

TESIS

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y MECANISMO DE ACCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y COBRE INCORPORADAS EN POLIPROPILENO

PRESENTADA POR:

MC. Beatriz Liliana España Sánchez

PARA OBTENER EL GRADO DE:

Doctor en Tecnología de Polímeros

ASESORES:

Dr. Carlos Alberto Ávila Orta Dr. Felipe Padilla Vaca

Saltillo, Coahuila

Agosto 2014

TESIS CON CARACTER ABIERTO

PROGRAMA: DOCTORAD	O EN TECNOLOGÍA DE POLÍMEROS
	\ where
AUTOR: BEATRIZ LILIAN	A ESPAÑA SÁNCHEZ FIRMA
TITULO: Actividad Antin	nicrobiana y Mecanismo de Acción de
	y Cobre Incorporadas en Polipropileno.
ASESORES: <u>Dr. Carlos Alb</u> Dr. Felipe Pad	
D1. Penpe 1 au	ma vaca
El Centro de Investigación documento de tesis como AB	en Química Aplicada clasifica el presente IERTO.
Centro de Información para	omo Abierto se expone en los estantes del su consulta. Dicho documento no puede ser ad sin autorización por escrito del Titular del Director General del CIQA.
Saltillo, Coahuila, a 29 de	agosto de 2014
THE WALL OF THE PARTY OF THE PA	
Sello de la Institución	Dr. Oliverio Santiago Rodríguez Fernández
	Director Congrel del CIOA

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA Programa de Doctorado en Tecnología de Polímeros

TESIS

Actividad Antimicrobiana y Mecanismo de Acción de Nanopartículas de Plata y Cobre Incorporadas en Polipropileno

Presentada por:

BEATRIZ LILIANA ESPAÑA SÁNCHEZ

Para obtener el grado de:

Doctor en Tecnología de Polímeros

Asesorada por:

Dr. Carlos Alberto Ávila Orta Dr. Felipe Padilla Vaca

SINODALES

Dr. Jorge Romero García

Presidente

Dr. René Darío Peralta Rodríguez

Secretario

Dr. Dámaso Navarro Rodríguez

1er. Vocal

Dra. Aidé Sáenz Galindo

2do. Vocal

Dr. Gerardo de Jesús Sosa Santillán

3er. Vocal

Saltillo, Coahuila

Agosto, 2014

DECLARACIÓN

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

Saltillo, Coahuila, a 29 de Agosto de 2014

BEATRIZ LILIANA ESPAÑA SÁNCHEZ

Nombre y firma

Esta investigación fue realizada en el **Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA)** con el apoyo del mismo y del **CONACYT** a través del proyecto *CuVito* 127151 y por parte del Programa European Union´s Seventh Framework a través del proyecto 263969. Además del apoyo recibido a través de la beca 239110. Agradezco a ambas instituciones por el apoyo económico para la realización de este proyecto.

DEDICATORIA

A Dios, que por extrañas razones siempre me ha bendecido con fuerza y energía para salir adelante cada día.

A mi Familia. Papá y Mamá: todo esto es gracias a ustedes, este es el resultado de todo el apoyo que me han dado, ustedes son mi motor de vida y el motivo por el cual le echo ganas todos los días, se merecen esto y más. A mis hermanos Ale, Vick y Juan Pablo, gracias por tantas horas de alegría. Sin todos ustedes, yo no soy nada.

A Fer, gracias por el apoyo y comprensión.

A todos mis familiares, amigos y cada una de las personas que he conocido durante los últimos años. Cada uno de ustedes ha sido pieza importante en el rompecabezas de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis asesores Dr. Carlos Alberto Ávila Orta y el Dr. Felipe Padilla Vaca. Gracias por darme la oportunidad de participar en este proyecto, por todas sus enseñanzas, consejos y el tiempo invertido. Gracias por el apoyo para la realización de este proyecto.

Agradezco a mis sinodales: Dr. Jorge Romero, Dr. René Peralta, Dr. Dámaso Navarro, Dr. Gerardo Sosa y la Dra. Aidé Saenz Galindo. Gracias por todo el aporte de experiencia y conocimientos para el enriquecimiento de este trabajo.

Agradezco a mis amigos y compañeros de trabajo Albert, Pablo, Ernie; gracias por tantas vivencias y enseñanzas, gracias por permitirme ser parte de este equipo de trabajo.

Agradezco infinitamente al departamento de Biología de la Universidad de Guanajuato, Ángeles, Bernardo, Dr. Fernando, Itzel, Luz, Janet, Sairy, don Toño, Rita y Caro (Q.E.P.D). Gracias por darme la oportunidad de integrarme al laboratorio, todas sus enseñanzas y la bonita amistad que me han brindado.

Agradezco al grupo de trabajo del Proyecto CuVito: Dra. Rebeca Betancourt, Dr. Gregorio Cadenas, Dra. Hortensia Ortega, Dr. Guillermo Martínez y Dra. Lupita Neira. Gracias por permitirme formar parte de este proyecto.

Agradezco al Dr. Ronald Ziolo por todas sus enseñanzas, conocimientos y el tiempo dedicado para llevar a cabo la escritura de artículos científicos.

Agradezco el apoyo técnico brindado por Janett Valdéz, Bertha Puente, Raquel Ledezma, Layza Arizmendi y Marlene Rodríguez.

Agradezco al departamento de Procesos de Transformación de Plásticos por todo el apoyo técnico para la preparación de los nanocompuestos. En especial agradezco a Francisco Zendejo, Fabián Chávez y Rodrigo Cedillo.

Agradezco al personal del departamento de Laboratorio Central por todo su apoyo en la caracterización de los nanocompuestos: Silvia Solís, Blanca Huerta, Guadalupe Méndez,

Myriam Lozano, Ma. Luisa López, Jesús Cepeda, Josefina Zamora y Silvia Solís, gracias por su apoyo en la caracterización de muestras y el análisis de resultados.

Agradezco al personal del departamento de Microscopía: Mónica Ceniceros, Esmeralda Saucedo y en especial a Enrique Díaz Barriga Castro por toda su dedicación en el análisis de bacterias mediante TEM.

Agradezco al Dr. Florentino Soriano Por su apoyo en el corte de muestras para la observación de bacterias mediante TEM.

Agradezco al Dr. Carlos Gallardo por su apoyo y colaboración en el análisis de resultados de XPS.

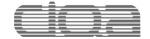
Agradezco al personal del departamento de Informática, en particular a Carlos Alberto de la Peña, por su apoyo técnico en el equipo de cómputo.

Agradezco al personal de Servicios de Información: Daniel Álvarez, Uriel Peña y José Luis de la Peña, por todo su apoyo brindado en la recopilación de artículos científicos y el acceso a las bases de datos.

Agradezco al personal de posgrado: Dr. Luis Alfonso, Gladys de los Santos, Imelda Vargas, Nancy Espinoza por toda su asesoría y apoyo en los trámites de posgrado.

Agradezco al Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA) por facilitar sus instalaciones y equipos para la realización del presente trabajo con el apoyo de CONACYT a través del proyecto *CuVito* 127151 y por parte del Programa European Union's Seventh Framework a través del proyecto 263969. Además del apoyo recibido a través de la beca 239110. Agradezco a ambas instituciones por el apoyo económico para la realización de este proyecto.

Agradezco a todos mis amigos (as) que han formado parte importante de esta gran experiencia.



ÍNDICE

	Página
Índice de Figuras	6
Índice de Tablas	9
Abreviaturas	10
1. RESUMEN	11
2. INTRODUCCIÓN	12
3. ANTECEDENTES	15
3.1. Nanopartículas Metálicas	15
3.1.1. Nanopartículas de Plata (nAg)	16
3.1.1.1. Síntesis de nAg	16
3.1.1.2. Estructura de nAg	17
3.1.1.3. Propiedades Físico-Químicas de nAg	18
3.1.1.4. Propiedades Ópticas de nAg	18
3.1.1.5. Actividad Antimicrobiana de nAg	18
3.1.1.6. Toxicidad de nAg	20
3.1.1.7. Aplicaciones de nAg	21
3.1.2. Nanopartículas de Cobre (nCu)	21
3.1.2.1. Síntesis de nCu	22
3.1.2.2. Estructura de nCu	23
3.1.2.3. Propiedades Físico-Químicas de nCu	23
3.1.2.4. Propiedades Ópticas de nCu	24
3.1.2.5. Actividad Antimicrobiana de nCu	24
3.1.2.6. Toxicidad de nCu	26
3.1.2.7. Aplicaciones de nCu	26
3.2. Polipropileno (PP)	28
3.2.1. Síntesis del PP	28
3.2.2. Estructura del PP	29
3.2.3. Propiedades del PP	31
3.2.4. Aplicaciones del PP	32
3.3. Nanocompuestos Poliméricos	33
3.3.1. Preparación de Nanocompuestos Poliméricos	33



3.3.1.2. Mezclado en Fundido 34 3.3.1.3. Polimerización in situ 34	
3.3.1.3. Polimarización in citu	
5.5.1.5.1 officerzacion <i>in suu</i>	
3.3.2. Propiedades de Nanocompuestos Poliméricos 35	
3.3.3. Nanocompuestos de PP/nAg 36	
3.3.4. Nanocompuestos de PP/nCu 37	
3.3.5. Aplicaciones de Nanocompuestos Poliméricos 37	
3.4. Plasma 38	
3.4.1. Generalidades 38	
3.4.2. Modificación de Superficies por Plasma 39	
3.4.3. Mecanismo de Erosión del iPP 40	
3.4.4. Aplicaciones del Plasma 41	
3.5. Mecanismo Antibacteriano de NPs Metálicas 42	
3.5.1. Mecanismo de Interacción entre Bacterias y NPs Metálicas 42	
3.5.1.1. Tamaño y Forma de las NPs 43	
3.5.1.2. Liberación de Iones de la Superficie de las NPs	
3.5.1.3. Diferencias Estructurales en la Pared Celular de Bacterias 45	
3.5.2. Mecanismo de Acción de NPs Metálicas sobre Bacterias 46	
3.5.2.1. Alteraciones en la Membrana Celular 46	
3.5.2.2. Daño en ADN 47	
3.5.2.3. Daño en Proteínas 48	
5.5.2.5. Dano en Proteinas 48	
4. HIPÓTESIS 50	
4. III 01E5I5	
5. OBJETIVO 51	
5.1. Objetivo General 51	
5.2. Objetivos Particulares 51	
6. DESARROLLO EXPERIMENTAL 52	
6.1. Materiales 54	
6.2. Métodos 55	
6.2.1. Actividad Antibacteriana de NPs Metálicas 55	
6.2.2. Preparación de Nanocompuestos Poliméricos mediante 56	
Mezclado en Fundido	



6.2.3. Activación Superficial de Nanocompuestos mediante Plasma de Argón	56
6.2.4. Actividad Antibacteriana de Nanocompuestos Poliméricos	57
6.2.5. Análisis de la Interacción entre Bacterias y NPS Metálicas	58
6.2.5.1. Biosensores Bacterianos en respuesta a Daño específico	58
producido por la Interacción con NPs Metálicas	36
6.2.5.2. Evaluación de la Integridad de la Membrana Celular a	59
partir de Fluorocromos Vitales	37
6.2.5.3. Análisis de la Alteración en la Estructura Bacteriana por la	59
presencia de nAg y nCu mediante Microscopia Electrónica	37
de Transmisión (TEM)	
6.2.5.4. Determinación de los Tiempos de Evaluación de Daño a	60
partir de Curvas de Inhibición de Crecimiento Bacteriano	00
6.2.5.5. Extracción de ADN Genómico (ADNg)	60
6.2.5.6. Evaluación de la Genotoxocidad mediante la Amplificación	61
Aleatoria de ADN Polimórfico (RAPDs)	01
6.2.5.7. Extracción de ADN Plasmídico (ADNp)	62
6.2.5.8. Obtención de Perfiles de Proteínas Totales de <i>P. aeruginosa</i>	63
interaccionada con nAg y nCu	0.5
6.3. Técnicas de Caracterización	64
6.3.1. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)	64
6.3.2. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)	65
6.3.3. Difracción de Rayos-X de Ángulo Amplio (WAXD)	66
6.3.4. Análisis Termogravimétrico (TGA)	68
6.3.5. Microscopia de Fuerza Atómica (AFM)	69
6.3.6. Espectroscopia Fotoelectrónica de Rayos X (XPS)	70
7. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	72
7.1. NPs Metálicas	73
7.1.1. Morfología	73
7.1.2. Actividad Antibacteriana	76
7.2. Nanocompuestos Poliméricos	80
7.2.1. Morfología y Dispersión	80
7.2.2. Estructura Cristalina	81
7.2.3. Estabilidad Térmica	83
1.2.0. Lowniaga I Cimica	0.5
7.3. Tratamiento Superficial de Nanocompuestos Poliméricos mediante Plasma de Argón	85



7.3.1. Activación Superficial	85
7.4. Actividad Antibacteriana de Nanocompuestos Poliméricos	99
7.5. Análisis del efecto de la Interacción entre Células Bacterianas y NPs Metálicas	105
7.5.1. Respuesta de Biosensores Bacterianos a la Interacción con nAg y nCu	105
7.5.2. Efecto de la Interacción de nAg y nCu sobre la Integridad de la Membrana	111
7.5.3. Efecto de la Interacción de nAg y nCu sobre las Estructuras Celulares de <i>P. aeruginosa</i>	114
7.5.4. Inhibición de Crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> y <i>E. coli</i> producido por nAg y nCu	118
7.5.5. Efecto de la Interacción de nAg y nCu sobre la Integridad del ADN genómico (ADNg)	120
7.5.6. Evaluación del Efecto Genotóxico de nAg y nCu sobre <i>P. aeruginosa</i> mediante la Amplificación al azar de ADN Polimórfico (RAPDs)	123
7.5.7. Efecto de nAg y nCu sobre el ADNp	127
7.5.8. Efecto de nAg y nCu sobre el Perfil de Proteínas Totales de P. aeruginosa	130
7.6. Mecanismo Antimicrobiano de NPs Metálicas	132
7.7. Mecanismo Antimicrobiano de Nanocompuestos Poliméricos Erosionados con Plasma	137
8. CONCLUSIONES	139
9. TRABAJO A FUTURO	141
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	142



ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 3.1. Patrón de difracción de rayos-X que demuestra la estructura FCC	
característica de nAg.	17
Figura 3.2. Patrón de difracción de rayos-X que demuestra la estructura FCC	
característica de las nCu.	23
Figura 3.3. Estructura general del PP.	28
Figura 3.4. Diferentes arreglos estructurales del PP.	30
Figura 3.5. Difractograma WAXD de la fase α-monoclínica del iPP.	31
Figura 3.6. Esquema representativo de los cuatro estados de agregación de la	
materia y las especies formadas en el plasma.	38
Figura 3.7. Diferencias estructurales en la composición de a) bacterias Gram	
(+) y b) bacterias Gram (-).	45
Figura 3.8. Esquema que representa el mecanismo propuesto por Kumar y	
col. 114 de daño al ADN producido por interacción con NPs.	47
Figura 6.1. Esquema de la estrategia experimental implementada en el presente	
trabajo.	53
Figura 6.2. Esquema representativo del funcionamiento del TEM.	64
Figura 6.3. Esquema representativo del funcionamiento del SEM.	66
Figura 6.4. Esquema representativo del funcionamiento del difractómetro de	
rayos-X (WAXD).	67
Figura 6.5. Esquema representativo del sistema de termo balanza empleado en	
el TGA.	68
Figura 6.6. Esquema representativo del funcionamiento del AFM.	69
Figura 6.7. Esquema representativo del funcionamiento del XPS.	70
Figura 7.1. Caracterización de nAg comerciales.	74
Figura 7.2. Caracterización de nCu comerciales.	75
Figura 7.3. Actividad antibacteriana de nAg y nCu sobre <i>S. aureus</i> .	78
Figura 7.4. Actividad antibacteriana de nAg y nCu sobre <i>P. aeruginosa.</i>	79
Figura 7.5. Micrografías SEM de nanocompuestos PP/nAg y PP/nCu al 5 %	
p/p.	81
Figura 7.6. Difractogramas WAXD de nanocompuestos PP/nAg y PP/nCu en	
diferentes concentraciones.	82
Figura 7.7. Análisis termogravimétrico de nanocompuestos PP/nAg y PP/nCu	
en diferentes concentraciones	84



Figura 7.8. Micrografías SEM de los nanocompuestos PP/nAg y PP/nCu al 5	
% antes y después del tratamiento con plasma.	86
Figura 7.9. Imágenes AFM 3D de topografía superficial de nanocompuestos	
antes y después del tratamiento con plasma.	88
Figura 7.10. Imágenes AFM 2D de los nanocompuestos PP/nAg y PP/nCu	
antes y después del tratamiento con plasma.	91
Figura 7.11. Espectros generales XPS de los nanocompuestos PP/nAg y	
PP/nCu antes y después del tratamiento con plasma.	94
Figura 7.12. Espectros de C1s de los nanocompuestos PP/nAg y PP/nCu al 5	
% antes y después del tratamiento con plasma.	96
Figura 7.13. Espectros XPS de Ag y Cu de los nanocompuestos PP/nAg y	
PP/nCu al 5% antes y después del tratamiento con plasma.	97
Figura 7.14. Actividad antibacteriana de nanocompuestos PP/nAg y PP/nCu en	
función del tratamiento con plasma sobre S. aureus.	100
Figura 7.15. Actividad antibacteriana de nanocompuestos PP/nAg y PP/nCu en	
función del tratamiento con plasma sobre P. aeruginosa.	102
Figura 7.16. Validación de biosensores bacterianos de <i>E. coli</i> con controles (+)	
de estímulo a daño específico.	106
Figura 7.17. Respuesta del biosensor FabA al daño en membrana generado por	
nAg y nCu.	107
Figura 7.18. Respuesta del biosensor KatG al estrés oxidativo generado por	
nAg y nCu.	108
Figura 7.19. Respuesta del biosensor DnaK al daño a proteínas generado por	
nAg y nCu.	109
Figura 7.20. Respuesta del biosensor RecA al daño al ADN generado por nAg	
y nCu.	110
Figura 7.21. Efecto de NPs metálicas sobre la integridad de la membrana	
bacteriana después de 2 h de interacción con fluorocromos vitales.	112
Figura 7.22. Efecto de diferentes concentraciones de nCu sobre la integridad	
de la membrana bacteriana después de 2 h de interacción con fluorocromos	
vitales.	113
Figura 7.23. Micrografías TEM de P. aeruginosa y su interacción con nAg.	116
Figura 7.24. Micrografías TEM de P. aeruginosa y su interacción con nCu.	117
Figura 7.25. Efecto de nAg y nCu sobre el crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> .	119
Figura 7.26. Efecto de nAg y nCu sobre el crecimiento de E. coli.	120
Figura 7.27. Evaluación de la integridad del ADNg de P. aeruginosa al	
interaccionar con nAg y nCu.	122
Figura 7.28. RAPDs de P. aeruginosa en presencia de diferentes	
oligonucleótidos.	124



Figura 7.29. RAPDs de P. aeruginosa cultivadas en presencia de diferentes	
concentraciones de nAg.	125
Figura 7.30. RAPDs de P. aeruginosa cultivadas en presencia de diferentes	
concentraciones de nCu.	126
Figura 7.31. Efecto de la interacción directa de nAg y nCu sobre el ADNp de	
E. coli.	128
Figura 7.32. Efecto de la interacción de bacterias E. coli con nAg y nCu y la	
posterior extracción del ADNp.	129
Figura 7.33. Perfil de proteínas totales de P. aeruginosa después de su	
interacción con nAg y nCu.	131
Figura 7.34. Modelo propuesto para el mecanismo primario de actividad	
antimicrobiana de NPs metálicas.	134
Figura 7.35. Modelo propuesto para el mecanismo secundario de actividad	
antimicrobiana de NPs metálicas.	136
Figura 7.36. Modelo propuesto para el mecanismo de actividad antimicrobiana	
de nanocompuestos PP/nAg y PP/nCu erosionados con plasma.	138



ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 3.1. Actividad antimicrobiana de nAg.	19
Tabla 3.2. Actividad antimicrobiana de nCu.	25
Tabla 6.1. Secuencias de oligonucleótidos empleados para la amplificación de	
ADNg de P. aeruginosa mediante RAPDs.	62
Tabla 7.1. Valores de CMI y CMB (μg/mL) de nAg y nCu contra con <i>S. aureus</i>	
y <i>P. aeruginosa</i> en medio de cultivo líquido.	77
Tabla 7.2. Rugosidad superficial promedio (RMS) de PP, PP/nAg 5 % y	
PP/nCu 5% antes y después del tratamiento con plasma.	90
Tabla 7.3. Fracción atómica elemental obtenida a partir de los espectros	
generales de XPS de PP, PP/nAg y PP/nCu al 5 % antes y después del	
tratamiento con plasma.	95
Tabla 7.4. Valores de ángulo de contacto de PP, PP/nAg 5 % y PP/nCu 5 %	
antes y después del tratamiento con plasma.	98



ABREVIATURAS

ADN Ácido desoxirribonucleico

ADNg ADN genómico
ADNp ADN plasmídico

ATCC American Type Culture Collection
CMB Concentración mínima bactericida
CMI Concentración mínima inhibitoria

FabA Biosensor que responde en respuesta al daño a membrana celular

FCC Estructura cúbica centrada en las caras

IP Ioduro de propidioiPP Polipropileno isotáctico

KatG Biosensor que responde en respuesta al daño por estrés oxidativo

LB Medio Luria Bertani
 LD₅₀ Dosis letal media
 MH Medio Mueller Hinton

nAg Nanopartículas de platanCu Nanopartículas de cobre

NPs Nanopartículas

p/p Porcentaje en peso/peso

PBS Solución amortiguadora de fosfatos PCR Reacción en cadena de la polimerasa

PP Polipropileno

PP/nAg Nanocompuestos de polipropileno con nanopartículas de plata PP/nCu Nanocompuestos de polipropileno con nanopartículas de cobre

Ra Medida de rugosidad superficial

RAPDs Amplificación al azar de ADN polimórfico **RecA** Biosensor que responde ante el daño al ADN

RMS Medida de la media cuadrática superficial asociada con la rugosidad de

un material

ROS Especies reactivas de oxígeno Sccm Medida estándar de flujo de gases

SDS Docecil sulfato de sodio
SPR Surface Plasmon Resonance
Tm Temperatura de fusión

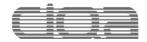
UFC/mL Unidades formadoras de colonias por mililitro



1. RESUMEN

El presente trabajo describe la preparación y caracterización de nanocompuestos de polipropileno con nanopartículas (NPs) de plata y cobre, el tratamiento de erosión superficial con plasma, su efecto antimicrobiano y el análisis de los procesos de interacción con células bacterianas. Para tal efecto, se determinó la actividad antibacteriana de nanopartículas de plata (nAg) y de cobre (nCu) contra las bacterias patógenas *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Las nAg y nCu con actividad antibacteriana, se incorporaron en una matriz de polipropileno en diferentes concentraciones mediante el mezclado en fundido asistido por ultrasonido, en donde se obtuvieron nanocompuestos con alto grado de dispersión. Los nanocompuestos fueron sometidos a tratamiento de erosión a partir de plasma de argón, en donde se determinó que el plasma produce la ruptura de cadenas poliméricas en la superficie del compuesto, incrementando la exposición de las NPs y la polaridad superficial por la inserción de oxígeno y nitrógeno. La exposición superficial de las NPs en los nanocompuestos se vio reflejada en un aumento significativo de la actividad antibacteriana al interactuar con P. aeruginosa y S. aureus. La actividad fue mayor con nCu e incrementada por la exposición con el tratamiento de plasma, dependiente de la concentración y el tiempo de interacción. Finalmente, se abordó el estudio del mecanismo antimicrobiano de NPs metálicas sobre bacterias en etapas iniciales de interacción (mecanismo primario) mediante el uso de biosensores bacterianos y en etapas tardías (mecanismo secundario) analizando biomoléculas. Se analizó el daño en la pared celular, alteraciones en la membrana y daño al material genético, en donde se encontró que la presencia de NPs afecta la estructura celular produciendo la ruptura de membrana, por lo que se afectan las funciones vitales de las bacterias que conllevan a la muerte celular. Aunque la bacteria responde en etapas tempranas al daño en sus proteínas, ácidos nucleicos y ante el estrés oxidativo generado por nAg y nCu, el daño irreversible ocurre como una consecuencia del daño en su estructura celular. Bajo este criterio, se propuso el comportamiento antimicrobiano de nanocompuestos poliméricos erosionados con plasma.



