1d de ZnO para su uso en aplicaciones de energía y ambientales. 2012, Universidad Autónoma De Nuevo León.
52. Zanella, R. *Mundo Nano*, 2012. 5(1).
53. Pookmanee P., Intarapoom R., Phanichphant S, *Journal of Microscopy Society of Thailand*, 2006. 20(1): p. 72-78.
54. Aneesh P. M., Vanaja. K.A., Jayaraj M. K. *Nanophotonic Materials IV*, 2007. 6639: p. 0277-786.
55. Kumar. C., *Nanostructured Oxides 2009*: Willey.
56. Shokuhfar A., Samei J., Esmaelzadeh Kandjani A., Vaezi M.R. *Defect and Diffusion Forum*, 2008. 273 - 276: p. 626-631.
57. He G., Cai J.H., Ni G.. *Materials Chemistry and Physics*, 2008. 110(1): p. 110-114.
58. Martinez-Segovia, E.E., Síntesis de polímeros reforzados con hule en presencia de NPs metálicas mediante polimerización vía extrusión reactiva: estudio del efecto en las propiedades finales. 2011, Centro de Investigación en Química Aplicada.
59. Khoshhesab Z.M., Asadabad M.A. , *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry 2011*. 41(7) Taylor & Francis.
60. Azam A., Arshi N., Chaman M., Naqvi A.H.. *International Journal of Theoretical & Applied Sciences*, 2009. 2(1): p. 12-14.
61. Jalal, R., Goharshadia E.K., Abareshia M., Moosavic M., Yousefid A., Nancarrowe P. *Materials Chemistry and Physics*, 2010. 121(1-2): p. 198-201.
62. Miranda, C., Preparación de nanocompuestos de PS y/o PMMA incorporando NPs de plata mediante polimerización en miniemulsión, in *Materiales Avanzados*. 2010, Centro de Investigación en Química Aplicada.

63. Hong, R.Y., Lia J.H, Chena L.L., Liua D.Q., Lib H.Z., Zhengc Y., Dingd J. *Powder Technology*, 2009. 189(3): p. 426-432.
64. Esteves C. A., Trindade T. *Quim. Nova.* , 2004. 27(5): p. 798-806.
65. Gu, J., Dang J., Zhang J., Chen S. *Polymer Bulletin*, 2009. 62(5): p. 689-697.
66. Posthumus, W. Magusin PC, Brokken-Zijp J.C., Tinnemans A.H., van der Linde R. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2004. 269(1): p. 109-116.
67. Chen, L., Zhengb L., Lva Y., Liua H., Wanga G., Rena N., Liua D, Wanga J., Boughtonc R.. *Surface and Coatings Technology*, 2010. 204(23): p. 3871-3875.
68. He, L., Liu Y., Mustapha A., Lin M.. *Microbiological Research*, 2011. 166(3): p. 207-215.
69. Gordon, T., Perlsteina B., Houbarab O., Felnerc I., Baninb E., Margel S. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2011. 374(1-3): p. 1-8.
70. Vani C., Sergin G.K., Annamalai A. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2011. 2(4).
71. Yousef J. and Danial. N.E., *Journal of Health Sciences*, 2012. 2(4): p. 38-42.
72. Chitra K, Annadura. G. *International Food Research Journal*, 2013. 20(1): p. 59-64.
73. Cioffi N., Mahendra R., *Nano-Antimicrobials: Progress and Prospects.*, ed. E. sevier. 2012.
74. Chang, Y.-N., Zhang M., Xia L., Zhang J., Xing G. *Materials*, 2012. 5(12): p. 2850-2871.
75. Yang S.T., Liu J.H., Wang J., Yuan Y., Cao A., Wang H., Liu Y., Zhao Y. *J Nanosci Nanotechnol*, 2010. 10(12): p. 8638-45.
76. Lin, W., Yi Xu, Huang C.C., Ma Y., Shannon K., Chen D., Huang Y.W. *Journal of Nanoparticle Research*, 2009. 11(1): p. 25-39.
77. Heng BC, Zhao X., Tan E.C., Khamis N., Assodani A., Xiong S., Ruedl C., Ng K.W., Loo J.S. *Arch Toxicol*, 2011. 85(12): p. 1517-28.
78. Smijs T.G. Stanislav P., *Nanotechnology, Science and Applications* 2011. 4(1): p. 95-112
79. Baek;, M., Kim M.K, Cho H.J, Lee J.A., Yu J., Chung H.E., Choi S.H.. *Journal of Physics: Conference Series*, 2011. 304.
80. Dinarello C.A. *CHEST Journal*, 2000. 118(2): p. 503-508.