2. INTRODUCCIÓN

La propagación de enfermedades infecciosas producidas por microorganismos se ha convertido en uno de los problemas más graves de salud pública a nivel mundial¹, lo que ha desencadenado el interés científico e industrial en el desarrollo de alternativas efectivas que contribuyan a la disminución de patógenos en el medio ambiente. Uno de los sitios de mayor riesgo para contraer una infección por microorganismos es dentro de un hospital, puesto que la susceptibilidad de los pacientes se incrementa por la exposición constante de agentes infecciosos, los cuales generalmente son resistentes frente a antibióticos convencionales². De acuerdo con el Centro de Control de Enfermedades de los Estados Unidos y la Organización Mundial de la Salud, una infección intrahospitalaria (IIH) se define como la infección adquirida por pacientes dentro de un recinto de atención a la salud, la cual se encuentra ajena al motivo inicial de ingreso³⁻⁴. Actualmente, entre un 5 y 10 % de los pacientes que ingresan al hospital adquieren una IIH, de los cuales el 5 % fallecen por la misma causa, ocasionada principalmente por microorganismos tales como S. aureus⁵, P. aeruginosa⁶, K. pneumoniae, entre otros⁷. De acuerdo a lo anterior, es importante el diseño de nuevas estrategias que prevengan el crecimiento y la propagación de patógenos a partir del desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos.

El uso de NPs y su incorporación a matrices poliméricas ha permitido el desarrollo de nanomateriales funcionales que poseen un incremento significativo en sus propiedades físico-químicas en comparación con el polímero sin carga. En particular, se ha reportado que NPs metálicas tales como Ag, Cu, Au, TiO2⁸⁻⁹, entre otras, poseen la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias y hongos, por lo que actualmente son consideradas como la nueva generación de agentes antimicrobianos¹⁰. Con el objetivo de maximizar las características antimicrobianas de NPs en una matriz polimérica, éstas pueden ser depositadas en la superficie o incorporadas dentro del material durante su procesamiento. En particular, dentro de los principales métodos de preparación de nanocompuestos antimicrobianos se encuentran el espreado¹¹, la deposición por plasma¹² y deposición en capas¹³, en donde únicamente se presenta la adhesión física entre ambos componentes y las partículas se pueden desprender con facilidad, por lo que el efecto antimicrobiano puede verse afectado. Para evitar este



problema, se ha implementado la preparación de nanomateriales a partir del mezclado en fundido, ya que las NPs quedan incorporadas dentro del material durante su procesamiento, lo que disminuye su difusión al exterior¹⁴. En el caso de nanocompuestos antimicrobianos, se ha observado que además de la dispersión uniforme de las NPs en el polímero, se requiere que estas queden expuestas en la superficie, ya que se promueve el contacto directo con microorganismos y, por lo tanto, se incrementa de manera significativa el efecto antimicrobiano¹⁵⁻¹⁶.

Recientemente, el tratamiento superficial por plasma ha sido considerado como una herramienta bastante atractiva puesto que incrementa la exposición superficial de NPs¹⁷, lo que permite la modificación superficial del material sin alterar sus propiedades en masa. Este mismo concepto puede ser aplicado en el desarrollo de nanomateriales antimicrobianos, ya que el tratamiento superficial por plasma incrementa la exposición de NPs y en consecuencia, su efecto antimicrobiano se ve favorecido.

Más allá de la inhibición de crecimiento antimicrobiano que producen este tipo de nanomateriales y el incremento de su efecto bactericida por efecto del plasma, se encuentran todos los procesos celulares involucrados en la interacción de bacterias patógenas y NPs metálicas, que permitan comprender como se lleva a cabo el mecanismo de actividad antimicrobiana y su extrapolación en el efecto bactericida de nanocompuestos poliméricos. De acuerdo a lo anterior, el conocer los fenómenos involucrados en el proceso antimicrobiano permitirá analizar los posibles efectos tóxicos de nanomateriales al contacto con células humanas o el medio ambiente.

El presente trabajo propone el estudio de los principales procesos de interacción celular de bacterias patógenas con nanocompuestos poliméricos formulados con nanopartículas de plata (nAg) y de cobre (nCu) en una matriz de polipropileno a partir del mezclado en fundido asistido con ultrasonido y su erosión superficial mediante plasma de argón. El estudio comprende el análisis antimicrobiano de las NPs previo a su incorporación al polímero, la



preparación de los nanocompuestos en diferentes concentraciones, el efecto del plasma sobre su activación superficial y la evaluación antimicrobiana de los nanocompuestos sometidos a tratamiento. Finalmente, se aborda el diseño de una estrategia para el estudio de las interacciones entre bacterias y NPs en función del daño a la estructura celular, al material genético y a proteínas totales, con el objetivo de determinar el mecanismo antimicrobiano de las NPs metálicas y su efecto en la formulación de nanocompuestos poliméricos.



3. ANTECEDENTES

3.1. Nanopartículas Metálicas

El término nanopartículas (NPs) denomina a partículas en donde por lo menos una de sus dimensiones se encuentra entre 1 y 100 nanómetros¹⁸. Recientemente, su síntesis y caracterización ha sido de gran interés científico e industrial puesto que se caracterizan por el aumento exponencial de su área en comparación con su volumen, lo que repercute en la mejora de sus propiedades mecánicas, térmicas, ópticas y eléctricas, entre otras, en comparación con materiales micrométricos. En particular, la introducción de cargas nanométricas en matrices poliméricas ha propiciado el perfeccionamiento de los materiales dado a que las propiedades de las partículas se transfieren al polímero, mejorando de forma considerable sus características físico-químicas¹⁹⁻²⁰. Existe una gran variedad de NPs dentro de las cuales destacan los nanotubos de carbono, nanofibras, nanoarcillas, nanoalambres, entre otros; además de NPs metálicas tales como plata, oro, cobre, titanio, zinc, y sus óxidos metálicos correspondientes en escala nanométrica, en donde sus características particulares dependen principalmente de su tamaño, forma, geometría y superficie²¹.

Aunado al interés en sus características físico-químicas, en el caso particular de las NPs metálicas tales como plata y cobre, se ha reportado que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos, produciendo un efecto biocida^{22,23,24,25}. De acuerdo a lo anterior, la capacidad antimicrobiana de NPs metálicas sobre patógenos como bacterias, virus y hongos los convierte en potenciales antimicrobianos, por lo que recientemente han sido considerados como la nueva generación de agentes antimicrobianos¹⁰.



3.1.1. Nanopartículas de Plata (nAg)

El uso de la plata como agente preventivo para la propagación de infecciones no es reciente, puesto que existen reportes que mencionan su uso para la potabilización del agua y el tratamiento de quemaduras y ulceraciones en civilizaciones antiguas ²⁶. Actualmente se ha determinado que la plata a escala nanométrica tiene la capacidad de interactuar con microorganismos ya que su amplia área de superficie favorece la adhesión y el contacto directo con patógenos produciendo alteraciones irreversibles, lo que da como resultado la inhibición de su crecimiento y su lisis¹⁰.

3.1.1.1. Síntesis de nAg

Los métodos para la síntesis de nAg se basan principalmente en la reducción química de una sal de plata (AgNO₃) en presencia de un agente reductor (NaBH₄ o etilenglicol) y un estabilizante (PVP). En este caso, el método de reducción química resulta uno de los procesos más viables para la síntesis de nAg ya que dentro de las ventajas que posee se encuentra un control adecuado del tamaño de partícula, un rendimiento superior al 70 %, evita la aglomeración de las NPs por la presencia del agente estabilizante y bajo costo de preparación²⁷. La reacción química general del proceso de síntesis de nAg se muestra a continuación²⁸:

$$Ag^{+} + BH_{4}^{-} + 3H_{2}O \rightarrow Ag^{0} + B(OH)_{3} + 3.5 H_{2}$$

Otros de los procesos reportados para la síntesis de nAg son el método del poliol²⁹, radiolíticos³⁰, sonoquímicos³¹ y otras rutas alternativas como el uso de sustratos orgánicos³², microorganismos³³, microondas³⁴, entre otros.



3.1.1.2. Estructura de nAg

Las nAg presentan una estructura cristalina que se caracteriza por cuatro picos localizados en los ángulos 38.00, 44.42, 64.21 y 77.48 de 20 y que corresponden a los planos cristalinos (111), (200), (220) y (311) respectivamente, los cuales son característicos de una estructura cúbica centrada en las caras (FCC). El patrón de difracción característico de las nAg se presenta en la **Figura 3.1**.

La morfología de las nAg se encuentra directamente relacionada con el método de obtención. Generalmente, el método de reducción química, la relación molar entre el agente reductor y la sal de plata juegan un papel importante, ya que define la estructura final de las NPs. Sun y col.³⁵ mencionan que la síntesis de nAg a partir de AgNO₃ con diferentes concentraciones de etilenglicol y PVP, varía dependiendo de la concentración molar del agente estabilizador.

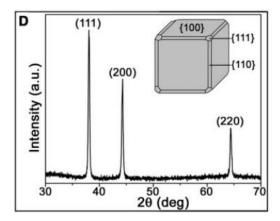


Figura 3.1. Patrón de difracción de rayos-X que demuestra la estructura FCC característica de las nAg³⁵.



3.1.1.3. Propiedades Físico-Químicas de nAg

Algunas de las propiedades más importantes que presentan las nAg son la conductividad térmica³⁶, su alta resistencia a la oxidación³⁷ y alta capacidad catalítica puesto que interfiere de manera positiva en procesos de reducción³⁸. En particular, la propiedad más importante de las nAg es su capacidad antibacteriana y antifúngica.

3.1.1.4. Propiedades Ópticas de nAg

Una de las características más importantes de las NPs metálicas es su capacidad de absorber la luz ultravioleta. Al emitir radiación UV sobre la superficie de las NPs se produce una oscilación colectiva de electrones, lo cual se denomina resonancia de plasmón (SPR) y se produce por la excitación de los electrones de la superficie del metal. Esta oscilación es característica de cada partícula y varía de acuerdo al tamaño y la morfología de las NPs, produciendo la absorción UV a una longitud de onda específica³⁹. Tanto la plata elemental (Ag⁰) como en su estado ionizado (Ag⁺) tienen la peculiaridad de absorber la luz UV a diferentes longitudes de onda. Las nAg presentan un pico máximo de absorción UV alrededor de los 400 nm, mientras que la plata iónica presenta un pico máximo de absorción entre los 250 y 300 nm.

3.1.1.5. Actividad Antimicrobiana de nAg

A pesar de que ya se conocía el efecto antimicrobiano de las sales de plata desde la antigüedad y los efectos toxicológicos de la plata en su estado ionizado, el estudio de la actividad antimicrobiana de la plata nanométrica es reciente (**Tabla 3.1**). Diversos autores mencionan que las nAg tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos tales como bacterias y hongos, ya que debido a su tamaño se incrementa de forma exponencial su interacción con la superficie de microorganismos, produciendo alteraciones importantes en su morfología y funcionamiento celular, dando como resultado su muerte en un tiempo corto de interacción⁴⁰.



Tabla 3.1. Actividad antimicrobiana de nAg.

Morfología	Tamaño	Microorganismos	Análisis/Resultados	Referencia
Esférica Triangular Alambres	39 nm 133 nm	E. coli	Evaluación en medio líquido y en placa. La morfología es determinante en la interacción con bacterias.	Pal. y col. 2007 ⁴¹
Esférica	12 nm	E. coli	Siembra en placa 50-60 µg/mL inhiben el 100 % del crecimiento.	Sondi y Salopek- Sondi, 2004 ⁸
Esférica	12 nm	E. coli S. aureus Levaduras	Siembra en placa CMI Levadura 0.3102 µg/mL E. coli 0.1551 µg/mL S. aureus 1.551 µg/mL	Kim y col. 2007 ⁴⁰
Esférica	3 nm	E. coli S. aureus B. subtilis	Diámetro de inhibición por difusión en agar CMI/CMB E. coli 40/60 μg/mL S. aureus 120/160 μg/mL B. subtilis 40/60 μg/mL	Ruparelia y col. 2008 ²³
Esférica	25 nm	E. coli S. aureus P. aeruginosa	Evaluación por micro dilución y cuenta en placa CMI S. aureus 6.75 µg/mL E. coli 27.0 µg/mL P aeruginosa 27.0 µg/mL	Panacek y col. 2006 ⁴²
Esférica	60-110 nm	E. coli	Diámetro de inhibición por difusión en agar Máxima inhibición en 50 μg/mL	Chitra y Annadurai, 2014 ⁴³



3.1.1.6. Toxicidad de nAg

El uso de NPs y su incorporación en artículos de uso diario cada día es más cotidiano, ya que las podemos encontrar dentro de prendas textiles, contenedores de alimentos, antitranspirantes, entre otros. Esto ha sido un punto de debate a nivel científico y tecnológico puesto que es poco lo que se conoce de sus posibles efectos adversos o tóxicos al poner en contacto directo nAg con el cuerpo humano. Hasta el momento se sabe que los iones de plata tienen la capacidad de interactuar con la superficie de los microorganismos formando complejos que producen la ruptura de la pared celular bacteriana, pero no se conocen los posibles efectos tóxicos de la ingesta o penetración de NPs en células humanas.

Para determinar los efectos tóxicos de la presencia de nAg se han realizado diversos estudios. Asharani y col. 44 reportaron el efecto del deterioro de fibroblastos de pulmón y de células tumorales del sistema nervioso central al introducir diferentes cantidades de nAg, en donde se encontró una dependencia directa entre la concentración de NPs y la sobrevivencia de los mismos. Aunado a esto, encontraron que las NPs se pueden albergar en sitios específicos de las células humanas, en donde se efectuó el estudio comparativo entre iones y NPs, siendo las NPs las que desarrollaron efectos tóxicos superiores en comparación con la misma concentración de iones dentro de las células. Cabe resaltar que el efecto citotóxico de las NPs está directamente relacionado con el tamaño de partícula 45-46, puesto que a menor tamaño de partícula se incrementa su penetración al interior de la célula e interfiere con procesos celulares, alterando su funcionamiento y en consecuencia el daño irreversible.

De acuerdo a lo anterior, es importante conocer cómo se llevan a cabos los procesos de interacción entre NPs y microorganismos, con el objetivo de conocer su mecanismo de acción y así poder controlar la exposición ambiental de las partículas y sus posibles efectos tóxicos en el medio ambiente y en la salud.



3.1.1.7. Aplicaciones de nAg

Existe un gran número de aplicaciones de las nAg, principalmente relacionadas con sus características antimicrobianas. Dentro de sus aplicaciones más importantes destacan la incorporación de partículas en sustratos textiles para la fabricación de vestimenta de uso hospitalario y prendas de vestir. Otra de sus aplicaciones más importantes es su incorporación en matrices poliméricas para la fabricación de recipientes antimicrobianos y la conservación de alimentos, la fabricación de recubrimientos antimicrobianos, entro otros.

El área de mayor interés para el uso y aplicación de nAg es la relacionada con la salud y el cuidado humano. Dentro de las aplicaciones más prometedoras se encuentran la incorporación de nAg en filtros del aire y de agua que tengan la capacidad de disminuir la carga bacteriana en el medio ambiente, además de su incorporación en polímeros de uso biomédico que funcionen como dispositivos capaces de evitar y prevenir el crecimiento de patógenos. Una de las aplicaciones de mayor interés es su uso como agentes antimicrobianos en recubrimientos, instrumentación quirúrgica, y equipo hospitalario, ya que actualmente las instalaciones hospitalarias se consideran como un foco de infección importante para la propagación y contagio de microorganismos patógenos^{47,48}.

3.1.2. Nanopartículas de Cobre (nCu)

Las nCu recientemente han atraído el interés científico e industrial puesto que presentan importantes propiedades físico-químicas similares a las nAg, con la ventaja de que su costo es mucho menor. Esta característica ha permitido que actualmente se produzca una cantidad importante de NPs a nivel industrial y que sean consideradas para su incorporación en materiales poliméricos. Además de poseer importantes propiedades térmicas, ópticas, eléctricas, entre otras, tienen la capacidad de fungir como agentes antimicrobianos, puesto que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos²², además de presentar un alto potencial químico, que permite la liberación de electrones de su superficie y que se puedan adherir a la pared celular bacteriana, ocasionando daños irreversibles en la morfología celular⁴⁹.



3.1.2.1. Síntesis de nCu

El método más reportado de síntesis de nCu es a partir de la reducción química de una sal de cobre en presencia de un catalizador, el cual se basa en la reducción de los iones metálicos por la inducción de un catalizador en un medio líquido⁵⁰. Algunos de los precursores más empleados para que se lleve a cabo este proceso son el sulfato de cobre (CuSO₄) y el acetato de cobre (Cu (CH₃COO)₂), mientras que los catalizadores comúnmente utilizados son la hidrazina (N₂H₄) y el borohidruro de sodio (NaBH₄). En la mayoría de los casos, dada la capacidad de oxidación del cobre se recomienda el uso de un agente estabilizante, que por lo general es la polivinilpirrolidona (PVP). Una de las características más importantes del cobre es que poseen un bajo potencial redox de Cu⁰/Cu²⁺, por lo que tienden a fungir tanto como electrodonador como electroaceptor, lo que facilita la producción de nCu y en consecuencia no se requiere un control exhaustivo de parámetros tales como temperatura, presión, y pH⁵¹. La reacción general del proceso de reducción de un metal se esquematiza de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$mOx^{n+} + Red \rightarrow mOx^{0} + Red^{mn+}$$

Para que ocurra el proceso de reducción se requiere que el potencial redox del metal sea más negativo que el potencial de oxidación.

Bajo este concepto, la morfología que se puede obtener de las nCu es por lo general esférica, aunque diversos autores han reportado que dependiendo de las condiciones de síntesis y la relación estequiométrica de sus reactivos se pueden obtener formas irregulares, cúbicas, triangulares, hexagonales, tetrahédricas e incluso alambres, con un diámetro promedio de partícula de entre 5 y 10 nm⁵². Otros procesos que involucran la síntesis de nCu son la reducción térmica y reducción sonoquímica⁵³, el uso de polioles²², y procesos de microemulsión⁵⁴.



3.1.2.2. Estructura de nCu

La estructura que comúnmente presentan las nCu es cúbica centrada en las caras. Mediante difracción de rayos-X se encuentran tres picos principales localizados en los ángulos 43.60, 50.70 y 74.60 de 2θ, que corresponden a los planos cristalinos (111), (200) y (220), de acuerdo con lo presentado en la **Figura 3.2**.

3.1.2.3. Propiedades Físico-Químicas de nCu

Dentro de las propiedades más destacadas que presentan las nCu se encuentran su alta conducción de calor⁵⁵, su conductividad eléctrica⁵⁶, además de presentar efecto catalítico significativo en las reacciones de acoplamiento de haluros de arilo (reacción de Ullmann)⁵⁷ ya que las nCu tienen la capacidad de desprender sus electrones con facilidad, lo que induce a reacciones de oxidación y acoplamiento.

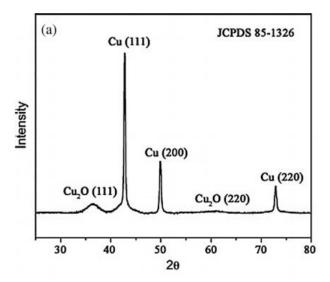


Figura 3.2. Patrón de difracción de rayos-X que demuestra la FCC característica de las nCu⁵⁸.



3.1.2.4. Propiedades Ópticas de nCu

Al igual que las NPs metálicas de oro y plata, las nCu también presentan la capacidad de excitación electrónica en la interacción con la luz UV, en donde se presenta un pico máximo de absorción entre 550 y 650 nm, el cual varía dependiendo de su estado parcial de oxidación, de la morfología de las NPs y de la presencia de recubrimientos orgánicos sobre su superficie⁵⁹.

3.1.2.5. Actividad Antimicrobiana de nCu

Se ha reportado que las nCu y sus óxidos (CuO y Cu₂O) presentan la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos, por lo cual han sido considerados como agentes antimicrobianos potenciales⁶⁰. Una de las principales características de las nCu es que presentan alta actividad antimicrobiana y que la liberación de sus iones se efectúa a largo plazo, por lo que el efecto permanece constante en comparación con agentes antimicrobianos convencionales. Estas características pueden ser transferidas al incorporar las NPs en una matriz polimérica, y por lo tanto, adquirir el efecto bactericida deseado. En la **Tabla 3.2** se presentan los reportes más relevantes de actividad antimicrobiana de nCu.



Tabla 3.2. Actividad antimicrobiana de nCu.

Nanopartícula	Tamaño	Microorganismo	Análisis/Resultados	Referencia
Cu y CuO	25-90 nm	S. aureus E. coli P. aeruginosa	Evaluación en medio líquido CMB S. aureus 2500 μg/mL E. coli 250 μg/mL P. aeruginosa 5000 μg/mL	Ren y col. 2008 ⁶¹
Cu y CuO	9 nm	E.coli S. aureus B.subtilis	Determinación de actividad a partir de diámetro de inhibición por difusión en agar. CMI/CMB E. coli 140/160 μg/mL S. aureus 140/160 μg/mL B. subtilis 20/40 μg/mL	Ruparelia y col. 2007 ²³
Cu	12 nm	E. coli	Evaluación de actividad antibacteriana en líquido y cuenta en placa. 60 µg/mL inhibe el 100 % del crecimiento bacteriano.	Raffi y col. 2010 ⁶²
Cu	5 nm	E. coli S. aureus C. albicans	Viabilidad celular después de 2 horas de contacto con NPs. 32 μg/mL inhiben el 99.9 % del crecimiento bacteriano.	Bogdanovic y col. 2014 ⁶³
Cu	4-8 nm	S. aureus P.aeruginosa	Determinación de actividad en medio líquido y cuenta en placa CMB S. aureus 1600 µg/mL P. aeruginosa 800 µg/mL	Betancourt- Galindo y col. 2014 ⁶⁴



3.1.2.6. Toxicidad de nCu

Los posibles efectos nocivos para la salud por la presencia o el contacto con nCu es uno de los tópicos que actualmente han sido abordados por parte de la comunidad científica y el gobierno federal. Para ello, se ha desarrollado el estudio de la nanotoxicología, que involucra el análisis de la interacción de nanomateriales con el cuerpo humano y sus posibles efectos nocivos. Estudios recientes demuestran que las NPs se introducen dentro del cuerpo humano principalmente por el tracto respiratorio y el tracto gastrointestinal, además de que actualmente se ha detectado la presencia de NPs en agua, alimentos, cosméticos, fármacos, entre otros⁶⁵.

De acuerdo a lo anterior, al igual que otros nanomateriales, las nCu también son objeto de estudio, ya que pueden dispersarse en el medio ambiente e introducirse dentro del cuerpo humano a través del contacto directo o mediante la interacción con materiales formulados con cargas nanométricas. En el caso particular del cobre, es común tener trazas metálicas en bajas concentraciones dentro de nuestro organismo, ya que regulan el proceso de homeostasis. Cuando se sobrepasan estos niveles, altas concentraciones de cobre pueden ocasionar efectos tóxicos importantes, como ictericia, hemólisis y en casos severos, la muerte del paciente. Chen y col.⁶⁶ determinaron el efecto toxicológico de nCu y su comparación con iones de cobre y partículas de tamaño micrométrico en ratones, en donde obtuvieron la dosis letal media (LD₅₀). Encontraron que las NPs al igual que los iones de cobre presentan una toxicidad moderada (nivel 3) y que las NPs se localizan principalmente dentro de órganos tales como riñón, hígado y bazo.

3.1.2.7. Aplicaciones de nCu

La capacidad de conducción de las nCu influye en su aplicación en el diseño de biosensores, circuitos electrónicos y recientemente se ha explorado su uso en el diseño de tintas de impresión con capacidad de conducción eléctrica. Existen potenciales aplicaciones de las nCu en el área de la medicina y el cuidado de la salud, ya que su incorporación a matrices



poliméricas permite el diseño de nanomateriales antimicrobianos de alto valor agregado capaces de ser utilizados en ambientes altamente contaminados.



3.2.Polipropileno (PP)

El polipropileno (PP) se define como un polímero termoplástico perteneciente al grupo de las poliolefinas que se obtiene mediante la polimerización del propileno y que se caracteriza por ser uno de los polímeros más importantes a nivel mundial ya que presenta altas propiedades físico-mecánicas y estabilidad térmica en relación a su bajo costo, por lo que es considerado como uno de los candidatos ideales para su aplicación en la industria automotriz, alimentaria, en el área médica y en áreas relacionadas con el cuidado de la salud⁶⁷. En la **Figura 3.3** se presenta la estructura general del PP.

3.2.1. Síntesis del PP

La síntesis del PP a nivel industrial, se lleva a cabo principalmente mediante la polimerización por adición a partir del uso de catalizadores de óxidos metálicos, Ziegler-Natta y metalocenos. El uso de un catalizador dentro del sistema de reacción se considera predeterminante en el control del peso molecular y el arreglo estructural final del polímero. Para llevar a cabo la síntesis del PP isotáctico (iPP) comúnmente se utilizan metalocenos, ya que su geometría permite controlar con precisión la regularidad estructural y el peso molecular⁶⁸. A nivel industrial, existen tres procesos importantes para llevar a cabo la síntesis del iPP, los cuales varían dependiendo de las condiciones de reacción.

Figura 3.3. Estructura general del PP.



El proceso en solución se basa en la presencia de un disolvente a base de hidrocarburos depositados en un reactor en el cual la temperatura es superior a la temperatura de fusión (Tm) del polímero⁶⁹. Dado el alto gasto energético que presenta este proceso, actualmente es considerado poco factible en cuanto a la relación de costo/beneficio del producto final. Otro proceso que es empleado para la síntesis de iPP es a partir del proceso en suspensión, el cual involucra la presencia de un hidrocarburo insoluble y que la temperatura del reactor sea inferior a la Tm del producto final⁷⁰. La variación entre amos procesos radica en la presión de trabajo, puesto que el proceso en suspensión requiere un reactor con alta presión interna, incrementando el rendimiento de reacción del producto final y por lo tanto, el peso molecular. Finalmente, el proceso en fase gas no requiere la presencia de solventes orgánicos, únicamente de etileno. Actualmente es uno de los procesos más empleados debido a que la presencia de etileno facilita el control de la producción de homopolímeros y copolímeros con un rendimiento efectivo de reacción⁷¹.

3.2.2. Estructura del PP

El PP presenta la característica de que sus grupos metilo (-CH₃) presentes en su cadena principal se pueden orientar, modificando las propiedades físicas del polímero. Lo anterior se conoce como tacticidad y de acuerdo con esta configuración se presentan tres arreglos diferentes: el polipropileno isotáctico (iPP) presenta la forma más ordenada, ya que los grupos metilo se encuentra localizados en un solo lado de la cadena principal; el polipropileno sindiotáctico, el cual se caracteriza por presentar de manera alternada los grupos metilo en la cadena principal. Finalmente, existe una tercera configuración denominada polipropileno atáctico, que presenta una configuración al azar de sus grupos metilos, convirtiéndose en la forma menos ordenada del polipropileno. Las diferentes configuraciones que se presentan en el PP se muestran en la **Figura 3.4**.



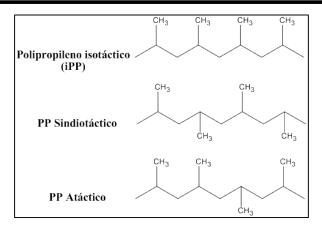


Figura 3.4. Diferentes arreglos estructurales del PP.

La morfología del PP está relacionada directamente con el peso molecular y la tacticidad del polímero, los cuales en conjunto establecen su estructura cristalina, los parámetros de celda unitaria y su comportamiento a la cristalización. El iPP presenta regiones cristalinas y amorfas, en donde la parte amorfa tiene la capacidad de cristalizar bajo la inducción de las condiciones de procesamiento⁶⁷. El grado de cristalización y el tamaño de las esferulitas son los encargados de determinar la temperatura de fusión, además de que el grado de ordenamiento induce la formación de estructuras polimórficas.

Existen tres fases cristalinas del PP, las cuales se denominan α , β y γ . La fase cristalina α o también conocida como monoclínica es la forma más estable del PP y presenta una temperatura de fusión promedio de 160 °C, mientras que la fase menos estable, conocida como la fase β o hexagonal presenta una temperatura de fusión de 145 °C⁷². En la **Figura 3.5** se presenta el patrón de difracción WAXD característico de la estructura α -monoclínica del iPP.



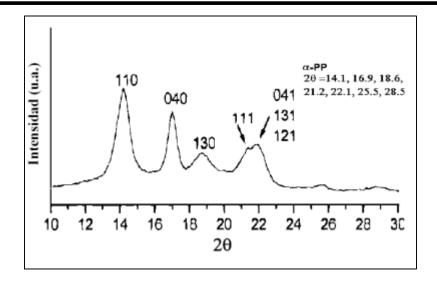


Figura 3.5. Difractograma WAXD de la fase α -monoclínica del iPP⁷³.

3.2.3. Propiedades del PP

A nivel industrial, el iPP es el polímero más importante ya que su ordenamiento estructural le confiere alta cristalinidad, lo cual se ve reflejado en el incremento de sus propiedades físico-mecánicas, de las cuales destacan su alta resistencia al impacto, baja densidad, alta resistencia química y térmica, además de un bajo coeficiente de absorción de humedad.

Las propiedades físico-químicas de PP están determinadas por la tacticidad, la cristalinidad y el peso molecular del polímero. De acuerdo a lo anterior, dentro de las propiedades más relevantes destacan el módulo de flexión en 1172 MPa, módulo de tensión de 1032 MPa y una resistencia al impacto de $0.5~\rm lb$ -ft/in². En cuanto a sus propiedades térmicas, la temperatura de fusión de equilibrio promedio se encuentra en $187~\rm ^{\circ}C$, presenta una temperatura de transición vítrea de $-10~\rm ^{\circ}C$ y una temperatura Vícat de entre $135-155~\rm ^{\circ}C$. Dada su naturaleza química, el polipropileno se considera aislante, por lo que posee una resistividad volumétrica de 10^{6} - $10^{7}~\rm \Omega$ -cm y una constante dieléctrica de 2.2- $2.3~\rm a~1~kHz^{74}$.



3.2.4. Aplicaciones del PP

Debido a que el polipropileno es considerado como uno de los polímeros más utilizados a nivel mundial, existe una gran cantidad de aplicaciones en las que se puede desarrollar. Algunas de sus aplicaciones se encuentran relacionadas con la fabricación de piezas automotrices. Dentro de la industria alimenticia se puede encontrar su uso en recipientes, contenedores y empaques de alimentos. En enseres domésticos lo podemos encontrar en juguetes, muebles, artículos del hogar.

Una de las áreas más prometedoras para la aplicación de este tipo de materiales se encuentra dentro del campo de la medicina, salud y cuidado humano, principalmente en aplicaciones relacionadas con la fabricación de hilos de sutura, recipientes para sueros, contenedores de aire, vestimenta médica, entre otros. En estudios recientes se ha demostrado que la incorporación de polipropileno en conjunto con otras resinas poliméricas da como resultado la producción de polímeros biocompatibles capaces de interactuar directamente con el cuerpo humano sin ocasionar daño o toxicidad⁷⁵. Otra de las áreas prometedoras para la aplicación del polipropileno se encuentra enfocada a la fabricación de instrumentación y objetos de uso biomédico capaces de soportar procesos de esterilización⁷⁶.



3.3. Nanocompuestos Poliméricos

Un nanocompuesto polimérico se define como el compuesto conformado por dos o más materiales de naturaleza distinta, en donde existe una parte orgánica conformada por la matriz polimérica y una parte inorgánica, compuesta principalmente por cargas de tamaño nanométrico. La incorporación de cargas nanométricas en polímeros ha presentado un gran interés científico y tecnológico puesto que la presencia de NPs incrementa de manera significativa las propiedades del polímero, en particular sus características físico-mecánicas⁷⁷⁻⁷⁸, térmicas⁷⁹, eléctricas⁸⁰ y dependiendo del tipo de nanopartícula, sus propiedades antibacterianas/antifúngicas⁸¹⁻⁸². Este fenómeno se debe a que la carga nanométrica presenta un incremento exponencial de su área de contacto en comparación a su volumen, por lo que se maximiza su adhesión con la fase continua, lo cual se ve reflejado en el aumento de sus características finales.

A diferencia de un polímero formulado con cargas micrométricas, un nanocompuesto posee varias ventajas, dentro de las cuales destacan su facilidad de procesamiento, su bajo coeficiente de expansión térmica, su alta resistencia al hinchamiento y alta permeabilidad a gases, la preservación de sus características intrínsecas y en el caso particular de nanocompuestos con aplicaciones biomédicas su baja toxicidad; tomando en cuenta que el porcentaje de carga añadido es mucho menor en comparación con la adición de aditivos comunes. Los requisitos fundamentales para la obtención de nanocompuestos funcionales son que las NPs presenten alto grado de dispersión dentro de la matriz polimérica y que se favorezca la interacción entre ambas fases.

3.3.1. Preparación de Nanocompuestos Poliméricos

La interfase de un nanocompuesto polimérico es la clave para la obtención de nanomateriales funcionales con alto grado de dispersión. Para llegar a ello, existen diversos procesos de preparación de nanocompuestos, los cuales se mencionan a continuación:



3.3.1.1. Mezclado en Solución

Mediante este proceso de preparación, se requiere que el polímero se encuentre previamente disuelto en un solvente afín, para posteriormente incorporar las NPs dispersadas. La dispersión puede llevarse a cabo mediante el uso de ondas de ultrasonido, ya que favorece la ruptura de aglomerados e incrementa la dispersión uniforme de las NPs dentro del polímero, manteniendo su tamaño nanométrico. La desventaja de este proceso radica en la presencia de solventes orgánicos, puesto que después de la dispersión de las NPs y su incorporación al polímero, se realiza la extracción del solvente mediante calor, lo que puede producir la degradación del material además de favorecer el fenómeno de re-aglomeración de las partículas⁸³.

3.3.1.2. Mezclado en Fundido

La preparación de nanocompuestos mediante el mezclado en fundido se considera como uno de los procesos más sencillos de preparación de nanocompuestos poliméricos. Para tal efecto, se realiza la dispersión mecánica de las NPs dentro de un extrusor, en el entendido de que el polímero se encuentra fundido, lo que asegura el mezclado homogéneo entre el polímero y la carga nanométrica mediante esfuerzos de corte. Los esfuerzos de corte producidos por el husillo evitan la formación de aglomerados, por lo que este proceso se adapta con facilidad de acuerdo con las necesidades industriales. Diversos autores han reportado la incorporación de cargas nanométricas en PP y su aplicación dentro del área biomédica, en donde se han obtenido nanocompuestos con alta dispersión y con un incremento significativo en el comportamiento térmico del material⁸⁴⁻⁸⁵.

3.3.1.3. Polimerización in situ

Mediante este proceso, la carga nanométrica es dispersada previamente en los monómeros de partida, para que al llevar a cabo la reacción de polimerización, las NPs queden dispersadas por movimiento mecánico y por lo tanto queden embebidas dentro del polímero. Es un requisito indispensable en este proceso que la carga nanométrica contenga grupos



funcionales en su superficie, que sean afines al polímero, con el objetivo principal de incrementar la interacción entre ambas fases⁸³.

3.3.2. Propiedades de Nanocompuestos Poliméricos

La incorporación de NPs dentro de una matriz polimérica incrementa diversas propiedades físico-mecánicas. Dentro de las propiedades mejoradas por la presencia de NPs se encuentra lo reportado por Sumita y col.⁸⁶, en donde se demostró un incremento significativo en las propiedades elásticas de nanocompuestos de polietileno con NPs de óxido de silicio, obteniendo una relación directa del efecto con la concentración de NPs dentro del sistema, además de que el tamaño de partícula juega un papel importante en el incremento de las propiedades finales del material. Por otro lado, Tjong⁷⁸ demostró que la presencia de cargas nanométricas tales como nanotubos de carbono y nanoarcillas incrementan las propiedades mecánicas de los nanocompuestos formulados en función de su concentración. De las propiedades favorecidas por la presencia de NPs destacan el módulo de Young o módulo de elasticidad longitudinal y el incremento de la temperatura de cristalización.

Una de las características de las NPs metálicas es que tienen la capacidad de almacenar y retener el calor, las cuales son transferidas al polímero durante el procesamiento de nanocompuestos. Este comportamiento se ve directamente reflejado en el incremento de las temperaturas de transición de los nanocompuestos (fusión/cristalización). Diversos autores mencionan que la incorporación de alrededor del 2 % de NPs dentro de una matriz incrementa la temperatura de cristalización en un promedio de hasta 20 °C en comparación con el polímero sin carga, lo que representa un ahorro energético relevante a nivel industrial⁸⁷⁻⁸⁸. Otra de las propiedades incrementadas por la presencia de NPs es la capacidad de conducción que adquiere el nanocompuesto, puesto que el polímero por si solo es aislante. Algunos autores han reportado que la presencia de NPs metálicas incrementa la conductividad y de los nanocompuestos en función de la concentración de NPs dentro del sistema⁸⁹. En el caso de la presencia de nanotubos de carbono, se ha reportado que la incorporación de entre 2 y 4 % p/p de carga en Nylon-6 incrementa las propiedades eléctricas de los nanocompuestos,



obteniendo valores de conductividad localizados en el intervalo de los materiales semiconductores⁹⁰.

3.3.3. Nanocompuestos de PP/nAg

La preparación de nanocompuestos poliméricos empleando nAg recientemente ha sido de gran interés debido a la mejora considerable de la mayoría de las propiedades termomecánicas del material, además del incremento en el efecto antimicrobiano. Dentro de las áreas de investigación más interesadas en el uso de estos nanomateriales es la industria textil, ya que la contaminación ambiental y la presencia de agentes patógenos que pueden estar en contacto con el cuerpo humano y, por lo tanto, ser susceptible a la adquisición de enfermedades infecciosas. En estudios realizados por Yeo y col. ⁸⁵ se menciona el efecto antimicrobiano de nanocompuestos de PP/nAg preparados mediante mezclado en fundido y su posterior preparación en fibras textiles, en donde se demostró que la presencia de NPs inhibe el crecimiento bacteriano en función del tiempo de exposición con las fibras nanoestructuradas. Otros autores mencionan que la presencia de entre 1 y 5 % de nAg en el polímero incrementa de forma significativa su capacidad bactericida al contacto con los nanocompuestos, pero que el efecto antimicrobiano se encuentra directamente reflejado con la dispersión de las NPs y la posible difusión de sus iones al exterior en un tiempo corto ⁹¹⁻⁹².

El efecto antimicrobiano de los nanocompuestos formulados con nAg radica en la liberación de los iones de la superficie de las NPs y su difusión al exterior a través del polímero. Para ellos, diversos autores mencionan que el mecanismo antimicrobiano se produce por la difusión iónica de las NPs en la parte no cristalina del polímero, puesto que la región amorfa del material permite la interacción de líquidos y la liberación de los iones⁹³.



3.3.4. Nanocompuestos de PP/nCu

El actual interés de la formulación de nanocompuestos a partir del uso de nCu radica principalmente en la obtención de altas propiedades físico-químicas además del incremento de sus características antimicrobianas al interactuar con agentes patógenos, con la ventaja de que se puede obtener un producto antimicrobiano a bajo costo en comparación con los formulados con nAg. Aunado a esto, recientemente se ha demostrado que la presencia de nCu en bajas concentraciones (menores a 0.1 % p/p) presentan un efecto antimicrobiano superior comparado con el efecto obtenido en nanocompuestos con nAg¹⁶. Xia y col.⁹⁴ demostraron que la presencia de diferentes concentraciones de nCu en polietileno incrementa la temperatura de cristalización del polímero, favoreciendo el proceso de nucleación heterogénea. Además, se ha reportado que la incorporación de mezclas de nCu y sus óxidos (Cu₂O y CuO) presentan altas propiedades bactericidas, relacionadas con la concentración de partículas en el polímero, su dispersión uniforme y la capacidad de difusión de iones al estar en contacto con microorganismos suspendidos en un medio líquido^{15, 95}.

3.3.5. Aplicaciones de Nanocompuestos Poliméricos

Dentro de las aplicaciones más importantes de las nCu se pueden mencionar la incorporación de cargas nanométricas antimicrobianas para la fabricación de dispositivos médicos, empaque y envase de alimentos que retarden el proceso de descomposición debido a la presencia de microorganismos, material quirúrgico biocida y la fabricación de recubrimientos poliméricos con capacidad antimicrobiana. Otras aplicaciones van enfocadas al diseño y fabricación de dispositivos electrónicos, sensores, circuitos, entre otros.



3.4.Plasma

3.4.1. Generalidades

El plasma se define como un gas parcial o totalmente ionizado por efecto de la energía de excitación de sus átomos, por lo que actualmente es considerado como el cuarto estado de la materia y se produce por el calentamiento de un gas hasta generar la colisión de sus átomos, dando como resultado la formación de especies iónicas altamente reactivas. Estas especies son el resultado de procesos de ionización, fragmentación y excitación de iones positivos y negativos, especies neutras, átomos meta estables y radicales libres⁹⁶. En la **Figura 3.6** se presenta el esquema representativo del plasma.

El plasma puede ser generado a partir de bajas temperaturas y altas temperaturas. Se consideran plasmas de baja temperatura en donde la temperatura de excitación de los átomos de un gas no supera 50 °C, mientras que los plasmas de alta temperatura superan los 500 °C. Uno de los plasmas más comúnmente empleados a nivel científico e industrial es generado a partir de radiofrecuencia, ya que se produce al introducir un gas dentro de una cámara de vacío y por efecto de la incidencia de energía de radiofrecuencia se produce la formación de especies reactivas del gas. La energía promedio del plasma de radiofrecuencia no supera los 50 eV, y es el resultado de la formación de iones (10-30 eV), electrones (0-10 eV) y radiación UV (3-40 eV)⁹⁷.

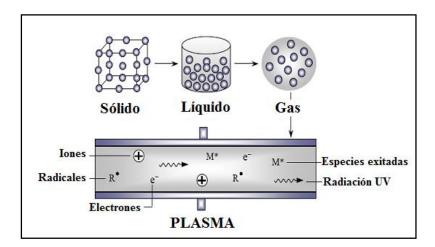


Figura 3.6. Esquema representativo de los cuatro estados de agregación de la materia y las especies formadas en el plasma.



Si se coloca un sustrato dentro de la cámara de vacío (plástico, metal, entre otros) los iones producidos del gas pueden incidir sobre su superficie, causando el desprendimiento o ruptura de moléculas, dando como resultado un cambio en la superficie del material sin alterar sus propiedades en masa. El bombardeo iónico está determinado principalmente por la potencia del plasma, el tipo de gas ionizado y la duración del tratamiento. El tratamiento por plasma para la modificación de superficies se considera relevante puesto que se pueden obtener propiedades de adhesión o cambio en la polaridad superficial⁹⁸, factor importante en los procesos de impresión de tintas.

3.4.2. Modificación de Superficies por Plasma

El objetivo principal de la modificación de superficies mediante el uso de plasma de radiofrecuencia es el cambio en la química de la superficie de un sustrato sin alterar sus características en masa. Esta modificación no debe de ser mayor a 100 nanómetros de profundidad y dentro de las ventajas más importantes de este proceso se encuentra la mejora de la biocompatibilidad de sustratos con el cuerpo humano (en particular con dispositivos médicos), cambio en polaridad (hidrofóbico/hidrofílico), cambio en el índice de refracción, dureza y el cambio en la inercia química en la superficie del material⁹⁹.

El proceso de modificación superficial mediante plasma en el caso de materiales poliméricos, se atribuye a la inserción de especies químicas o entrecruzamiento generado a partir de la ruptura de cadenas en la superficie por el bombardeo iónico. Dentro de los gases más empleados para este proceso se encuentran el oxígeno (O₂), nitrógeno (N₂) hidrógeno (H₂), amoniaco (NH₃) y bióxido de carbono (CO₂); además del uso de gases nobles tales como el helio (He) y el argón (Ar). Los gases inertes se utilizan principalmente para procesos de limpieza, erosión y devastado de superficies, ya que producen especies meta estables de alta energía y radiación UV (alrededor de 11.5 eV) capaces de modificar la superficie¹⁰⁰. Bajo estas condiciones, es posible que el proceso de erosión superficial al bombardear un sustrato polimérico produzca especies reactivas y productos volátiles de degradación por la ruptura de cadenas, capaces de removerse por efecto del vacío presente en el sistema de reacción.



Las especies activas formadas en la superficie sometida a tratamiento son susceptibles al contacto con el medio ambiente, en donde se produce la inserción de átomos de oxígeno, principalmente⁹⁹.

Una manera de cuantificar el grado de erosión producido por efecto del tratamiento con plasma es mediante la cuantificación de su rugosidad superficial (*Ra*) y la media cuadrática superficial (*RMS*), ya que permite cuantificar la profundidad de erosión promedio de un área de análisis. Amanatides y col. ¹⁰⁰ demostraron que al someter películas de polietilentereftalato (PET) a un plasma de He/O₂, se incrementa de manera significativa la rugosidad del material y por lo tanto se mejoran sus propiedades de adherencia, en función del tiempo de exposición.

3.4.3. Mecanismo de Erosión del iPP

En estudios realizados por France y col. ⁹⁶ se propone que el mecanismo de erosión superficial del iPP producido por la incidencia de argón se lleva a cabo cuando los iones producen rupturas en cadenas poliméricas superficiales, generando especies iónicas en la superficie capaces de entrecruzarse o degradarse. Este proceso se efectúa en primera instancia a partir del ataque al carbono terciario de la cadena principal del polímero, el cual desprende el hidrógeno correspondiente y, por lo tanto, se produce la ruptura de la cadena. En una segunda etapa, los iones Ar presentes en el sistema de reacción atacan al metileno colgante de la cadena principal, formando radicales libres, que pueden ser adheridos a la superficie favoreciendo las reacciones de entrecruzamiento o la posible degradación del material. De acuerdo a lo anterior, es posible que el mecanismo de erosión del iPP se efectúe por la ruptura de cadenas superficiales y por las posibles reacciones de entrecruzamiento o degradación del polímero sometido a tratamiento, y que el grado de erosión este directamente relacionado con las condiciones de tratamiento (potencia, pureza del gas, tiempo de exposición, entre otros)⁹⁶.