81. Elsabahy M., Wooley K.L. *Chemical Society Reviews*, 2013. 42(12): p. 5552-5576.
82. Zolnik, B.S., González-Fernández A., Sadrieh N., Dobrovolskaia M. *Endocrinology*, 2010. 151(2): p. 458-465.
83. Veranth, J., Kaser E.G., Veranth M.M., Koch M., Yost G.S. *Particle and Fibre Toxicology*, 2007. 4(1): p. 2.
84. Pham, T.N., Mitchell L.M., Huang J.L., Lubniewski C.M., Schall O.F., Killgore J.K., Pan D., Wickline S.A., Lanza G.M., Hourcade D.E. *The Journal Of Biological Chemistry*, 2010. 286(1): p. 123-130.
85. Yanmei, Y., iu Z, Bing Y. *Nanoscale Res Lett*, 2008. 3: p. 271-277.
86. Salvador-Morales, C., Flahaut E., Sim E., Sloan J., Green M.L., Sim R.B. *Molecular Immunology*, 2006. 43(3): p. 193-201.
87. Moghimi, S.M., Hamad I., Andresen T.L., Jørgensen K., Szebeni J. *The FASEB Journal*, 2006. 20(14): p. 2591-2593.
88. Dobrovolskaia M.A., McNeil S.E., *Handbook of Immunological Properties of Engineered Nanomaterials*. Vol. 1. 2013: Frontiers in Nanobiomedical Research.
89. Kyoung, J., *Synthesis and Adhesion Performance of Polyacrylate-clay Pressure-sensitive Adhesive as nanocomposite by in-situ polymerization*. 2009, National University Seoul.
90. Lofton L. *Clay/polymer nanocomposites for pressure sensitive adhesives*. Rohm and Haas Company, Spring House, PA
91. Kajtna, J., Šebenik U. *International Journal of Adhesion and Adhesives*, 2009. 29(5): p. 543-550.
92. Shaikh S., Birdi A., Qutubuddin S., Lakatos E., Baskaran H. *Ann Biomed Eng.*, 2007. 35(12): p. 2130-2137.
93. Wang T., *Interfacial control in colloidal nanocomposites for Pressure-sensitive adhesives*. 2008, University of surrey.
94. Wang, T., Lei C.-H, Dalton A.B., Creton C., Lin Y., Fernando K.A.S., Sun Y.P., Manea M., Asua J.M., Keddie J.L. *Advanced Materials*, 2006. 18(20): p. 2730-2734.
95. Tang, E., Dong S. *Colloid and Polymer Science*, 2009. 287(9): p. 1025-1032.
96. Chen, J.H., Chenga C.-Y., Chiu W.-Y., Leec C.-F., Liangd N.-Y- *European Polymer Journal*, 2008. 44(10): p. 3271-3279.

97. Xiong, M., Gu G., You B., Wu L. *Journal of Applied Polymer Science*, 2003. 90(7): p. 1923-1931.
98. Mosmann, T. *Journal of Immunological Methods*, 1983. 65(1-2): p. 55-63.
99. Denizot F., Lang R. *J Immunol Methods*, 1986. 22(89): p. 271-277.
100. Díaz Sanz, I., *Efecto de la resección hepática sobre el comportamiento de las células tumorales residuales y utilidad del ATRA para controlar dicho efecto en un modelo experimental*. 2011. Universidad del País Vasco
101. Neun, B., Dobrovolskaia M., *Qualitative Analysis of Total Complement Activation by Nanoparticles*, in *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*, S.E. McNeil, Editor. 2011, Humana Press. p. 237-245.
102. Sharma, D., Rajputa J., Kaitha B.S., Kaurb M., Sharma S. *Thin Solid Films*, 2010. 519(3): p. 1224-1229.
103. Kagel, R.A.N.a.R.O., *Infrared Spectra of Inorganic Compounds* Chemical Physics Research Laboratory. The dow Chemical Company. ed: Academic Press, Inc.
104. Huang P.D., Dong A., Caughey WS. *Journal of pharmaceutical sciences*, 1995. 8(4).
105. Grasset F., Saitoa N., Lia D., Parka D., Sakaguchia I., Ohashia N., Hanedaa H., Roisnelc T., S Mornetd, Dugueta E. *Journal of Alloys and Compounds*, 2003. 360(1-2): p. 298-311.
106. Navarre, W.W., Schneewind O. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1999. 63(1): p. 174-229.
107. Brayner, R., Ferrari-Iliou R., Brivois N., Djediat S., Benedetti M.F., Fiévet F. *Nano Letters*, 2006. 6(4): p. 866-870.
108. Jones N., Ray B., Ranjit K.T., Manna A.C. *FEMS Microbiology Letters*, 2008. 279(1): p. 71-76.
109. Reddy K.M., et al., *Appl Phys Lett*. Author manuscript, 2007. **90**.
110. Emami-Karvani Z. and C. P, *African Journal of Microbiology Research*, 2011. 5(12): p. 1368-1373.
111. Dutta, R.K., Sharma P.K., Bhargava R., Kumar N., Pandey A.C. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2010. 114(16): p. 5594-5599.
112. Mirhosseini M., Firouzabadi F.B. *International Journal of Dairy Technology*, 2013. 66(2): p. 291-295.