En el caso particular de nanocompuestos poliméricos, el tratamiento superficial por plasma resulta en una herramienta atractiva para incrementar la funcionalidad de la superficie sin repercutir en cambios de sus propiedades en masa. Esta funcionalidad se encuentra directamente relacionada con la exposición de las nanopartículas, el cambio en la funcionalidad química en la superficie y en consecuencia, el incremento de la rugosidad del material, propiciando las condiciones adecuadas para el incremento del efecto antimicrobiano de nanocompuestos poliméricos formulados con NPs metálicas.

3.4.4. Aplicaciones del Plasma

Dentro de las aplicaciones más relevantes del plasma de radiofrecuencia se encuentran el diseño de circuitos miniaturizados, deposición o modificación de celdas solares, modificación superficial de empaques de alimentos, adhesión de metales y adhesión de tintas en matrices poliméricas, procesos de esterilización, entre otros. Dentro de las aplicaciones más prometedoras se encuentra la modificación superficial de nanocompuestos para incrementar sus propiedades de superficie y la biocompatibilidad con el organismo, el uso y diseño de dispositivos biomédicos, entre otros⁹⁹.



3.5. Mecanismo Antibacteriano de NPs Metálicas

3.5.1. Mecanismo de Interacción entre Bacterias y NPs Metálicas

A pesar de que recientemente se han desarrollado diferentes metodologías para la evaluación antimicrobiana de NPs y su interacción con microorganismos¹⁰¹, es importante considerar todos los procesos celulares involucrados con el fin de comprender sus posibles efectos tóxicos al interactuar con organismos vivos, por lo que el estudio de toxicidad de nanomateriales representa un importante aporte científico en el análisis microbiológico y el diseño de materiales antimicrobianos funcionales.

A pesar de que en la literatura se han mencionado los posibles mecanismos antimicrobianos de NPs metálicas al interactuar con bacterias, éste aún no es completamente entendido. Para tal efecto, se han implementado una serie de metodologías que permitan identificar el efecto antibacteriano de NPs sobre *E. coli*. Sondi y Salopeck-Sondi⁸ reportaron que el efecto antimicrobiano de nAg se encuentra directamente relacionado con la concentración de NPs y que la presencia de las mismas produce la formación de fosas en la membrana celular de bacterias Gram (-), por lo que se producen daños irreversibles en la permeabilidad de la membrana y en consecuencia la muerte celular. Apoyando esta teoría, Li y col. ¹⁰¹ mencionan que la interacción de nAg con *E. coli* produce cambios en la membrana celular, evaluados mediante la detección de proteínas y azúcares reductores liberados, producto de la alteración de la permeabilidad de la célula, y en consecuencia, la inhibición de crecimiento bacteriano.

El cambio en la permeabilidad bacteriana y la ruptura de la membrana pueden favorecer la penetración de las NPs y su posterior interacción con biomoléculas y componentes intracelulares. Morones y col. 102 proponen que una vez que cambia la permeabilidad bacteriana, las nAg de entre 1 y 10 nm pueden introducirse en las bacterias, y posteriormente reaccionar con grupos tioles de proteínas y con grupos fosfato provenientes de los ácidos nucleicos, lo que induce un daño significativo en las bacterias. Estudios recientes han demostrado que las NPs metálicas además de causar daños estructurales en la membrana



celular, pueden interactuar con el material genético de los microorganismos y ocasionar daños irreversibles en el proceso de replicación. Pramanik y col. 103 determinaron que nanopartículas de ioduro de cobre (CuI) con un diámetro promedio de 8 nm tienen la capacidad de inhibir por completo el crecimiento de *E. coli* y *B. subtilis* a partir del daño a su membrana celular y la posterior formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que provocan el daño al material genético de los microorganismos.

La mayoría de los autores coinciden en que el proceso antimicrobiano se efectúa a partir de la presencia de iones en la superficie de las nanopartículas y que en conjunto, se llevan a cabo interacciones electrostáticas con la pared bacteriana produciendo su adhesión y liberando iones, creando microambientes capaces de alterar la membrana celular y de formar especies ROS que induzcan estrés oxidativo. El efecto antibacteriano es la sumatoria de diferentes factores, dentro de los cuales destacan la naturaleza química de las NPs, su morfología, el proceso de liberación de iones en su superficie y las diferencias en la estructura celular bacteriana, dependientes de cada microorganismo.

3.5.1.1. Tamaño y Forma de las NPs

El efecto antimicrobiano de NPs se encuentra directamente relacionado con su tamaño y forma, puesto que el incremento exponencial del área en relación a su volumen proporciona una mayor área de interacción con microorganismos, inhibiendo su crecimiento en función de la concentración. Algunos autores mencionan que la actividad antimicrobiana de NPs metálicas depende de la composición de la partícula, su modificación superficial, sus propiedades intrínsecas y su reactividad superficial, ya que la capacidad de desprender iones de su superficie incrementa su efecto toxicológico al contacto con microorganismos. Otro factor predeterminante es la aglomeración de las NPs, puesto que en un ambiente líquido las partículas tienden a aglomerarse, por lo que el diseño de recubrimientos o funcionalidades en la superficie de las NPs va enfocado a evitar la aglomeración y, por lo tanto, incrementar el efecto bactericida al contacto con patógenos 104.



En cuanto a la morfología de las NPs, Pal y col.⁴¹ mencionan que las nAg en forma triangular presentan mayor eficacia antimicrobiana en comparación con partículas esféricas o alambres. En este caso la variación en la morfología de las NPs repercute en el área de contacto entre partícula/microorganismo, dando como resultado variaciones en el efecto antimicrobiano.

3.5.1.2. Liberación de Iones de la Superficie de las NPs

El proceso de liberación de iones considera la presencia de cationes en la superficie de las NPs y la liberación de sus iones metálicos en solución, que al interaccionar con la superficie bacteriana con carga negativa debida a la presencia de lípidos y proteínas¹⁰³, ocasionan la formación de complejos capaces de producir daños irreversibles en la estructura bacteriana¹⁰⁵.

La liberación de iones en la superficie de NPs metálicas está determinada por su reactividad, por lo que las NPs que son capaces de liberar iones de su superficie se consideran altamente tóxicas, ya que además de adherirse a la pared celular, sus iones penetran en la célula interfiriendo en procesos celulares vitales para el funcionamiento celular. La toxicidad de los iones localizados en la superficie de las NPs depende principalmente de la naturaleza tóxica de los metales. Bajo este criterio, las NPs adheridas en la membrana pueden producir daños a nivel local, y liberar iones que produzcan especies ROS que dañen por completo la estructura y el funcionamiento celular^{24, 106}.



3.5.1.3. Diferencias Estructurales en la Pared celular de Bacterias

La pared bacteriana está diseñada para mantener la estructura de la célula, además de conferir resistencia, rigidez estructural y protección contra posibles daños mecánicos o ruptura osmótica que comprometan la viabilidad celular¹⁰⁷. Existen diferencias significativas en la composición de la pared celular entre bacterias Gram (+) y Gram (-). Bajo este concepto, las bacterias Gram (+) como *S. aureus*, poseen una pared celular de un espesor promedio de 80 nm compuesta principalmente por peptidoglicano, el cual confiere rigidez estructural a la bacteria. Por otro lado, la pared celular de bacterias Gram (-) como es el caso de *P. aeruginosa* y *E. coli*, constan de una capa muy delgada de peptidoglicano dentro del espacio periplásmico, de aproximadamente 20 nm, además de una membrana externa compuesta principalmente por lípidos, proteínas y lipopolisacáridos (LPS), los cuales se encargan de incrementar la carga negativa de la membrana celular. Las diferencias en la composición de la pared celular de bacterias Gram (+) y Gram (-) se presentan en la **Figura 3.7**.

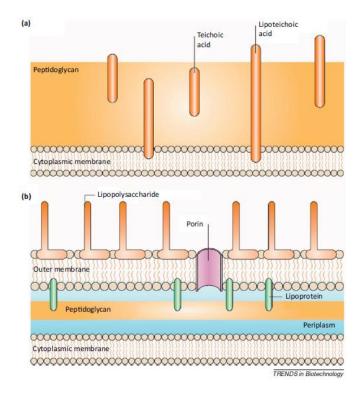


Figura 3.7. Diferencias estructurales en la composición de a) bacterias Gram (+) y b) bacterias Gram (-)¹⁰⁸.



Las diferencias en la composición de la pared celular de microorganismos han dado como resultado variaciones en el efecto antimicrobiano al estar en contacto con diferentes tipos de NPs metálicas. Maneerung y col.⁴⁷ demostraron que la actividad antimicrobiana de nAg es menor en *E. coli* en comparación con *S. aureus*, en donde se menciona que la composición de las bacterias Gram (-) proporciona protección al interactuar con las NPs. Caso contrario ocurre en lo observado por Nair y col.¹⁰⁹, en donde las bacterias Gram (+) *S. aureus* al contacto con NPs de óxido de zinc (ZnO) son menos susceptibles, por la protección que confiere el peptidoglicano en la pared bacteriana. En ambos casos se llega a la conclusión de que tanto las bacterias Gram (+) como las Gram (-), la permeabilidad se ve alterada por la ROS provenientes de la interacción de NPs con la superficie de los microorganismos.

3.5.2. Mecanismo de Acción de NPs Metálicas sobre Bacterias

En la literatura se describe que la presencia de NPs metálicas dentro de bacterias produce daños significativos en la pared celular, además de la alteración de sus procesos celulares vitales, dando como resultado la inhibición del crecimiento microbiano. De acuerdo a lo anterior, a continuación se describen las principales afectaciones en biomoléculas específicas producidas por la interacción con NPs.

3.5.2.1. Alteraciones en la Membrana Celular

A pesar de que la membrana celular bacteriana es un sistema complejo conformado por una bicapa lipídica, proteínas y polisacáridos, es evidente que la presencia de NPs y su interacción con microorganismos ocasiona alteraciones significativas en la membrana celular. Diversos autores mencionan que existe una evidencia directa de que a interacción entre NPs y la membrana celular es necesaria para que se produzca inactivación o daño celular¹¹⁰. Este proceso se lleva a cabo debido a la combinación de interacciones físico-químicas de las NPs con la estructura de la pared celular, dando como resultado la presencia de radicales libres capaces de reaccionar con la superficie lipídica de la membrana. Aunado a esto, la presencia de NPs produce la formación de ROS, por lo que se produce estrés oxidativo en la superficie,



dando como resultado afectaciones en la estructura celular que promueven la ruptura membranal¹¹¹.

Con el fin de determinar el daño en la estructura celular por la alteración de membrana, se ha reportado el uso de fluorocromos como herramienta de marcaje celular, los cuales permiten la diferenciación estructural a partir del cambio de color en las células, detectado mediante microscopia de fluorescencia. Norman y col. 112 reportan que la presencia de nano alambres de oro y su interacción con *P. aeruginosa* producen daño, ocasionado por la adhesión de las NPs sobre la superficie bacteriana, monitoreado a partir de la cuantificación de la viabilidad celular.

3.5.2.2. Daño en ADN

La ruptura de la membrana celular y la penetración de NPs metálicas dentro de las bacterias ocasionan su interacción con componentes intracelulares, siendo el material genético el más afectado, debido a que la presencia de NPs y sus iones liberados pueden promover su interacción con los grupos fosfatos presentes en la cadena helicoidal. Hatchett y col. 113 reportan que la interacción de iones Ag⁺ con el material genético ocasiona la formación de complejos que alteran el proceso de replicación y, por lo tanto, promueven la inhibición de crecimiento bacteriano.

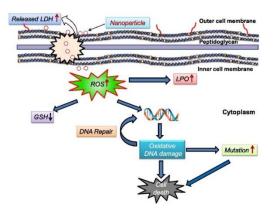


Figura 3.8. Esquema que representa el mecanismo propuesto por Kumar y col. ¹¹⁴ de daño al ADN producido por interacción con NPs.



Otro de los factores determinantes en el daño al ADN es la formación de ROS producidas por el estrés oxidativo, las cuales ocasionan la ruptura del material genético¹¹⁴. Pramanik y col. ¹⁰³ mencionan que la presencia de NPs de ioduro de cobre promueven la inhibición de la transcripción del ADN, evaluado a partir del uso de biosensores bacterianos modificados genéticamente. Bajo este criterio, recientemente se han desarrollado nuevas estrategias para la evaluación de daño en el ADN bacteriano, basados en el uso genes reporteros que expresan fluorescencia en función del daño celular. Li y col. ¹⁰⁶ reportaron el uso de *E. coli* modificadas genéticamente para la expresión de daño a proteínas y al ADN, en donde se determinó que la presencia de NPs inducen la ruptura del material genético principalmente por la formación de H₂O₂, considerado como la mayor fuente de toxicidad proveniente de la posible ionización de las NPs.

3.5.2.3. Daño en Proteínas

La presencia de NPs y su interacción con proteínas intracelulares y asociadas a la pared celular bacteriana se encuentra directamente relacionada con la formación de complejos, a partir de la interacción de los iones metálicos con la carga negativa de las proteínas. Lok y col. 115 mencionan que una corta exposición de nAg produce la acumulación de proteínas precursoras que desestabilizan la membrana externa, ocasionando la disminución significativa de los niveles de ATP intracelular, dando como resultado la inhibición del crecimiento bacteriano, además de que el efecto puede ser atribuido tanto a las NPs como a sus iones metálicos. Tomando en cuenta las afectaciones de las NPs sobre proteínas intracelulares, Tedesco y col. 116 reportaron que la presencia de NPs de oro producen la peroxidación de lípidos dañando la integridad de la membrana celular por estrés oxidativo, y en consecuencia la muerte celular. Apoyando esta teoría, Shrivastava y col. 117 mencionan que la penetración de nAg en bacterias Gram (-) modifican la modulación de la transducción de señales debido a que las NPs interfieren en el proceso de fosforilación de proteínas.



De acuerdo a lo anterior, la evaluación del daño a biomoléculas específicas por la presencia de NPs metálicas permitirá elucidar las posibles afectaciones intracelulares y, por lo tanto, determinar el proceso antimicrobiano de NPs metálicas sobre bacterias patógenas.



4. HIPÓTESIS

El efecto antimicrobiano de nanocompuestos formulados a partir de PP/nanopartículas metálicas (nAg y nCu) se verá incrementado al erosionar la superficie de los nanocompuestos obtenidos mediante plasma de argón, ya que se incrementará la exposición de las nanopartículas y, por lo tanto, se favorecerá el contacto con microorganismos patógenos. Lo anterior puede dar como resultado alteraciones en la estructura celular del microorganismo y en moléculas importantes para su adecuado funcionamiento, lo que conlleva a la muerte celular. El uso de nanocompuestos erosionados con propiedades bactericidas permitirá el diseño de recubrimientos como una alternativa efectiva para la disminución de enfermedades infecciosas asociadas con ambientes hospitalarios.



5. OBJETIVO

5.1. Objetivo general

Determinar la actividad antimicrobiana y el mecanismo de acción de nanopartículas de plata y cobre incorporadas a polipropileno y su erosión con plasma.

5.2. Objetivos particulares

- 5.2.1. Evaluar la actividad antimicrobiana de nAg y nCu en suspensión sobre bacterias patógenas comunes previa su incorporación al polímero.
- 5.2.2. Preparar y caracterizar los nanocompuestos de PP/nAg y PP/nCu en concentraciones de 0.05, 0.5 y 5 % p/p mediante mezclado en fundido asistido con ultrasonido.
- 5.2.3. Realizar la erosión superficial de los nanocompuestos PP/nAg y PP/nCu mediante tratamiento por plasma de argón y su caracterización.
- 5.2.4. Evaluar la actividad antimicrobiana de los nanocompuestos PP/nAg y PP/nCu antes y después del tratamiento por plasma.
- 5.2.5. Analizar los mecanismos de acción e interacción entre NPs metálicas y bacterias patógenas antes y después de su incorporación al polímero.



6. DESARROLLO EXPERIMENTAL

El presente capítulo describe la estrategia experimental llevada a cabo para la realización del trabajo de tesis, en donde se mencionan los materiales, métodos y técnicas de caracterización empleados. El estudio comprende la caracterización y actividad antibacteriana de nAg y nCu previa su incorporación al polímero, posteriormente la preparación de los nanocompuestos en sus diferentes concentraciones (0.05, 0.5 y 5 % p/p) mediante el mezclado en fundido, el tratamiento por plasma de argón y el monitoreo de los cambios superficiales de los nanocompuestos. Finalmente, se aborda el mecanismo antimicrobiano de NPs metálicas a diferentes etapas de interacción con células bacterianas con el objetivo de evidenciar el efecto del daño a la estructura de la pared celular, al material genético y proteínas, y en consecuencia, extrapolar el comportamiento antimicrobiano de las partículas expuestas en la superficie de los nanocompuestos obtenidos.

A continuación se presenta el esquema general de la estrategia experimental.





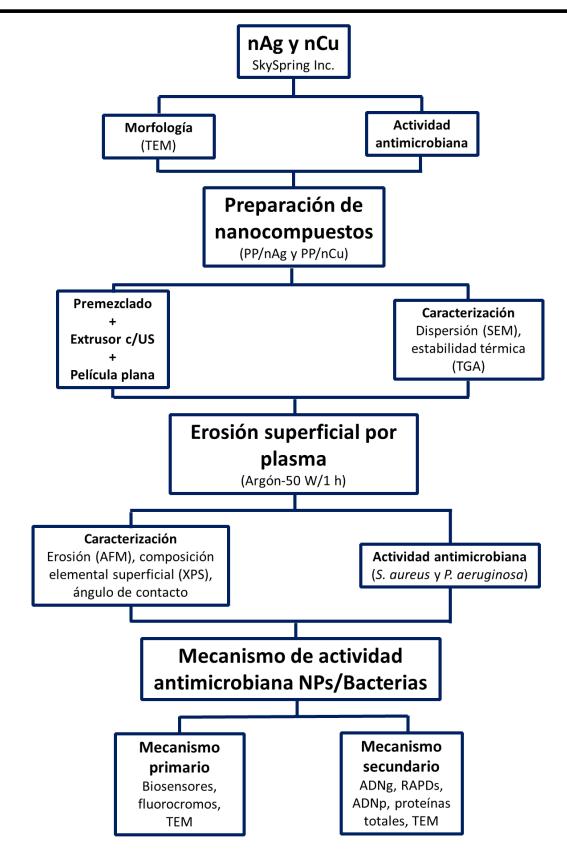


Figura 6.1. Esquema de la estrategia experimental implementada en el presente trabajo.



6.1. Materiales

Se emplearon nanopartículas de plata (nAg) y una mezcla de nanopartículas de cobre y óxidos de cobre (nCu) provenientes de SkySpring Nanomaterials Inc. con un diámetro promedio de entre 20 y 30 nm, una pureza del 99.95 % y morfología esférica. Para la preparación de nanocompuestos se empleó como matriz polimérica polipropileno isotáctico (iPP) proveniente de Sigma Aldrich con un peso molecular Mw de 190,000 g/mol. El tratamiento superficial mediante plasma se realizó con argón proveniente de Infra, con una pureza de 99.999 %. Para la evaluación microbiológica se emplearon las bacterias *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 13388 y *Escherichia coli* TOP10 de Invitrogen. Los microorganismos fueron crecidos en medio de cultivo Luria Bertani (LB) bajo en sales (-50 %) de BD Bioxon. La evaluación microbiológica de las NPs se realizó empleando medio de cultivo Mueller Hinton (MH) de BD Bioxon. La dispersión de las NPs en líquido para evaluar la actividad antibacteriana se realizó en una solución salina de fosfatos (PBS) con Tween 80 al 1 %.



6.2.Métodos

6.2.1. Actividad Antibacteriana de NPs Metálicas

Con el objetivo de evaluar el efecto antimicrobiano de nAg y nCu, se determinó la inhibición de crecimiento de bacterias y se calcularon los valores de CMI y CMB.

Preparación de NPs metálicas. Las suspensiones de NPs fueron preparadas en agua desionizada estéril con Tween 80 al 1 % como agente dispersante y sonicadas a una frecuencia fija de 40 kHz y una amplitud de 70 % durante dos ciclos de dos minutos. Se utilizaron diferentes concentraciones de nAg: 100, 200, 400, 800 y 1600 μg/mL y de nCu: 100, 200, 400, 800, 1600 y 3200 μg/mL.

Preparación de bacterias (E. coli, S. aureus y P. aeruginosa). Se utilizaron bacterias frescas provenientes de un cultivo de LB crecidas durante 16 h a 37 °C y se ajustaron a una concentración de 10⁵ UFC/mL mediante turbidimetría.

Ensayo de actividad antibacteriana. Se emplearon matraces estériles de 50 mL con 5 mL de la suspensión de NPs y 5 mL de la suspensión de bacterias. Se incubaron a 37 °C durante 24 h a 200 rpm y se determinó la inhibición de crecimiento bacteriano a partir de mediciones de densidad óptica a 600 nm. El valor de CMI fue aquella concentración de NPs en la que no se presentó crecimiento bacteriano. Aquellos tubos que no presentaron crecimiento fueron sembrados en placas con agar LB libres de NPs para efectuar el cálculo de la CMB, definida como aquella concentración de NPs que inhiben el crecimiento y que por lo tanto no formaron colonias bacterianas.

Debido a que a tiempos largos de incubación en medio LB las nCu se disuelven, se realizó un segundo procedimiento para comparar el efecto antibacteriano de nCu vs nAg. Para tal efecto, las NPs fueron mezcladas con *S. aureus* y *P. aeruginosa* durante 10 min en PBS y posteriormente se realizó la siembra en placa con agar LB, con el fin de cuantificar las bacterias viables en un medio libre de NPs después de 16 h de incubación. Se evaluó la actividad antibacteriana en diferentes concentraciones de nAg: 25, 50, 100, 200, 400, 800 y 1600 µg/mL y de nCu: 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 y 800 µg/mL.



6.2.2. Preparación de Nanocompuestos Poliméricos mediante Mezclado en Fundido

Se prepararon mezclas de PP en diferentes concentraciones de nAg y nCu (0.05, 0.5 y 5 % p/p) mediante el mezclado en fundido asistido con ultrasonido. Con el objetivo de asegurar la dispersión uniforme de las NPs en el polímero, el proceso se efectuó en tres etapas:

Premezclado. Cada formulación fue preparada en un mezclador Brabender, en donde inicialmente el polímero fue fundido a 190 °C durante 2 minutos, y posteriormente se realizó la incorporación de las NPs durante 8 minutos a 60 rpm.

Dispersión. Las mezclas obtenidas fueron peletizadas y posteriormente incorporadas en un extrusor Brabender acoplado a un sistema de ultrasonido de frecuencia a una temperatura promedio de entre 190-195 °C y una velocidad de husillo de 60 rpm, de acuerdo con las condiciones reportadas por Ávila-Orta y col¹¹⁸.

Obtención de película plana. Los nanocompuestos obtenidos fueron sometidos a un proceso de extrusión en película plana empleando un extrusor Killion con dado en T, a una temperatura de trabajo de 190 °C y una velocidad de 2 m/min, en donde se obtuvieron películas delgadas con un espesor promedio de 200 μm y cortadas en círculos de 2 cm de diámetro para su posterior evaluación.

6.2.3. Activación Superficial de Nanocompuestos mediante Plasma de Argón

Los nanocompuestos preparados en película plana fueron colocados en un reactor de plasma cilíndrico con un volumen promedio de 6 L, el cual fue conectado a una línea de argón. El plasma se obtuvo a partir de un generador de radiofrecuencia de 13.56 MHz (Advanced Energy RF600A) acoplado inductivamente al reactor, en donde se introdujo argón de manera controlada a un flujo constante de 18.4 sccm. Los nanocompuestos fueron sometidos a tratamiento durante 1 hora a 50 W de potencia, con una presión interna del reactor de 0.3 mbar.



6.2.4. Actividad Antibacteriana de Nanocompuestos Poliméricos

La actividad antimicrobiana de los nanocompuestos formulados en diferentes concentraciones (0.05, 0.5 y 5 % p/p) fue evaluada antes y después del tratamiento con plasma de argón. Los nanocompuestos sin tratamiento (*ST*) y los sometidos a plasma (*Plasma*) fueron colocados en cajas Petri individuales y expuestos a luz UV durante 30 min para su esterilización. Suspensiones bacterianas de *S. aureus* y *P. aeruginosa* de 16 h de crecimiento fueron preparadas en una solución estéril de LB en PBS (1:5) con una concentración inicial de 5x10⁶ UFC/mL. Una alícuota correspondiente a 25 μL de cada suspensión bacteriana fue colocada en la superficie de los nanocompuestos y posteriormente se colocó encima un cubreobjetos estéril. Todas las muestras fueron incubadas a 37 °C durante 0, 90, 180 y 360 minutos, efectuando los ensayos en tres experimentos independientes por duplicado. Después de cada tiempo de interacción, se realizó la recuperación de las bacterias sobrevivientes lavando la superficie de los nanocompuestos y el cubreobjetos con 5 mL de PBS/Tween. De la suspensión de lavado se tomaron 100 μL, los cuales fueron colocados en cajas con agar LB e incubados a 37 °C durante 16 horas. La actividad antibacteriana fue calculada de acuerdo con la siguiente ecuación¹¹⁹:

Actividad antimicrobiana (%) =
$$\frac{Co - C}{Co} X$$
 100

En donde *Co* es el número de UFC en la muestra control (polímero sin carga) y *C* es el número de colonias bacterianas en los nanocompuestos con diferentes concentraciones de NPs.



6.2.5. Análisis de la Interacción entre Bacterias y NPs Metálicas

6.2.5.1 Biosensores Bacterianos en respuesta a Daño específico producido por la Interacción con NPs Metálicas

Con el objetivo de evaluar el mecanismo primario de actividad antimicrobiana en función del daño en respuesta a la interacción con nAg y nCu, se emplearon una serie de cepas de E. coli modificadas genéticamente para responder específicamente a diferentes tipos de estrés y daño. Para ello, se emplearon biosensores bacterianos diseñados y caracterizados por Padilla-Martínez y col. 2014 (manuscrito en preparación). Estas bacterias biosensoras contienen promotores de respuesta a estrés específico, fusionados a un gen reportero que codifica para una proteína verde fluorescente (GFP), que se caracteriza por emitir fluorescencia en respuesta al daño. Se emplearon 4 biosensores bacterianos denominados FabA (que responde ante el daño a la membrana celular), KatG (responde ante el estrés oxidativo), DnaK (responde ante el daño a proteínas) y RecA (responde ante el daño al ADN), los cuales fueron validados previamente empleando controles positivos (SDS para el daño a proteínas, H₂O₂ para el estrés oxidativo, etanol para el daño a proteínas y mitomicina para el daño al ADN celular). La evaluación se realizó inoculando 3 mL de medio LB-Ampicilina (LB-Amp) con cada una de las bacterias biosensoras y se incubaron durante 16 h a 37 °C. Posteriormente se inocularon 180 µL de cada cultivo en 5 mL de LB-Amp y se incubaron a 37 °C durante 2 horas a 150 rpm. Se determinó el crecimiento celular mediante densidad óptica a 600 nm hasta obtener valores de 0.5-0.6. Después se colocó 1 mL de cada cultivo en tubos eppendorf, centrifugando a 6000 rpm durante 3 min para retirar el sobrenadante. La pastilla con cada uno de los biosensores se suspendió en 1 mL de medio mínimo. En una placa oscura de 96 pozos se realizó la mezcla de 100 µL de cada uno de los biosensores con diferentes concentraciones de nAg o nCu, y se incubaron a 26 °C. Se determinó la fluorescencia de cada uno de los biosensores a diferentes tiempos a una longitud de excitación de 395 nm y una longitud de emisión de 507 nm en un espectrofluorometro Varioskan Flash Multimode Reader (Thermo Scientific).



6.2.5.2. Evaluación de la Integridad de la Membrana Celular a partir de Fluorocromos Vitales

Para evaluar daños estructurales en la pared y membrana celular posterior a la interacción con diferentes concentraciones de nAg y nCu, se empleó el kit LIVE/DEAD (Invitrogen), que contiene una mezcla de fluorocromos Syto 9, capaz de incorporarse a las células viables produciendo fluorescencia en la longitud de onda del verde, además del fluorocromo Ioduro de propidio (IP), que solamente se introduce en las bacterias que han sufrido alteraciones en su membrana celular. El ensayo se efectuó empleando células de *E. coli* que estuvieron en contacto con diferentes concentraciones de nAg y nCu en tiempos inferiores a las 2 horas. Las bacterias fueron lavadas 3 veces con una solución de NaCl 150 mM y se suspendieron en 300 μL de una mezcla 1:1 de los fluorocromos Syto9/IP. Las bacterias se incubaron a 25 °C durante 15 min y se observaron en un microscopio de epifluorescencia Zeiss a una longitud de emisión de 480/500 nm para Syto 9 y de 490/635 nm para el IP.

6.2.5.3. Análisis de Alteraciones en la Estructura Bacteriana por la presencia de nAg y nCu mediante Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM)

Para observar el efecto de la interacción de NPS metálicas sobre la estructura celular, se obtuvieron las imágenes correspondientes mediante microscopia electrónica de transmisión (TEM). A partir de las curvas de inhibición de crecimiento de *P. aeruginosa* con diferentes concentraciones de nAg y nCu, se tomaron muestras a diferentes tiempos para su procesamiento. El proceso consta de tres etapas principales: prefijación, deshidratación y embebido. Alícuotas de 1 mL de bacterias incubadas con NPs fueron centrifugadas a 3000 rpm/1 min y posteriormente se retiró el sobrenadante. Cada muestra fue resuspendida en 1 mL de glutaraldehído al 2 % para promover la fijación de lípidos durante 1 h. Posteriormente cada muestra fue lavada de 4 a 5 veces con cacodilato de sodio. Las muestras fueron teñidas con tetraóxido de osmio al 1 % durante 2 h. Posteriormente se realizó el procedimiento de deshidratación de cada muestra con concentraciones de etanol al 50, 70, 96 y 100 % por periodos de 10 min. A cada muestra centrifugada se le añadió 1 mL de óxido de propileno y se dejaron en reposo durante 10 min. El embebido de las muestras se realizó empleando una resina epóxica EPON 812 en una relación 1:1 con óxido de propileno. Las muestras fueron



colocadas en un desecador durante 16 h hasta observar la evaporación del 50 % de la resina. Finalmente, se colocó 1 mL de resina pura en cada una de las muestras y se dejaron en estufa a 60 °C para su polimerización. Las muestras fueron cortadas empleando un ultramicrotomo Leica con un espesor promedio de 70 nm y colocadas en rejillas de cobre de 300 mesh para las bacterias interaccionadas con nAg, mientras que para las bacterias interaccionadas con nCu se colocaron en rejillas de níquel. Las muestras obtenidas se observaron en un microscopio electrónico de transmisión FEI-TITAN a una potencia de trabajo de 300 kV.

6.2.5.4. Determinación de los Tiempos de Evaluación de Daño a partir de Curvas de Inhibición de Crecimiento Bacteriano

Con el objetivo de determinar los tiempos de obtención de muestras de ADN y proteínas de bacterias incubadas con diferentes concentraciones de nAg y nCu, se obtuvieron las curvas de inhibición de crecimiento en función del tiempo de interacción. Se prepararon suspensiones de nAg en concentraciones de 100, 200, 400 y 800 µg/mL y de nCu en concentraciones de 50, 100, 200 y 400 µg/mL suspendidas en PBS/Tween. A partir de un inoculo de *P. aeruginosa* y de *E. coli* de 16 h de crecimiento se realizaron diluciones hasta obtener una densidad óptica inicial de 0.2. En matraces estériles de 125 mL se mezclaron bacterias y NPs en una relación 1:1 y se incubaron a 37 °C. Se tomaron alícuotas para la evaluación de ADN y proteínas cada 2 horas hasta completar las 6 horas de incubación. Se tomaron lecturas de densidad óptica a 600 nm cada hora para monitorear la inhibición de crecimiento bacteriano y su comparación con el control, restando el valor de densidad óptica de las NPs solas.

6.2.5.5. Extracción de ADN Genómico (ADNg)

A partir de la interacción de diferentes concentraciones de nAg y nCu con *P. aeruginosa* en función del tiempo, se extrajo 1 mL de la mezcla y se centrifugó a 13000 rpm durante 2 minutos y se retiró el sobrenadante para obtener la pastilla de células. Para la obtención del ADNg se llevó a cabo el procedimiento de extracción de acuerdo a las especificaciones del kit "*Wizard Genomic DNA Purification*" de Promega. A cada pastilla de células se le añadió



lisozima y detergente con el fin de lisar las bacterias, se realizó la degradación de ARN empleando una solución de RNAsa de 1 mg/mL, dejando en incubación a 37 °C durante 35 min. Se efectuó la precipitación de las proteínas y la separación del material genético por centrifugación a 13000 rpm durante 3 min. La solución con el ADN se colocó en un tubo limpio y se precipitó con etanol. Finalmente, se realizó la cuantificación del ADN obtenido a 260 nm empleando un espectrofotómetro GeneQant. La integridad y la calidad del ADNg se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8 % teñidos con bromuro de etidio. El ADNg se corrió a 50 V durante 40 min y se obtuvieron las imágenes de los geles empleando un fotodocumentador Kodak con lámpara de luz UV.

6.2.5.6. Evaluación de la Genotoxicidad mediante la Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico (RAPDs)

La técnica de amplificación aleatoria de ADN polimórfico, o también conocida como RAPDs se basa en la amplificación al azar de secuencias de ADN genómico a partir de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando oligonucleótidos de 10 pares de bases (pb). La modificación o daño al ADN producida por la ruptura de cadena o cambios en la posición de secuencias, generará perfiles de amplificación diferenciales. Para los ensayos de amplificación se evaluaron 16 oligonucleótidos provenientes del kit "RAPD Analysis Primer Set" (Invitrogen). Las secuencias de cada uno de los oligonucleótidos empleados se encuentran en la **Tabla 6.1**.



Tabla 6.1. Secuencias de oligonucleótidos empleados para la amplificación de ADNg de *P. aeruginosa* mediante RAPDs.

	Secuencia (5'-3')
E01	GGGTTTGGCA
E02	CAAGGCAGA
E03	ACCGCGAAGG
E04	GGACCCAACC
E05	GTCGCCGTCA
E06	TGAGCGGACA
E07	GGGCCACTCA
E08	GGAGAGACTC
E09	TCCACTCCTG
E010	CACAGAGGGA
1	GGTGCGGGAA
2	GTTTCGCTCC
3	GTAGACCGT
4	AAGAGCCCGT
5	AACGCGCAAC
6	CCCGTCAGCA

Se seleccionaron los oligonucleótidos con los que se obtuvieron mayor cantidad de bandas de amplificación, usando ADNg como templado. Cada uno de los oligonucleótidos seleccionados fue mezclado con el ADN obtenido de las bacterias crecidas en diferentes condiciones de interacción con nAg y nCu. La amplificación se realizó con la enzima ADN polimerasa GoTaq (Invitrogen) en un termociclador BioRad. Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo de 5 min a 95 °C para la desnaturalización inicial; 45 ciclos que comprenden 1 min a 95 °C para la desnaturalización, 1 min a 36 °C para la alineación de los oligonucleótidos y 2 min a 72 °C para su extensión. Se realizó la separación de los fragmentos obtenidos por electroforesis mediante geles de agarosa al 0.8 % teñidos con bromuro de etidio.

6.2.5.7. Extracción de ADN Plasmídico (ADNp)

Bacterias de la cepa *E. coli* TOP10 de Invitrogen fueron transformadas con el plásmido pTZ19R y posteriormente fueron incubadas con 100 μg/mL de nAg y 250 μg/mL de nCu respectivamente, durante 2 y 6 horas de interacción. El plásmido se obtuvo a partir del método de lisis alcalina empleando TRIS 25 mM y EDTA 25 mM a pH 8.0 para suspender las células y solución de lisis de SDS al 1 % y NaOH 0.2 M. Se adicionó acetato de potasio



3 M pH 5.8 y se precipitó el material genético en etanol. Todos los reactivos fueron adquiridos en Sigma Aldrich. Para evaluar la calidad y la integridad del ADNp obtenido se realizó el procedimiento descrito en la extracción del ADNg.

6.2.5.8. Obtención de Perfiles de Proteínas Totales de *P. aeruginosa* Interaccionadas con nAg y nCu.

A partir de las curvas de inhibición de crecimiento, se obtuvieron bacterias de *P. aeruginosa* al contacto con diferentes concentraciones de nAg y nCu en función del tiempo de interacción. Las pastillas de células fueron mezcladas con 100 μL de amortiguador de carga con SDS. Se realizaron 4 ciclos de congelación (nitrógeno líquido)/descongelación a 40 °C. Las células fueron hervidas a 95 °C, centrifugadas y el sobrenadante cargado en un gel de poliacrilamida al 10 %. Los geles fueron corridos a 10 mA durante 2.5 h y teñidos con azul de Comassie para la observación del perfil de bandas de proteínas totales. Finalmente, se obtuvieron imágenes de los geles en un fotodocumentador Kodak empleando luz blanca.



6.3. Técnicas de Caracterización

6.3.1. Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM)

La microscopia electrónica de transmisión (TEM) es una técnica que permite la caracterización de la estructura cristalina y la composición de la materia a escala nanométrica. El microscopio presenta tres modos principales de funcionamiento: contraste de difracción (campo claro y campo oscuro), contraste de fases (alta resolución ó HRTEM) y difracción de electrones, los cuales en conjunto proporcionan información sobre la estructura cristalina de materiales, morfología y composición química localizada¹²⁰. En el caso de nanomateriales poliméricos, es importante el uso de esta técnica ya que además de ver la dispersión y la morfología de nanopartículas en una matriz, permite distinguir la composición química a escala nanométrica. En el modo convencional TEM y en microscopia electrónica de transmisión de barrido (STEM), la difracción de electrones contribuye en la formación de imágenes y su estructura cristalina a través de la obtención de sus patrones de difracción, los cuales pueden ser obtenidos con un límite de resolución de hasta 0.1 nm. En la **Figura 6.2** se presenta el esquema representativo del funcionamiento del TEM.

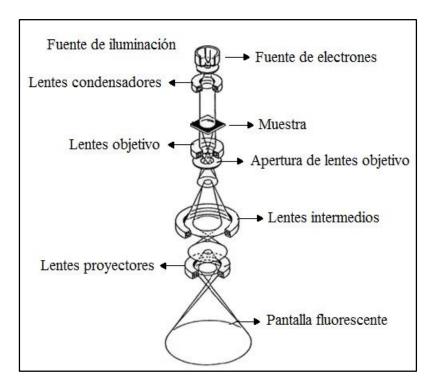


Figura 6.2. Esquema representativo del funcionamiento del TEM.



La caracterización morfológica de las nAg y nCu se realizó empleando un microscopio FEI-TITAN a una potencia de trabajo de 300 kV. Ambas nanopartículas fueron dispersadas en etanol con ultrasonido durante 10 min y posteriormente se depositó una gota de la suspensión diluida en rejillas de cobre con recubrimiento de carbono (nAg) y rejillas de níquel (nCu) de 300 mesh para su observación.

6.3.2. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido se basa en el uso de un haz de electrones a partir de una fuente generadora para la observación detallada de la micro-estructura de un material ¹²¹. Estos electrones (denominados electrones primarios) son dirigidos hacia la superficie de una muestra y colisionan para la generación de electrones secundarios, los cuales son detectados y modulados electrónicamente para generar una imagen, por lo que es indispensable que las muestras sean conductoras para poder ser analizadas mediante esta técnica. En el caso de nanomateriales poliméricos, dada su naturaleza aislante, es necesario realizar un recubrimiento superficial de oro-paladio que permita el desprendimiento de los electrones de la superficie, y en consecuencia, producir una imagen detallada de la muestra. Bajo este concepto, en la **Figura 6.3** se presenta el esquema representativo del funcionamiento del SEM.



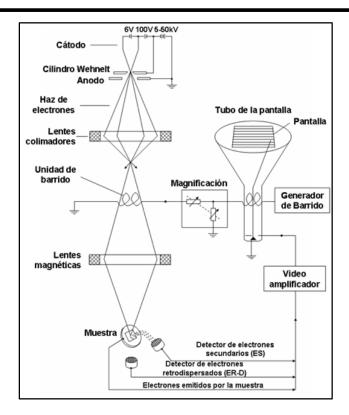


Figura 6.3. Esquema representativo del funcionamiento del SEM.

Para evaluar la dispersión de las NPs embebidas en el polímero, se realizó la fractura criogénica de los nanocompuestos PP/nAg y PP/nCu formulados al 5 % p/p y su observación se llevó a cabo en un equipo Jeol JSM-7041F con un voltaje de aceleración de 20 kV.

6.3.3. Difracción de Rayos-X de Ángulo Amplio (WAXD)

La difracción de rayos-X de ángulo amplio es una de las técnicas que permite conocer la estructura cristalina de un material, puesto que determina la posición de los átomos presentes en un arreglo cristalino 122. Los rayos-X se producen por el bombardeo de un ánodo metálico que posee un haz de electrones de alto voltaje (desde 20 hasta 50 kV) que va dirigido hacia la muestra. La mayor parte de la energía emitida por estos electrones es convertida en calor por medio de un tubo de vacío, en donde sale al exterior en forma de un rayo delimitado. Los rayos-X difractados pueden ser detectados por medio de un contador de radiación y un amplificador electrónico que alimenta a un registrador. Lo anterior permite el estudio de la



disposición de los átomos por medio de la interacción de la radiación electromagnética para producir efectos de interferencia con estructuras comparables en tamaño a la longitud de radiación. Si estas estructuras se encuentran ordenadas, las interferencias son nítidas y la radiación es difractada de forma característica dependiendo del tipo de material. En la **Figura 6.4** se presenta el esquema representativo del funcionamiento del difractómetro de rayos-X WAXD.

Para evaluar la estructura cristalina de los nanocompuestos y el efecto de la presencia de nAg y nCu en sus diferentes concentraciones dentro del polímero se obtuvieron los difractogramas WAXD correspondientes. Para ello se empleó un difractómetro Siemens D5000 en modo reflexión empleando una radiación Cu K α a 35 kV, una intensidad de filamento de 25 mA a una velocidad de 0.3° por segundo en un ángulo de 5 a 80 en 2 θ con un intervalo de 0.02°.

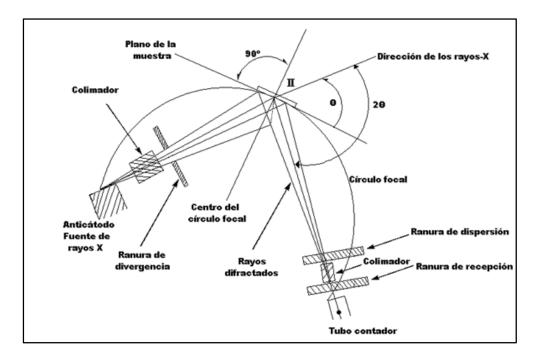


Figura 6.4. Esquema representativo del funcionamiento del difractómetro de rayos-X (WAXD).



6.3.4. Análisis Termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico se describe como una técnica cuantitativa que mide la velocidad de pérdida en masa en función del incremento de la temperatura dentro de un sistema¹²³. Determina la temperatura de volatilización de los materiales, su estabilidad térmica y los porcentajes de pérdida en peso a partir del uso de una balanza de alta sensibilidad con atmósfera de O₂, N₂ o aire. Las mediciones pueden ser efectuadas en modo isotérmico o dinámico. En el modo isotérmico, la muestra es sometida a una temperatura constante y existe una variación de tiempo y la atmósfera de prueba; mientras que en el análisis dinámico, la temperatura va en incremento con la variación de la velocidad de calentamiento y con la posibilidad de cambiar el tipo de atmósfera. En la **Figura 6.5** se presenta el esquema representativo del funcionamiento del TGA.

Para evaluar la estabilidad térmica de los nanocompuestos obtenidos y cuantificar las pérdidas en peso correspondientes se utilizó un equipo de termogravimetría TGA Q500 de TA Instruments. Los nanocompuestos y su comparación con el polímero sin carga fueron sometidos a un calentamiento isotérmico desde temperatura ambiente hasta 800 °C, a una velocidad de 10 °C/min con un flujo constante de N₂ de 50 mL/min.

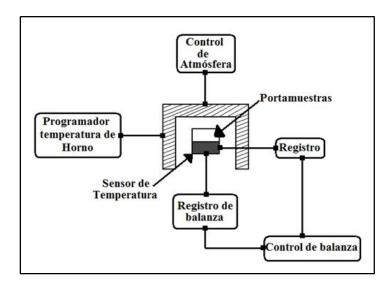


Figura 6.5. Esquema representativo del sistema de termo balanza empleado en el TGA



6.3.5. Microscopia de Fuerza Atómica (AFM)

El microscopio de fuerza atómica de define como un equipo óptico-mecánico que tiene la capacidad de registrar la topografía de una superficie a partir de la interacción de una punta cristalina con la superficie de un material. Cuando esta punta incide de forma ordenada en la superficie se registra la energía utilizada a partir de un foto detector láser, mientras que al mismo tiempo un sistema piezoeléctrico produce la imagen¹²⁴. La resolución que se puede obtener mediante esta técnica es menor a 1 nm y se pueden obtener imágenes de la topografía superficial, la amplitud y el contraste de fases de un material. En el caso de nanomateriales poliméricos, es posible detectar a partir del contraste de fases la dispersión de las nanopartículas en la superficie del polímero, además de los cambios en la topografía superficial producidos a partir de la modificación superficial de los mismos. En la Figura 6.6 se presenta el esquema representativo del funcionamiento del microscopio de fuerza atómica. El equipo puede efectuar 2 tipos de mediciones: de imagen y fuerza. En la medición de imagen la superficie de la muestra es recorrida por la punta a una velocidad y distancia definida. Durante este proceso la energía de los átomos de la punta interactúa con la energía atómica de la muestra, lo que genera una flexión en el listón láser. En la modalidad fuerza, la punta oscila de manera vertical, mientras se registra la flexión, este tipo de medición sirve para caracterizar las propiedades elásticas de materiales poliméricos.

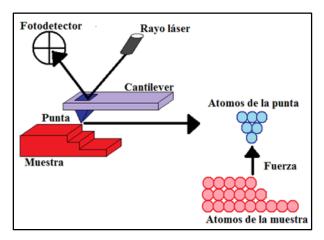


Figura 6.6. Esquema representativo del funcionamiento del AFM.



Para la evaluación de los nanocompuestos antes y después del tratamiento con plasma se empleó un microscopio de fuerza atómica marca Veeco Dimension 3100. Se realizó el análisis de topografía superficial de los nanocompuestos PP/nAg y PP/nCu formulados al 5 % y el efecto del tratamiento con plasma de argón. Las determinaciones se llevaron a cabo en modo tapping y el área de campo analizada fue de 30 µm.

6.3.6. Espectroscopia Fotoelectrónica de Rayos-X (XPS)

Esta técnica se caracteriza por la medición cuantitativa de electrones sobre la superficie de un material y tiene la capacidad de cuantificar los elementos presentes en los primeros 10 nm de una superficie en concentraciones superiores al 0.1 %. El análisis de XPS se basa a partir de la interacción de un fotón con el electrón de un orbital atómico en donde se produce una transferencia energética, dando como resultado la emisión del electrón del átomo incidido. De acuerdo a lo anterior, las energías de enlace detectadas mediante el XPS son relacionadas con enlaces iónicos o covalentes entre átomos. En la **Figura 6.7** se presenta el esquema representativo del XPS.