113. Fang M., Chena J.-H., Xub, X.-H., Yangb P.-H., Hildebrand F.H. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2006. 27(6): p. 513-517.
114. Ansel, H.C., W.P. Norred, and I.L. Roth.. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1969. 58(7): p. 836-839.
115. Pottz, G. E., J. A. Rampey, and F. Benjamin. 1967. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 141:261-272
116. Merino, L.A. *Revista Argentina de Microbiología*, 2007. 39(143).
117. Qi, W., Ding D., Salvi R.J. *Hearing Research*, 2008. 236(1-2): p. 52-60.
118. Malinin, G.I. *Cryobiology*, 1973. 10(1): p. 22-32.
119. Wang S.W., Wen S, Shen M, Guo R, Cao X, Wang J, Shi X. *Int J Nanomedicine*, 2011. 6: p. 3449-3459.
120. Wahab R., Kaushik N.K., Verma A.K., Mishra A., Hwang I.H., Yang Y.B., Shin H.S., Kim Y.S. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2011. 16(3): p. 431-442.
121. Miura, N. and Y. Shinohara, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009. 390(3): p. 733-737.
122. Sukirtha, R. *Process Biochemistry*, 2012. 47(2): p. 273-279.
123. MacDonald, R.S. *J. Nutr*, 2000. 130(5): p. 1500-1508.
124. Kroll, A., Pillukat M.H., Hahn D., Schnekenburger J. *Archives of Toxicology*, 2012. 86(7): p. 1123-1136.
125. González-Fernández A., Peleteiro- olmedo M., Lozano-Fernández T., Simón-Vázquez R., Freitas B. *Nuevas Perspectivas en Inmunoterapia*.
126. Thomas S.N., Van der Vlies A.J., O'Neil C.P., Reddy S.T., Yu S.S., Giorgio T.D., Swartz M.A., Hubbell J.A. *Biomaterials*, 2011. 32(8): p. 2194-2203.
127. Bertholon I., Vauthier C., Labarre D. *Pharmaceutical Research*, 2006. 23(6).
128. Furtado V.C., Legranda P., Gulikb A., Bourdonc O., Grefa R., Labarrea D., Barratt G. *Biomaterials*, 2001. 22(22): p. 2967-2979.
129. Duffin R., Tran L., Brown D., Stone V, Donaldson K. *Inhalation Toxicology*, 2007. 19(10): p. 849-856.
130. Sayes C.M., Reed K.L, Warheit D.B. *Toxicological Sciences*, 2007. 97(1): p. 163-180.

131. Hanley C., Hanna C., Punnoose A., Zhang J., Wingett D.G. *Nanoscale Res Lett.*, 2009. 4(12): p. 1409-1420.
132. Rasmussen J.W. Martinez E., Louka P., Wingett D.G. *Expert Opin Drug Deliv*, 2010. 7(9): p. 1063–1077.
133. Roy R., Tripathi A., Das M., Dwivedi P.D. *J Biomed Nanotechnol.*, 2011. 7(1): p. 110-111.
134. Salcedo Posadas, A. *Fibrosis quística*. 1998: Ediciones Díaz Santos.
135. Monteiro-Riviere, N.A., Nemanich RJ, Inman A.O., Wang Y.Y., Riviere J.E. *Toxicology Letters*, 2005. 155(3): p. 377-384.
136. Monteiller C., Tran L., MacNee W., Faux S., Jones A., Miller B., Donaldson K. *Occupational and Environmental Medicine*, 2007. 64(9): p. 609-615.
137. Czech, Z., Butwin A. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 2009. 23(12): p. 1689-1707.
138. Jovanović, R., Dubé M.A. *Journal of Macromolecular Science, Part C*, 2004. 44(1): p. 1-51.
139. Qi, D., Bao Y.-Z., Weng Z.-x, Huang Z.-m. *Polymer*. 2006. 47(13): p. 4622-4629.
140. Tong, Z., Deng Y. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2006. 45(8): p. 2641-2645.
141. Wu, L., Wang M., Zhang X., Chen D., Zhong A.. *Iranian Polymer Journal*, 2009. 18(9): p. 703-712.
142. Ma, X.-Y., Zhang W.-D. *Polymer Degradation and Stability*, 2009. 94(7): p. 1103-1109.
143. Mascorro R., Síntesis y evaluación de psa's base agua homogéneos y núcleo-coraza 2009, Instituto Politecnico Nacional.
144. Chivers, R.A. *International Journal of Adhesion and Adhesives*, 2001. 21(5): p. 381-388.