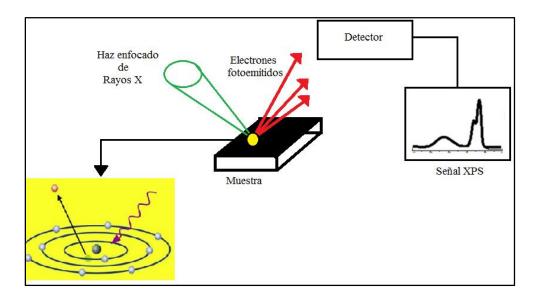


Figura 6.7. Esquema representativo del funcionamiento del XPS.



Para realizar el análisis de la superficie de los nanocompuestos, el efecto de la incidencia del plasma de argón sobre su superficie y la cuantificación de especies metálicas asociadas con la exposición de nAg y nCu, se obtuvieron los espectros XPS de los nanocompuestos PP/nAg y PP/nCu formulados al 5 % p/p antes y después del tratamiento con plasma y su comparación con el polímero sin carga. Los análisis se realizaron en un XPS SPECS Sage HR 100 con una fuente no monocromática de electrones a una resolución de 30 eV de energía de paso y a una velocidad de 0.5 eV para los espectros generales, mientras que para los espectros detallados se empleó una energía de paso de 15 eV a una velocidad de 0.15 eV. Los análisis fueron llevados a cabo a una presión interna de 5×10^{-8} mbar con un ángulo de inclinación de 90° empleando una fuente de magnesio con una línea $K\alpha$ de 1253.6 eV de energía y una potencia aplicada de 250 W. Se realizó la deconvolución de los espectros a partir de las funciones Gausian-Lorentzian para el ajuste adecuado de las curvas de los espectros de alta resolución obtenidos.



7. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este capítulo se presentan y discuten los resultados más relevantes obtenidos durante la realización del presente trabajo. Lo anterior comprende la caracterización morfológica de las nAg y nCu comerciales, además de su evaluación antimicrobiana contra las bacterias patógenas *S, aureus* y *P. aeruginosa*. Posteriormente, la incorporación de las cargas nanométricas en PP a partir del mezclado en fundido asistido con ultrasonido y su preparación en película plana. Se determinó el efecto del tratamiento superficial mediante plasma de argón y el análisis de los cambios superficiales de los nanocompuesto, además de la evaluación antimicrobiana antes y después del tratamiento. Finalmente, se presentan los resultados correspondientes al análisis de diversos procesos de interacción celular entre bacterias y NPs metálicas en etapas tempranas de interacción (como parte del mecanismo primario) y en etapas tardías de interacción (mecanismo secundario), con el objetivo de elucidar el mecanismo antimicrobiano de nanopartículas metálicas en función del daño a biomoléculas y, por lo tanto, extrapolar el comportamiento antimicrobiano de los nanocompuestos sometidos a erosión con plasma.



7.1.NPs Metálicas

7.1.1 Morfología

Se seleccionaron nAg y nCu comerciales de un tamaño promedio de entre 20 y 30 nanómetros, las cuales fueron sometidas a un proceso de dispersión por ultrasonido en fase gas¹²⁵, con el fin de evitar su aglomeración. Para corroborar las especificaciones reportadas por el proveedor, se optó por verificar el tamaño, la morfología y la pureza de las nAg y nCu.

En la **Figura 7.1** se presenta la caracterización de las nAg a partir de microscopia electrónica de transmisión. La micrografía TEM (**Fig. 7.1-a**) indica la presencia de nAg esféricas que se encuentran en un tamaño promedio de entre 10 y 30 nm (**Fig. 7.1-c**), lo cual se encuentra dentro de las especificaciones del proveedor. En el análisis elemental (**Fig. 7.1-b**) demuestra la presencia de plata, además de ligeras trazas de elementos orgánicos inferiores al 5 % en peso (carbono y oxígeno), posiblemente provenientes del método de fabricación. Finalmente, la **Figura 7.1-d** presenta los patrones de difracción de las NPs, los cuales corresponden a una estructura FCC con los planos cristalinos (111), (200), (220) y (311) característicos de las nAg³⁵ y que coinciden con el estándar de difracción JCPDS 04-0783.



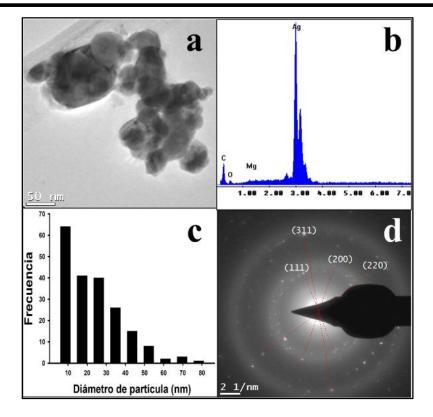


Figura 7.1. Caracterización de nAg comerciales. Análisis obtenido a partir de microscopía electrónica de transmisión en donde se determinó la morfología de las nAg. a) Imagen TEM, b) Análisis elemental EDX, c) Histograma y d) Patrones de difracción.

Bajo las mismas condiciones, se realizó la caracterización de las nCu (**Figura 7.2**). En la micrografía (**Fig. 7.2-a**) se aprecian nCu esféricas de un tamaño promedio de 60 nm, por lo que el tamaño de partícula sobrepasa las especificaciones del proveedor. El análisis elemental demostró que las NPs presentan trazas de oxígeno (17.06 %) y azufre (5.77 %), lo que sugiere la presencia de óxidos e impurezas depositados en la superficie de las NPs que provengan posiblemente del método de fabricación y de su parcial oxidación al contacto con el medio ambiente.



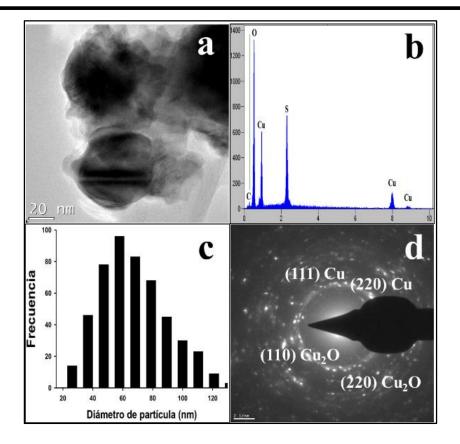


Figura 7.2. Caracterización de nCu comerciales. Análisis obtenido a partir de microscopía electrónica de transmisión en donde se determinó la morfología de las nCu. a) Micrografía TEM, b) análisis elemental EDX, c) Histograma y d) Patrones de difracción.

Finalmente, en la **Figura 7.2-d** se presentan los patrones de difracción obtenidos mediante TEM, en donde se corrobora la presencia de una estructura FCC correspondiente a nCu⁵³ con la presencia de los planos cristalinos (111) y (220) asociados al cobre elemental, además de los planos (110) y (220) que corresponden a óxido cuproso (Cu₂O), lo que sugiere la presencia de nCu con un recubrimiento de óxido en su superficie.

Algunos autores sugieren que las NPs metálicas tales como plata y cobre que se encuentran en un diámetro de entre 20 y 200 nm pueden presentar capacidad antimicrobiana, y que el tamaño de partícula si repercute directamente en el efecto inhibitorio al interaccionar con microorganismos^{60,126}. Por otro lado, cabe destacar que la presencia de óxidos en las nCu no



interfiere en el efecto antimicrobiano de las mismas, ya que de acuerdo con diversos reportes las nCu en su estado oxidado siguen presentando capacidad antibacteriana frente a microorganismos tales como *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli*, entre otros^{22,53,60}.

7.1.2. Actividad Antibacteriana

Para corroborar la efectividad antimicrobiana de nAg y nCu se realizaron curvas de inhibición de crecimiento de *S. aureus* y *P. aeruginosa* con diferentes concentraciones de NPs, en donde se obtuvieron las lecturas correspondientes a la densidad óptica de ambos microorganismos en un medio de cultivo líquido, y se obtuvieron los valores de CMI y CMB. Para obtener ambos valores, a partir de las curvas de inhibición de crecimiento se realizó la siembra en placa de cada una de las concentraciones en un medio libre de NPs para corroborar la completa inhibición de crecimiento bacteriano. De acuerdo a lo anterior, se obtuvieron los resultados presentados en la **Tabla 7.1**, en donde se observa que bajo las mismas condiciones de evaluación la bacteria *P. aeruginosa* es más susceptible en comparación con *S. aureus*, debido a sus diferencias en la composición de su pared celular^{8,23}. Por otro lado, se determinó que las nAg presentan una CMI menor (800 μg/mL) en comparación con lo obtenido con las nCu (1600 μg/mL). De acuerdo con lo reportado por Ruparelia y col.²³, las nCu tienden a ionizarse y por lo tanto a formar complejos con los iones cloruro presentes en el medio de cultivo, por lo que el efecto antibacteriano de las NPs puede verse afectado.



Tabla 7.1. Valores de CMI y CMB (μg/mL) de nAg y nCu contra *S. aureus* y *P. aeruginosa* en medio de cultivo líquido.

	nAg		nCu		
	CMI	CMB	CMI	CMB	
S. aureus	800	1600	1600	1600	
P. aeruginosa	200	800	1600	1600	

El análisis de la actividad antibacteriana de NPs mediante la interacción de microorganismos en un medio de cultivo líquido demostró que las nAg presentan mayor estabilidad bajo estas condiciones de evaluación, mientras que las nCu al estar en contacto con el medio de cultivo tienden a disolverse, por lo que es posible que el efecto antibacteriano a largo plazo sea meramente iónico. Con el objetivo de evitar este fenómeno, se implementó una segunda estrategia para la evaluación antibacteriana de nAg y nCu a partir de la interacción de NPs y bacterias en buffer de fosfatos (PBS) durante 10 min.

En la **Figura 7.3** se presentan los porcentajes de actividad antibacteriana de nAg y nCu al contacto con *S. aureus*, en donde las nCu presentan un efecto antimicrobiano superior que las nAg. Se puede apreciar que en la concentración de 200 μ g/mL las nAg únicamente presentan actividad antimicrobiana cercana al 30 %, mientras que las nCu inhiben por completo el crecimiento bacteriano. Se obtuvieron los valores de dosis letal media (LD₅₀), en donde las nAg presentan una LD₅₀ de 300 μ g/mL, mientras que en las nCu es de 50 μ g/mL, lo que refleja el efecto superior de las nCu a menores concentraciones, en comparación con las nAg.



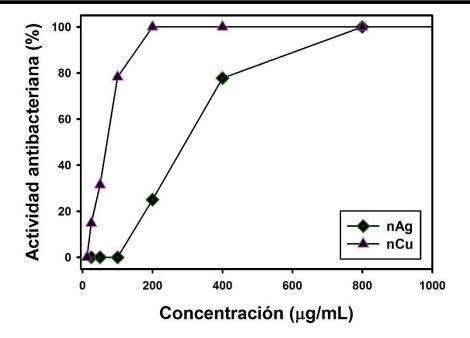


Figura 7.3. Actividad antibacteriana de nAg y nCu sobre *S. aureus***.** Evaluación del efecto bactericida de nAg y nCu durante 1 hora de interacción con *S. aureus* suspendidas en un medio libre de nutrientes (PBS) a 37 °C.

Bajo las mismas condiciones, se realizó la interacción de nAg y nCu al contacto con *P. aeruginosa* (**Figura 7.4**), en donde desde 12.5 μg/mL ya se presenta una inhibición de crecimiento bacteriano cercana al 50 % con nCu, alcanzando el 100 % de inhibición en 100 μg/mL; mientras que en el caso de las nAg, no se presenta actividad antimicrobiana hasta la concentración de 800 μg/mL, siendo la concentración de 1600 μg/mL en donde se alcanza el 100 % de inhibición de crecimiento bacteriano. Se obtuvieron los valores de LD₅₀, en donde las nCu se encuentran en 11 μg/mL, mientras que las nAg se encuentran en 655 μg/mL. Cabe resaltar que *P. aeruginosa* presenta mayor susceptibilidad al contacto con NPs en comparación con *S. aureus*, atribuido a las diferencias en la pared celular de ambas bacterias.



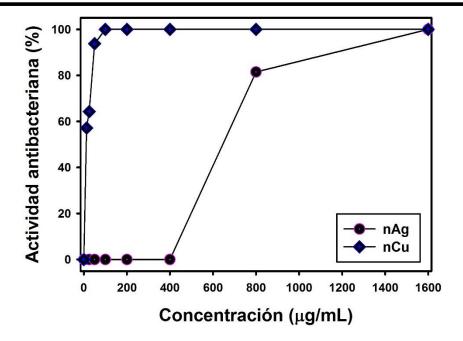


Figura 7.4. Actividad antibacteriana de nAg y nCu sobre *P. aeruginosa***.** Evaluación del efecto bactericida de nAg y nCu durante 1 hora de interacción con *P. aeruginosa* suspendidas en un medio libre de nutrientes (PBS) a 37 °C.

De acuerdo con los resultados obtenidos, las nAg y nCu presentan actividad antimicrobiana al estar en contacto con *S. aureus* (Gram +) y *P. aeruginosa* (Gram -) y, por lo tanto, pueden ser empleadas para su incorporación dentro de una matriz polimérica. Se determinó que la estabilidad de las NPs en suspensión a etapas tempranas de interacción es determinante para la evaluación de la actividad antimicrobiana, lo cual marca una pauta en los procesos de interacción entre NPs y microorganismos.



7.2. Nanocompuestos Poliméricos

7.2.1. Morfología y Dispersión

Después de corroborar la eficacia antimicrobiana de nAg y nCu, se realizó la incorporación de NPs en iPP mediante mezclado en fundido asistido con ultrasonido y posteriormente su preparación en película plana. Para analizar la dispersión de las NPs dentro de la matriz polimérica, se obtuvieron micrografías SEM a partir de la fractura criogénica de los nanocompuestos PP/nAg-5 % y PP/nCu-5 %, (**Figura 7.5**). En la **Fig. 7.5-a** se presenta la micrografía de fractura criogénica del nanocompuesto PP/nAg-5% en donde se observan algunos aglomerados que se encuentran entre 100 y 150 nm. Por otro lado, en la **Figura 7.5-b** se observa una dispersión representativa de las nCu, las cuales presentan un tamaño promedio de NPs de entre 30 y 60 nm. De acuerdo a lo anterior, bajo las mismas condiciones de procesamiento, las nCu se dispersan mejor en el polímero fundido en comparación con las nAg, atribuido principalmente a su naturaleza química, ya que la presencia de óxido en su superficie repercute en la interacción de las NPs con el PP en su estado fundido. Por otro lado, es posible que en la incorporación de nAg se requiera mayor energía dispersiva del ultrasonido para favorecer la ruptura de los aglomerados.



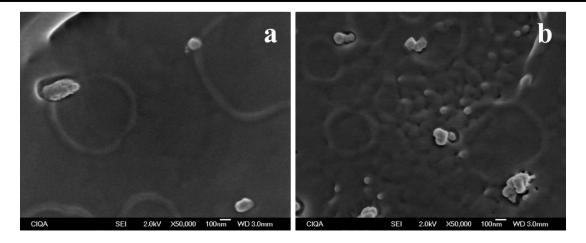


Figura 7.5. Micrografías SEM de nanocompuestos PP/nAg y PP/nCu al 5 % p/p. Imágenes obtenidas a partir de la fractura criogénica de los nanocompuestos a) PP/nAg y b) PP/nCu, visualizadas mediante microscopía electrónica de barrido a 50 000 X.

La diferencia en el tamaño de partícula observada en los nanocompuestos PP/nAg y PP/nCu reflejan las diferencias entre la química superficial de nAg y nCu. La presencia del recubrimiento de Cu₂O en la superficie de las nCu interfiere en el proceso de aglomeración en comparación con las nAg puras, por lo tanto, las nCu tienden a ser más compatibles con el PP en estado fundido posiblemente a través de enlaces hidrógeno, ya que por la temperatura de proceso y la presencia de ultrasonido durante el procesamiento del material, es probable que el PP sufra una ligera oxidación térmica⁵³, lo cual puede repercutir en su interacción con las nCu.

7.2.2. Estructura Cristalina

El análisis de la estructura cristalina de nanocompuestos a partir de difracción de rayos-X de ángulo amplio (WAXD) permite visualizar cambios en la conformación de los planos cristalinos por la presencia de NPs y la posible interacción entre ambos componentes. Para tal efecto, se obtuvieron los difractogramas correspondientes a los nanocompuestos PP/nAg (**Fig. 7.6-a**) y los nanocompuestos PP/nCu en sus diferentes concentraciones (**Fig. 7.6-b**), y su comparación con el polímero sin carga. Se puede apreciar que el PP sin carga presenta 2 picos localizados en los ángulos 14.20 y 21.40 de 2θ que corresponden a los planos cristalinos



(110) y (131) de la mesofase α del iPP inducida por la orientación del material durante su procesamiento en película plana^{127,128}, independiente de la presencia de nAg y nCu⁸⁵. En la **Fig. 7.6-a** se presentan los difractogramas de PP/nAg en sus diferentes concentraciones y se puede apreciar que en la concentración del 5 % p/p se presentan 4 picos localizados en 38.10, 44.20, 64.44 y 77.00 de 2θ, que corresponden a los planos cristalinos (111), (200), (220) y (311) característicos de las nAg⁸⁷ y que la presencia de las mismas no interfiere en la estructura cristalina del polímero. Un comportamiento similar ocurre en la **Fig. 7.6-b** al analizar los nanocompuestos con diferentes concentraciones de nCu, en donde se pueden apreciar dos picos localizados en 36.60 y 43.20 de 2θ que corresponden a los planos cristalinos (111) de Cu⁰ y (111) del Cu₂O, lo que corrobora la presencia de una mezcla de nCu y Cu₂O dentro del sistema⁵⁸. La presencia de ambas estructuras cristalinas puede estar relacionada con los diferentes procesos térmicos a los que son sometidas las NPs durante la preparación de los nanocompuestos, lo cual puede favorecer la oxidación, además de que la presencia de ondas de ultrasonido dentro del sistema de mezclado en el extrusor puede promover la oxidación parcial de las nCu⁵³.

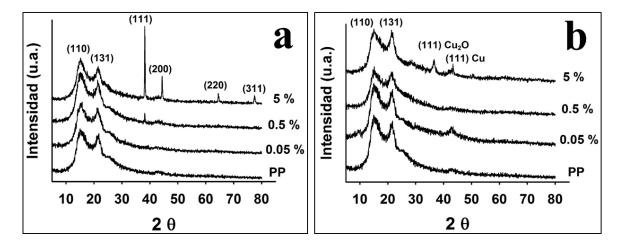


Figura 7.6. Difractogramas WAXD de nanocompuestos PP/nAg y PP/nCu en diferentes concentraciones. Estructura cristalina de los nanocompuestos obtenidos a partir de mezclado en fundido asistido con ultrasonido y su posterior procesamiento en película plana. a) PP/nAg y b) PP/nCu.



7.2.3. Estabilidad Térmica

Para visualizar cambios en la estabilidad térmica de los nanocompuestos por la presencia de NPs en diferentes concentraciones, se realizó un análisis termogravimétrico, el cual se presenta en la **Figura 7.7**. El polímero sin carga presenta un 20 % de pérdida en peso a la temperatura de 415.74 °C. Se puede apreciar que en los nanocompuestos con nAg (Fig. 7.7a) la pérdida de un 20 % en peso de los nanocompuestos a 0.05 y 0.5 % se presentan a 389.38 °C v 397.64 °C, por lo que la presencia en bajas concentraciones de nAg disminuyen ligeramente su estabilidad térmica; mientras que en el caso del nanocompuesto PP/nAg al 5 % se presenta un incremento alrededor de 10 °C en comparación con el polímero sin carga, presentando una pérdida en peso en 423.67 °C. Bajo las mismas condiciones, se realizó el análisis de los nanocompuestos de PP/nCu en sus diferentes concentraciones (Fig. 7.7-b) en donde se encontró una relación directa del incremento de la estabilidad térmica de los nanocompuestos en función del incremento de la cantidad de nCu, en donde la concentración del PP/nCu del 5 % presenta un incremento de 20 °C en comparación con el polímero sin carga. De acuerdo a lo anterior, la presencia de NPs incrementa la estabilidad térmica de los nanocompuestos, evitando posible degradación térmica del polímero durante su procesamiento¹²⁹.



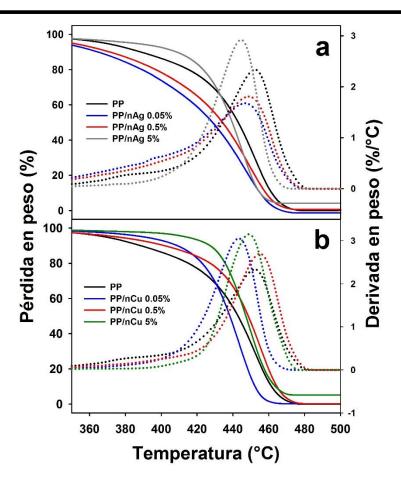


Figura 7.7. Análisis termogravimétrico de nanocompuestos PP/nAg y PP/nCu en diferentes concentraciones. Estabilidad térmica obtenida a partir de TGA de nanocompuestos obtenidos a partir del mezclado en fundido asistido con ultrasonido con diferentes concentraciones de a) nAg y b) nCu.



7.3. Tratamiento Superficial de Nanocompuestos Poliméricos mediante Plasma de Argón

7.3.1. Activación Superficial

Recientemente, la modificación superficial de nanomateriales ha permitido el incremento exponencial de las propiedades de superficie y, por lo tanto, su funcionalidad¹²⁹⁻¹³⁰. Bajo este concepto, se realizó la modificación superficial de los nanocompuestos PP/nAg y PP/nCu en sus diferentes concentraciones a partir del uso de plasma de argón. Los nanocompuestos procesados en película plana fueron sometidos a tratamiento dentro de un reactor de plasma de radiofrecuencia con atmósfera controlada de argón durante 1 hora. Las condiciones de tratamiento fueron seleccionadas de acuerdo con lo encontrado en trabajos anteriores^{16,131}. Para tal efecto, se analizaron los cambios en la superficie de los nanocompuestos con la mayor concentración (5 % p/p) antes del tratamiento (*ST*) y después del tratamiento con plasma (*Plasma*).

En la **Figura 7.8** se presentan las micrografías SEM de la superficie de los nanocompuestos antes y después del tratamiento con plasma. En el caso de los nanocompuestos sin tratamiento (**Fig. 7.8-a** y **Fig. 7.8-c**) no se observa la presencia de NPs en la superficie del polímero en un área promedio de 28.28 μm². Después del tratamiento con plasma, en el nanocompuesto PP/nAg (**Fig. 7.8-b**) se pueden apreciar algunos aglomerados que corresponden a las nAg, con un tamaño promedio de 100 nm, donde su presencia es atribuida a la erosión superficial del nanocompuesto por efecto del plasma. Un comportamiento similar ocurre en la superficie del nanocompuesto PP/nCu al ser sometido a tratamiento (**Fig. 7.8-d**), en donde se aprecia el incremento en la cantidad de NPs expuestas en un área promedio de 28.28 μm², contando 87 partículas, a partir del promedio de la cuenta de tres imágenes. Este comportamiento corrobora que el plasma induce la remoción de polímero en la superficie de los nanocompuestos y que ocasiona la exposición superficial de las nanopartículas.



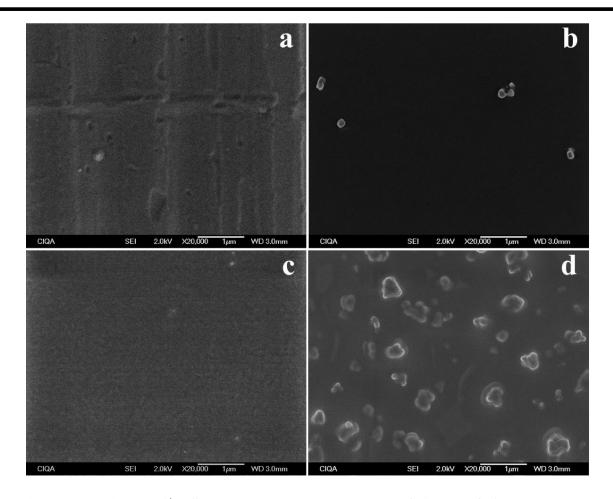


Figura 7.8. Micrografías SEM de los nanocompuestos PP/nAg y PP/nCu al 5 % antes y después del tratamiento con plasma. Imágenes de la superficie de los nanocompuestos PP/nAg y PP/nCu obtenidas a partir de microscopia electrónica de barrido. a) PP/nAg *ST*, b) PP/nAg *Plasma*, c) PP/nCu *ST* y d) PP/nCu *Plasma*.

De acuerdo con los resultados obtenidos, el plasma de argón produce la remoción superficial de polímero, incrementando la cantidad de NPs expuestas en la superficie de los nanocompuestos. Al comparar el efecto de la exposición superficial entre los nanocompuestos PP/nAg y PP/nCu se observa que estos últimos presentan alto grado de exposición, lo cual se encuentra directamente relacionado con la dispersión de las NPs en el polímero. Diversos reportes sugieren que el análisis superficial mediante microscopía electrónica de barrido puede ser considerado como una opción viable para visualizar cambios en la exposición de NPs producidos por el plasma, y que el grado de exposición se encuentra



directamente asociado con las variables que rigen el tratamiento, tales como la potencia y el tiempo de reacción^{17, 132}. De acuerdo a lo anterior, el tratamiento por plasma de argón tiene la capacidad de modificar drásticamente las características superficiales de los nanocompuestos, ya que se lleva a cabo el fenómeno de colisión de iones y especies reactivas del plasma con el sustrato (matriz polimérica), lo cual puede promover la inserción de grupos funcionales o la ruptura de cadenas en la superficie del polímero^{96, 100}.

Para corroborar los cambios en la superficie de los nanocompuestos por efecto del plasma, se obtuvieron imágenes de la topografía superficial a partir de microscopia de fuerza atómica (AFM) antes y después del tratamiento con plasma. En la **Figura 7.9** se presentan las imágenes 3D de la topografía superficial del polímero sin carga (**Fig. 7.9-a**) y de los nanocompuestos PP/nAg 5 % (**Fig. 7.9-c**) y PP/nCu 5 % (**Fig. 7.9-e**), en donde se aprecia una superficie parcialmente lisa. Al ser sometidas al tratamiento con plasma, la morfología de la superficie cambia drásticamente, incrementando la rugosidad del material. El polímero sin carga sometido a plasma (**Fig. 7.9-b**) se observa el efecto "ondulado", el cual se encuentra directamente relacionado con el proceso de erosión del material ¹⁰⁰. En el caso de los nanocompuestos con nAg y nCu, se puede observar el incremento en la exposición superficial de NPs, lo que refleja la remoción de polímero por efecto del plasma. Aunado a esto, al comparar la cantidad de NPs expuestas, el nanocompuesto PP/nCu presenta mayor cantidad de NPs en la superficie en comparación con PP/nAg, asociado con la dispersión de la carga nanométrica dentro del polímero.



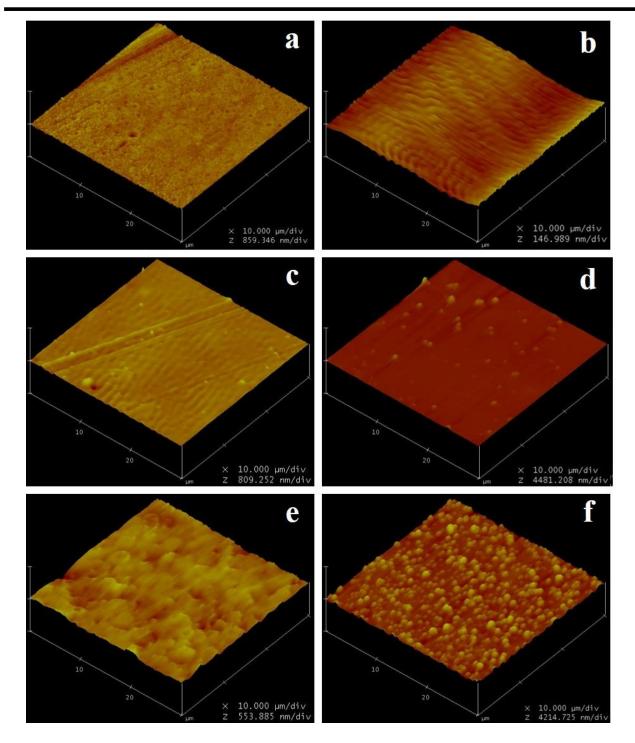


Figura 7.9. Imágenes AFM 3D de topografía superficial de nanocompuestos antes y después del tratamiento con plasma. Imágenes obtenidas de la superficie en 3D de los nanocompuestos formulados al 5 % PP/nAg y PP/nCu y su comparación con el polímero sin carga.a) PP-ST, b) PP-Plasma, c) PP/nAg-ST, d) PP/nAg-Plasma, e) PP/nCu-ST y f) PP-nCu-Plasma.



Para corroborar los cambios en la rugosidad de los nanocompuestos por efecto del plasma, se obtuvieron los valores de la rugosidad promedio superficial (RMS) antes y después del tratamiento, de acuerdo con los datos presentados en la **Tabla 7.2**. En este caso, se observa un ligero incremento en la rugosidad superficial del polímero sin carga después del tratamiento con plasma, mientras que en el caso del nanocompuesto PP/nAg incrementa 4 veces la rugosidad y en el caso del PP/nCu se incrementa hasta 6 veces, en comparación con los nanocompuestos sin tratamiento. En este caso, la rugosidad puede ser incrementada debido a la resistencia de las NPs al proceso de erosión por plasma, por lo que en el polímero sin carga no se presenta un incremento significativo en la rugosidad. Este comportamiento corrobora que el tratamiento por plasma de argón induce el proceso de erosión superficial en los nanocompuestos¹³³⁻¹³⁴, incrementando la cantidad de NPs expuestas en la superficie del material.

El incremento en la rugosidad superficial posiblemente es debido a la erosión heterogénea entre las áreas del polímero sin carga y las áreas del polímero que rodean a las nanopartículas metálicas y, por lo tanto, a los efectos localizados producidos por la interacción de los iones de plasma con las NPs expuestas, las cuales son térmicamente conductoras¹³⁵. Por lo tanto, se puede atribuir que la rugosidad superficial de los nanocompuestos sometidos a tratamiento se produce por la combinación de fenómenos físicos (conductividad térmica de las NPs) y fenómenos químicos (desprendimiento de cadenas poliméricas en la superficie del material), dando como resultado la modificación superficial de los nanocompuestos.



Tabla 7.2. Rugosidad superficial promedio (RMS) de PP, PP/nAg 5 % y PP/nCu 5 % antes y después del tratamiento con plasma.

	RMS (nm)	RMS (nm)		
	Sin tratamiento	Plasma		
PP	11.00 ± 0.10	13.10 ± 0.50		
PP/nAg 5 %	8.50 ± 0.05	35.90 ± 0.40		
PP/nCu 5 %	17.60 ± 0.05	109.40 ± 0.10		

Para cuantificar la cantidad de NPs expuestas, se llevó a cabo el conteo de partículas en las imágenes 2D de los nanocompuestos antes y después del tratamiento con plasma en un área de 900 μm², calculado a partir del conteo promedio de tres imágenes (**Figura 7.10**). En los nanocompuestos PP/nAg sin tratamiento (**Fig. 7.10-a**), se encontró un promedio de 55 partículas, mientras que en los nanocompuestos sometidos a plasma (**Fig. 7.10-b**) se incrementó la exposición en un promedio de 100 partículas, por lo que prácticamente se duplicó la cantidad de partículas expuestas por efecto del plasma. Por otro lado, en los nanocompuestos PP/nCu se puede observar que las muestras sin tratamiento (**Fig 7.10-c**) presentan un conteo promedio de 60 partículas, mientras que los nanocompuestos tratados con plasma (**Fig. 7.10-d**) incrementan la exposición de las partículas obteniendo un valor promedio de 650 partículas.



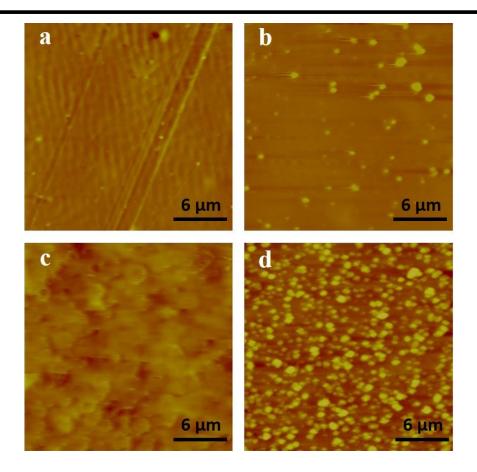


Figura 7.10. Imágenes AFM 2D de los nanocompuestos PP/nAg y PP/nCu antes y después del tratamiento con plasma. Imágenes en 2D en donde se obtuvo el conteo de partículas expuestas por efecto del tratamiento superficial con plasma de argón. a) PP/nAg-*ST*, b) PP/nAg-*Plasma*, c) PP/nCu-*ST* y d) PP/nCu-*Plasma*.

La inducción en la exposición superficial de nanopartículas por efecto del plasma en los nanocompuestos PP/nAg difiere por mucho en comparación con lo encontrado en los nanocompuestos PP/nCu, ya que de acuerdo con los resultados obtenidos, las nCu presentan mayor exposición en comparación con las nAg. Este fenómeno puede estar asociado con las diferencias en la dispersión de las nanopartículas dentro del polímero y a su afinidad química con la matriz. Una posible explicación en cuanto a las diferencias en el comportamiento de ambas nanopartículas se relaciona con las diferencias en la naturaleza química de ambos metales. Al suponer que las nAg se encuentran en su estado elemental (Ag⁰), no existen impedimentos iónicos o átomos con carga que repriman la interacción entre ambas fases, lo



que puede incrementar la afinidad entre la fase continua y la fase dispersa. Al ocurrir este fenómeno, es posible que se requiera mayor energía para remover el polímero de la superficie del nanocompuesto, por lo que la exposición superficial de las NPs puede llevarse a cabo en menor grado. Por otro lado, en los nanocompuestos PP/nCu se determinó que las NPs presentan un estado de oxidación parcial durante el procesamiento del material, por lo que la presencia de átomos de oxígeno en la superficie de las NPs representa un impedimento en la interacción con el polímero, de naturaleza no polar. De acuerdo a lo anterior, si existe menor afinidad entre ambas fases, es posible que se requiera menor energía para remover el polímero de la superficie, lo que puede ocasionar el incremento en la rugosidad del nanocompuesto y, por lo tanto, la exposición de una mayor cantidad de nanopartículas en su superficie.

Para comprender cómo se lleva a cabo el proceso de erosión a partir del tratamiento con plasma de argón, diversos autores proponen que la incidencia de los iones argón (Ar) sobre el polímero ocasionan la ruptura de cadenas poliméricas 96,136, las cuales pueden ser removidas por el efecto de vacío al cual se encuentran sometidas las muestras durante el tratamiento. France y col. 96 sugieren que la ruptura de las cadenas poliméricas del PP se produce por el ataque al carbono terciario de la cadena principal del iPP, favoreciendo la ruptura de enlaces y la formación de especies reactivas en la superficie del polímero, sin alterar sus propiedades en masa. De acuerdo a lo anterior, es posible que el plasma propicie la modificación superficial del polímero a partir del bombardeo iónico con argón sobre la superficie, lo que produce la formación de sitios activos capaces de reaccionar posteriormente al contacto con el medio ambiente, y por lo tanto modificar la química superficial de los nanocompuestos.

Con el objetivo de monitorear los cambios en la composición química superficial de los nanocompuestos por efecto del tratamiento con plasma, se llevaron a cabo análisis de espectroscopia fotoelectrónica de rayos-X de alta resolución (XPS) de la superficie de los nanocompuestos formulados al 5 % p/p en función del tratamiento con plasma, comparado con el polímero sin carga. En la **Figura 7.11** se presenta el espectro general de los



nanocompuestos y su comparación con el polímero sin carga, antes y después del tratamiento con plasma. En todos los casos se aprecia un incremento en las señales relacionadas con oxígeno y nitrógeno en los materiales que fueron sometidos a plasma, lo que indica un cambio en la composición superficial por efecto del plasma. Este fenómeno sugiere que el ataque de los iones argón sobre la superficie del polímero deja sitios activos^{96, 100}, que posteriormente son capaces de reaccionar con el aire, lo cual puede favorecer la inserción de oxígeno y nitrógeno sobre la superficie del material¹³⁷.



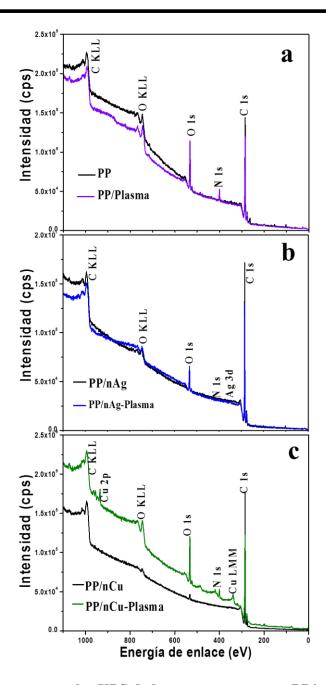


Figura 7.11. Espectros generales XPS de los nanocompuestos PP/nAg y PP/nCu antes y después del tratamiento con plasma. Espectros obtenidos a partir de espectroscopia fotoelectrónica de rayos-X de alta resolución. a) PP, b) PP/nAg 5 % y c) PP/nCu 5 %.

A partir de los espectros generales del PP y de los nanocompuestos PP/nAg y PP/nCu formulados al 5 %, se obtuvieron los valores de fracción atómica de cada elemento, los cuales se presentan en la **Tabla 7.3**. Corroborando la información obtenida a partir de los gráficos,



las muestras sometidas a tratamiento con plasma incrementan la composición elemental superficial de nitrógeno y oxígeno en comparación a las muestras sin tratamiento. La concentración relativa de oxígeno en la superficie del polipropileno sin tratamiento puede ser atribuida al proceso de oxidación parcial que sufre el polímero durante el procesamiento térmico.

Se obtuvieron los espectros de C1s de los nanocompuestos PP/nAg y PP/nCu al 5 % antes y después del tratamiento con plasma, presentado en la **Figura 7.12**. Como resultado de la deconvolución, el espectro PP/nAg después de ser sometido a plasma (**Fig. 7.12-b**) presenta una disminución de la intensidad de los picos localizados en 285 eV y 286.5 eV, la cual es atribuida a la formación de los enlaces C-OH y C-N durante el tratamiento de plasma y después de la exposición de los nanocompuestos tratados al medio ambiente, por lo que el plasma induce la activación superficial del material¹³⁸. El espectro C1s de PP/nCu después del tratamiento (**Fig. 7.12-d**) presenta un decremento en la señal principal, lo que indica la inserción de nitrógeno y oxígeno en la superficie del nanocompuesto. El pico localizado en 288.5 eV de los nanocompuestos PP/nCu sugiere la presencia de los enlaces C=O/O=C-OH. Tanto en los nanocompuestos formulados con nAg al igual que los de nCu presentan un incremento importante en las señales asociadas a las especies nitrógeno y oxígeno sobre su superficie por efecto del tratamiento mediante plasma de argón¹³⁹.

Tabla 7.3. Fracción atómica elemental obtenida a partir de los espectros generales de XPS de PP, PP/nAg y PP/nCu al 5 %, antes y después del tratamiento con plasma.

	C	N	0	Ag	Cu
PP	80.8	2.0	17.2	-	-
PP-Plasma	76.0	6.0	17.9	-	-
PP/nAg 5%	94.6	~0	5.4	~0	-
PP/nAg 5%-Plasma	90.2	~0	9.6	0.2	-
PP/nCu 5%	97.2	~0	2.5	-	0.3
PP/nCu 5%-Plasma	76.5	4.2	16.7	-	2.7



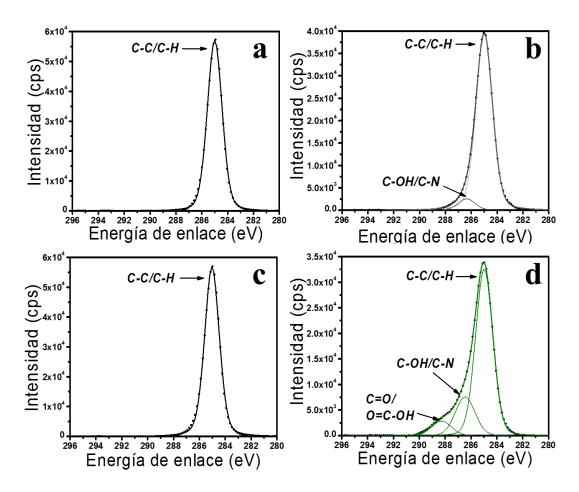


Figura 7.12. Espectros de C1s de los nanocompuestos PP/nAg y PP/nCu al 5 % antes y después del tratamiento con plasma. a) PP/nAg-ST, b) PP/nAg-Plasma, c) PP/nCu-ST y d) PP/nCu-Plasma.

Finalmente, se obtuvieron los espectros de Ag y Cu para la detección de ambos elementos en la superficie de los nanocompuestos antes y después del tratamiento con plasma (**Figura 7.13**). Para el nanocompuesto PP/nAg sin tratamiento (**Fig. 7.13-a**) no se observan señales asociadas a la plata elemental (Ag⁰) o de sus óxidos, las cuales se localizan en 368.5 eV y 367.5 eV, mientras que el nanocompuesto PP/nAg tratado con plasma (**Fig. 7.13-b**) presenta dos señales asociadas a los enlaces Ag 3d_{5/2} y Ag 3d_{3/2} que aparecen en 368 eV y 375 eV y que corresponden a las señales atribuidas a las nAg¹⁴⁰. El mismo comportamiento se presenta en los nanocompuestos PP/nCu, en donde la muestra sin tratamiento (**Fig. 7.13-c**) no presenta señales asociadas con cobre elemental (Cu⁰), mientras que el nanocompuesto sometido a



tratamiento (**Fig. 7.13-d**) presenta dos señales localizadas en 933.1 eV y 953.3 eV y que corresponden a los enlaces asociados con Cu 2p_{1/2} y Cu 2p_{3/2} para cobre y óxido de cobre⁵², además de señales asociadas con la resonancia del Cu₂O, que sugieren una ligera capa de óxido de cobre en la superficie de las NPs expuestas. En ambos casos se aprecia que el plasma induce la exposición superficial de las NPs debido al proceso de erosión de polímero de la superficie de los nanocompuestos.

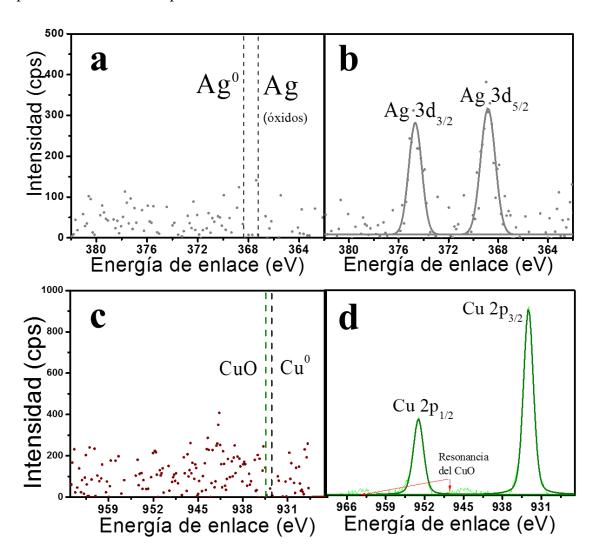


Figura 7.13. Espectros XPS de Ag y Cu de los nanocompuestos PP/nAg y PP/nCu al 5 % antes y después del tratamiento con plasma. a) Ag⁰ 3d de PP/nAg-ST, b) Ag⁰ 3d de PP/nAg-Plasma, c) Cu⁰ 2p de PP/nCu-ST y d) Cu⁰ 2p de PP/nCu-Plasma.



Los resultados obtenidos a partir de los análisis de AFM y XPS demostraron que el plasma de argón tiene la capacidad de modificar la superficie de los nanocompuestos incrementando su rugosidad, la exposición de las nanopartículas y la formación de sitios activos capaces de reaccionar con el medio ambiente, promoviendo la inserción de especies oxígeno y nitrógeno en la superficie del material.

Para corroborar el cambio en la química superficial de los nanocompuestos, se efectuaron mediciones de ángulo de contacto. En la **Tabla 7.4** se presentan los valores de ángulo de contacto de los nanocompuestos PP/nAg y PP/nCu formulados al 5 % antes y después del tratamiento con plasma y su comparación con el polímero sin carga. Los nanocompuestos sin tratamiento presentan ángulos de contacto cercanos a 100°, asociados con una superficie hidrófoba. Este fenómeno se ve afectado al someter las muestras a plasma, puesto que el ángulo de contacto se disminuye drásticamente, adquiriendo un comportamiento hidrofílico. El cambio en la polaridad superficial se atribuye a la inserción de especies polares a la superficie de los nanocompuestos por efecto del plasma, lo que sugiere un cambio en las propiedades de adhesión al estar en contacto con solventes polares como el agua¹⁴¹. Este comportamiento favorecerá la interacción de bacterias patógenas suspendidas en medio líquido al estar en contacto con la superficie de los nanocompuestos erosionados con plasma.

Tabla 7.4. Valores de ángulo de contacto de PP, PP/nAg 5 % y PP/nCu 5 % antes y después del tratamiento con plasma.

	Sin tratamiento	Con tratamiento		
	(ST)	(Plasma)		
PP	97 ± 3°	54 ± 6°		
PP/nAg 5%	$100 \pm 2^{\circ}$	$64 \pm 4^{\circ}$		
PP/nCu 5%	99 ± 3°	64 ± 3°		



7.4. Actividad Antibacteriana de Nanocompuestos Poliméricos

La actividad antibacteriana de los nanocompuestos PP/nAg y PP/nCu antes y después de ser sometidos a tratamiento con plasma fue determinada mediante el análisis cuantitativo de la muerte bacteriana en función del tiempo de interacción de una cantidad conocida de bacterias con los nanocompuestos en función del tiempo. La Figura 7.14 presenta los porcentajes de actividad antibacteriana de PP/nAg y PP/nCu al contacto con S. aureus. Se puede observar que la actividad antimicrobiana de los nanocompuestos incrementa después del tratamiento con plasma y que el incremento es dependiente del tiempo de interacción. Los nanocompuestos PP/nAg 5 % (Fig. 7.14-a) y PP/nCu 5 % (Fig. 7.14-b) muestran un efecto antimicrobiano por encima del 80 % y 95 % respectivamente después de 6 horas de interacción, una actividad antibacteriana mayor que sin el tratamiento con plasma. Lo anterior apoya que la modificación superficial que sufren los nanocompuestos por efecto del plasma influye directamente en la capacidad bactericida de los nanocompuestos¹⁶. Debido a las diferencias en la cantidad de NPs expuestas entre los nanocompuestos de nAg y los de nCu, es posible que la eficacia antimicrobiana sea mayor en los nanocompuestos con cobre. ya que la dispersión de las nCu fue más efectiva en comparación con la dispersión obtenida en los nanocompuestos con nAg. Cabe señalar que al comparar la actividad bactericida de nCu con nAg comercial empleadas en el presente trabajo, las nanopartículas de cobre resultaron ser más efectivas al contacto con S. aureus y P. aeruginosa (Figuras 7.3 y 7.4).



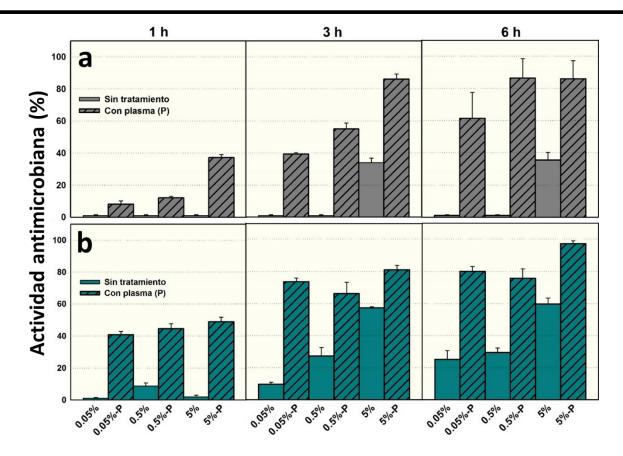


Figura 7.14. Actividad antibacteriana de nanocompuestos PP/nAg y PP/nCu en función del tratamiento con plasma sobre *S. aureus*. Análisis antibacteriano determinado a partir de la interacción de a) PP/nAg y b) PP/nCu en diferentes concentraciones a partir del cálculo de sobrevivencia bacteriana de *S. aureus*.

Los cambios físicos (rugosidad y exposición de nanopartículas) y químicos (inserción de nitrógeno y oxígeno superficial) generados por el tratamiento con plasma de argón incrementan de forma significativa la actividad antibacteriana de los nanocompuestos PP/nAg y PP/nCu¹³¹. A pesar de que existe una dependencia aparente en la actividad antibacteriana en la concentración de nanopartículas y en el tiempo de interacción, no se observó efecto antimicrobiano significativo en las concentraciones de 0.05 % y 0.5 % de los nanocompuestos PP/nAg después del tratamiento con plasma a los tiempos evaluados, lo que sugiere que probablemente no haya nanopartículas expuestas en la superficie, asociado con la baja dispersión de las nAg en el polímero.



Por otro lado, se determinó la actividad antibacteriana de los nanocompuestos PP/nAg y PP/nCu al contacto con *P. aeruginosa* (**Figura 7.15**). En este caso, se puede observar que la actividad antimicrobiana tanto de los nanocompuestos PP/nAg como de PP/nCu es superior que los resultados obtenidos con *S. aureus*, lo que corrobora las diferencias en el efecto bactericida en función de la pared celular bacteriana. La actividad antibacteriana de los nanocompuestos PP/nAg al 0.05 % (**Fig. 7.15-a**) en una etapa inicial (1 h) no presentan efecto inhibitorio, mientras que al ser sometida a plasma incrementa su efectividad en función del tiempo de interacción, alcanzando la completa inhibición de crecimiento a las 6 horas de contacto. Cabe resaltar que el efecto antimicrobiano nuevamente es superior en los nanocompuestos erosionados con plasma, y que el efecto es dependiente del tiempo de interacción. Dada la mayor susceptibilidad de *P. aeruginosa* al contacto con los nanocompuestos, en las concentraciones de 0.5 y 5 % p/p ya se observa la completa inhibición de crecimiento bacteriano a partir de las 3 horas de contacto con los microorganismos, por lo que el efecto antimicrobiano es superior en un tiempo de interacción corto en comparación con lo reportado por otros autores 119,142.



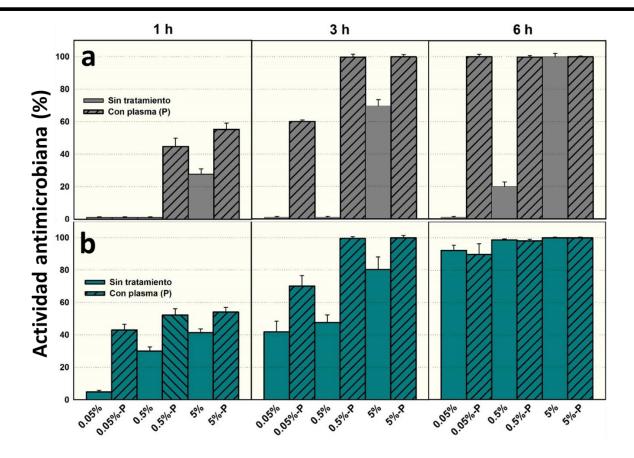


Figura 7.15. Actividad antibacteriana de nanocompuestos PP/nAg y PP/nCu en función del tratamiento con plasma sobre *P. aeruginosa*. Análisis antibacteriano determinado a partir de la interacción de a) PP/nAg y b) PP/nCu en diferentes concentraciones a partir del cálculo de sobrevivencia bacteriana de *P. aeruginosa*.

Es importante mencionar que en ambos casos la actividad antibacteriana incrementa de manera significativa en los nanocompuestos sometidos a tratamiento con plasma, en donde los nanocompuestos con nCu presentaron mejor efectividad en comparación con los nanocompuestos formulados con nAg, lo que sugiere que el incremento en la exposición superficial de las nanopartículas es un factor determinante para que se lleve a cabo el proceso de actividad antimicrobiana en la superficie de los nanocompuestos.

Fortunati y col. 143 determinaron la actividad antibacteriana de nanocompuestos de PLGA/nAg de 20 a 80 nm sobre *S. aureus* y *E. coli* preparados mediante el mezclado en



solución y su posterior tratamiento superficial con plasma de oxígeno, en donde encontraron que los nanocompuestos formulados al 7 % p/p sin tratamiento presentaron un efecto antibacteriano cercano a 20 % a partir de las 3 h de contacto, el cual incrementa a 25 % después de 24 h de interacción. Las muestras sometidas a tratamiento con plasma de oxígeno presentaron actividad antibacteriana cercana al 80 % después de 24 h de interacción tanto con Gram (+) como con Gram (-). Comparando los resultados obtenidos por estos autores con los presentados en el presente estudio, los nanocompuestos de PP/nAg 5 % presentan un efecto antibacteriano por encima del 80 % desde las 3 horas de contacto, por lo que el tratamiento con plasma de argón aunado a la dispersión de las NPs en el polímero promueven el incremento significativo del efecto bactericida en comparación con lo encontrado por otros autores, tomando en cuenta que el tamaño de partícula es similar al empleado en el presente trabajo.

En el caso de los nanocompuestos con cobre, el efecto antibacteriano es por mucho superior en las muestras sometidas a tratamiento con plasma. Palza y col. 15 determinaron el efecto antibacteriano de nanocompuestos con nCu preparados a partir del mezclado en fundido sobre E. coli, en donde encontraron que el 10 % de nCu en el polímero inhibe el crecimiento de la mitad de la carga bacteriana inicial después de 1 h de interacción. Por otro lado, Delgado y col. 95 reportaron la actividad antibacteriana de nanocompuestos de PP/nCu al 5 % preparados mediante mezclado en fundido, en donde encontraron un efecto del 95 % de inhibición de crecimiento bacteriano después de 4 h de interacción. Ambos autores coinciden en que el efecto antimicrobiano está directamente relacionado con la concentración de NPs dentro del polímero y que el mecanismo de inhibición de crecimiento es meramente iónico, puesto que no detectaron señales asociadas a cobre y sus óxidos en la superficie de los nanocompuestos. Al comparar los resultados anteriores, en el presente trabajo se reporta actividad antimicrobiana por encima del 90 % a partir de 3 horas de interacción con P. aeruginosa (Gram -) en los nanocompuestos PP/nCu formulados con 0.5 % p/p, mientras que los nanocompuestos PP/nCu 0.05, 0.5 y 5 % sometidos a tratamiento por plasma inhiben por completo el crecimiento de S. aureus y P. aeruginosa después de 6 h de interacción. Es



importante mencionar que tanto las nCu y sus respectivos óxidos (CuO y Cu₂O) presentan alta eficacia antimicrobiana al interaccionar con ambos microorganismos⁶¹.

A pesar de que el efecto antimicrobiano de las nAg ya es conocido, son pocos los trabajos que abordan el efecto comparativo entre los nanocompuestos formulados con nAg y nCu bajo las mismas condiciones de interacción. La eficacia en el efecto antimicrobiano de los nanocompuestos PP/nCu puede ser atribuida a diversos factores, incluyendo principalmente la liberación de iones, la rugosidad superficial, la exposición de las NPs y el incremento en la hidrofilicidad¹⁴⁴. El mecanismo de acción que se propone para los nanomateriales obtenidos en el presente trabajo es a partir de la posible liberación de iones metálicos sobre la superficie del nanocompuesto aunado al incremento en la rugosidad y la polaridad del material, promoviendo la interacción iónica con microorganismos suspendidos en un medio líquido, dando como resultado el daño irreversible a las células bacterianas.

Con el objetivo de profundizar en el mecanismo antimicrobiano de NPs metálicas y su incorporación a matrices poliméricas para la preparación de nanocompuestos, se analizó el efecto de la interacción entre bacterias y nAg/nCu, efectuando principalmente el análisis del daño celular en bacterias y la posible alteración de sus biomoléculas más importantes.



7.5. Análisis del efecto de la Interacción entre Células Bacterianas y NPs Metálicas

A continuación se presenta el análisis de diversos procesos de interacción entre NPs metálicas (nAg y nCu) y bacterias Gram (-) (*P. aeruginosa* y *E. coli*) en una etapa primaria de daño a partir del uso de biosensores bacterianos, la evaluación de la integridad de la membrana y los cambios a nivel estructural como parte del mecanismo primario y en una etapa avanzada de interacción a partir del análisis de biomoléculas específicas (mecanismo secundario).

7.5.1. Respuesta de Biosensores Bacterianos a la Interacción con nAg y nCu

Recientemente, una de las herramientas más empleadas para el monitoreo de la citotoxicidad de nanomateriales es el uso de biosensores biológicos, ya que permiten detectar una respuesta frente a un estímulo específico y en consecuencia, producir el daño celular¹⁰⁶. Para tal efecto, se emplearon cuatro biosensores bacterianos diseñados y caracterizados por Padilla-Martínez y col. 2014 (manuscrito en preparación), los cuales responden al daño a membrana (FabA), estrés oxidativo (KatG), daño a proteínas (DnaK) y daño al material genético (RecA). Primeramente, se evaluó la respuesta de cada biosensor bacteriano a estímulos específicos (**Figura 7.16**). Es importante mencionar que las bacterias presentan una ligera fluorescencia basal, debido en parte a su manipulación y al medio en el que se lleva a cabo la interacción.



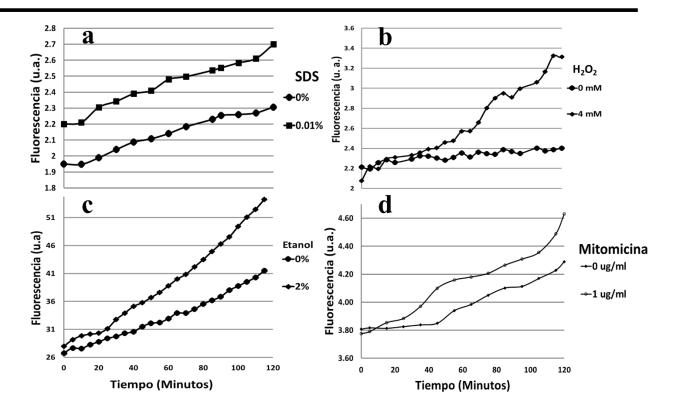


Figura 7.16. Validación de biosensores bacterianos de *E. coli* con controles (+) de estímulo a daño específico. a) Daño a membrana producido por SDS en biosensor FabA, b) Daño por estrés oxidativo producido por H₂O₂ en biosensor KatG, c) Daño a proteínas producido por etanol en biosensor DnaK y d) Daño producido en ADN producido por mitomicina en biosensor RecA.

Una vez validada la eficacia de los biosensores, se evaluó su respuesta frente a las nAg y las nCu. En la **Figura 7.17** se presentan los datos de fluorescencia obtenidos a partir de la respuesta del biosensor FabA al daño en membrana celular al interaccionar con nAg y nCu. La presencia de nAg (**Fig. 7.17-a**) activa el promotor de FabA de manera discreta en comparación con el control. Por otro lado, en la **Fig. 7.17-b** se presenta la respuesta del biosensor en presencia de nCu, en donde la fluorescencia se incrementa en función del tiempo de interacción con las nCu. A pesar de que la concentración de nAg ($100 \mu g/mL$) es superior a la concentración de nCu ($70 \mu g/mL$), esta última produce mayor daño en la membrana bacteriana.



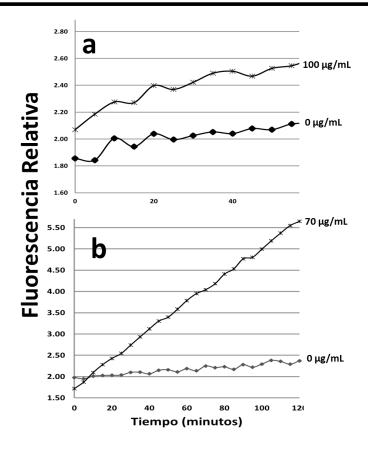


Figura 7.17. Respuesta del biosensor FabA al daño en membrana generado por nAg y nCu. Fluorescencia producida por *E. coli* bajo el control del promotor FabA en respuesta a: a) nAg y b) nCu.

Se determinó la respuesta del biosensor al daño producido por estrés oxidativo mediado por el promotor KatG en respuesta a la presencia de nAg y nCu (**Figura 7.18**). En el caso de la interacción con nAg (**Fig. 7.18-a**) no se aprecia una respuesta significativa en la expresión de fluorescencia, mientras que en el caso de la interacción con nCu (**Fig. 7.18-b**) hay un incremento significativo en la emisión de fluorescencia en función del tiempo de interacción con las nCu. La interacción de la misma concentración de nCu determinó un incremento en la expresión de fluorescencia asociada a la formación de ROS, incrementando el estrés oxidativo celular, el cual es superior en nCu comparado con nAg¹⁴⁵.



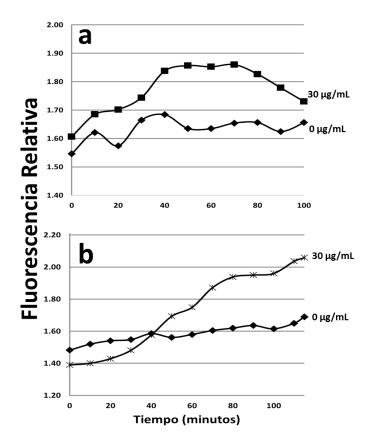


Figura 7.18. Respuesta del biosensor KatG al estrés oxidativo generado por nAg y nCu. Fluorescencia producida por *E. coli* bajo el control del promotor KatG en respuesta a:

a) nAg y b) nCu.

Para observar emisión de fluorescencia en el biosensor que responde frente al estímulo producido por el daño a proteínas (DnaK) se realizó la interacción de 30 μg/mL de nAg y 10 μg/mL de nCu (**Figura 7.19**). En el caso de la interacción del biosensor con nAg (**Fig. 7.19-a**) se observa un ligero incremento en la emisión de fluorescencia en comparación con el control. Un comportamiento similar se presentó en la interacción con nCu (**Fig. 7.19-b**), en donde el incremento de la fluorescencia se encuentra en función del tiempo de interacción. En este caso también la emisión de fluorescencia es mayor en los biosensores expuestos con nCu en comparación con nAg. Bajo las mismas condiciones, se determinó que la interacción de las NPs produce emisión de fluorescencia en respuesta al daño a proteínas, posiblemente relacionadas con la pared celular bacteriana, ocasionando daños significativos en etapas tempranas de interacción.



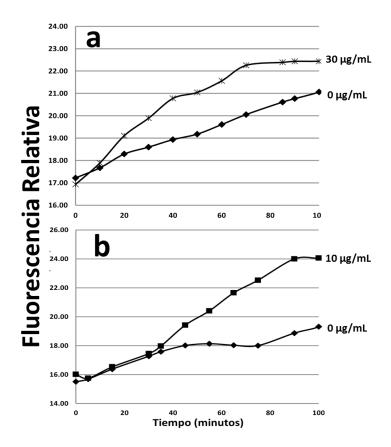


Figura 7.19. Respuesta del biosensor DnaK al daño a proteínas generado por nAg y nCu. Fluorescencia producida por *E. coli* bajo el control del promotor DnaK en respuesta a: a) nAg y b) nCu.

Finalmente, se realizó la interacción del biosensor que responde frente al daño al material genético celular, denominado RecA, empleando nAg y nCu (**Figura 7.20**). Se observó que la presencia de 10 μg/mL de nAg (**Fig. 7.20-a**) produce un ligero incremento en la fluorescencia en comparación con el control, comportamiento semejante que ocurre con la interacción de nCu (**Fig. 7.20-b**), a una concentración menor (5 μg/mL). Lo anterior sugiere que las células responden al daño al ADN celular, independientemente si este daño se está reparando por los sistemas de auto reparación bacterianos¹⁴⁶.



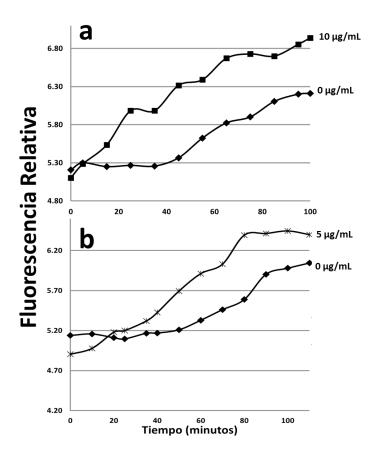


Figura 7.20. Respuesta del biosensor RecA al daño al ADN generado por nAg y nCu. Fluorescencia producida por *E. coli* bajo el control del promotor RecA en respuesta a: a) nAg y b) nCu.

De acuerdo con los resultados obtenidos con los diferentes biosensores bacterianos, las nCu y las nAg generan un daño primario generalizado, ya que hubo respuesta por daño a membrana, proteínas, ADN y se generaron ROS. Sin embargo, es claro que la respuesta al daño generada por la interacción con nCu es mayor con respecto al daño producido por nAg. Asimismo, los biosensores expuestos a nCu mostraron una respuesta significativa de daño a membrana.



7.5.2. Efecto de la Interacción de nAg y nCu sobre la Integridad de la Membrana

Para evaluar la integridad de la membrana celular de *E. coli* en una etapa temprana de interacción con nAg y nCu, se utilizaron fluorocromos que emiten fluorescencia cuando estos penetran la membrana celular. Para ello se empleó la mezcla de los fluorocromos Syto 9/ioduro de propidio. El fluorocromo Syto 9 presenta la capacidad de difundir libremente dentro de la membrana celular emitiendo fluorescencia verde en todas las bacterias, mientras que el ioduro de propidio (IP) únicamente penetra en las bacterias que perdieron la integridad de su membrana por daño o ruptura. En la **Figura 7.21** se presentan las imágenes de las bacterias que fueron teñidas con los 2 fluorocromos, en donde se observa que después de 2 horas de interacción con 50 μg/mL de nAg y nCu, se incrementa la proporción de bacterias dañadas con respecto a las células vivas, en comparación con el control. Lo anterior sugiere que la interacción de nAg y nCu con *E. coli* produce alteración en la integridad de la membrana bacteriana, lo que podría desencadenar la muerte de las bacterias¹¹².



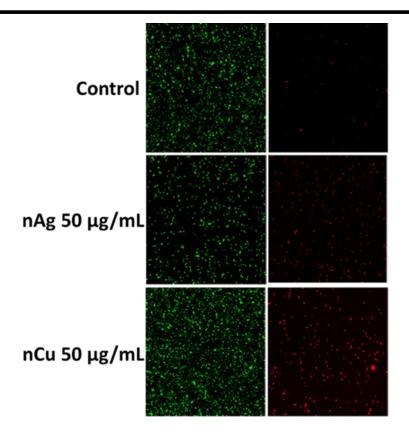


Figura 7.21. Efecto de NPs metálicas sobre la integridad de la membrana bacteriana después de 2 horas de interacción con fluorocromos vitales. Imágenes de microscopia de epifluorescencia de células de *E. coli* expuestas a nAg y nCu. Fluorescencia verde (Syto 9) para células íntegras y fluorescencia roja (IP) para células dañadas.

Se incubaron diferentes concentraciones de nCu con *E. coli* durante 2 horas y se determinó la integridad de la membrana bacteriana. En la **Figura 7.22** se presenta el incremento en la cantidad de células dañadas a medida de que se incrementa la concentración de NPs, lo que indica que el efecto es dependiente de la concentración. Sin embargo no se aprecian diferencias significativas en tiempos inferiores a 1 hora de interacción.



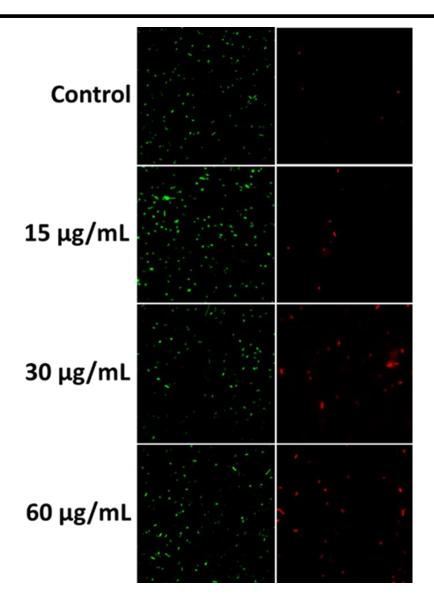


Figura 7.22. Efecto de diferentes concentraciones de nCu sobre la integridad de la membrana bacteriana después de 2 horas de interacción con fluorocromos vitales. Imágenes de epifluorescencia de células de *E. coli* expuestas a diferentes concentraciones de nCu. Fluorescencia verde (Syto 9) para células íntegras y fluorescencia roja (IP) para células dañadas.

Choi y col.²⁵ mencionan que el contacto de 1 µg/mL de iones y nAg con *E. coli* no modifica la integridad de la membrana celular a partir del marcaje con fluorocromos, por lo que consideran que la concentración de NPs es predeterminante para poder apreciar un efecto significativo. En comparación con las nAg, se puede observar que el incremento en la



cantidad de células dañadas se presenta en menores concentraciones al contacto con nCu, por lo que éstas últimas producen mayor actividad antimicrobiana al contacto con *E. coli*, lo cual coincide con los resultados obtenidos de actividad antimicrobiana de NPs y su posterior evaluación al ser incorporadas en la matriz de PP.

Bajo estas condiciones, es posible que la presencia de nAg y nCu en una etapa inicial de interacción con bacterias produzcan daños significativos sobre la membrana bacteriana, lo que conlleva a la muerte celular.

7.5.3. Efecto de la Interacción de nAg y nCu sobre las Estructuras Celulares de *P. aeruginosa*

Con el objetivo de visualizar cambios estructurales en células bacterianas por la presencia de NPs metálicas en diferentes concentraciones, se utilizó como modelo la bacteria Gram (-) P. aeruginosa y se llevó a cabo la interacción con diferentes concentraciones de nAg y nCu durante 1 hora a 37 °C, para posteriormente ser procesadas para la obtención de imágenes a partir de microscopia electrónica de transmisión (TEM). Se analizaron cortes longitudinales y transversales de las bacterias interaccionadas embebidas en una resina epóxica y su comparación con las bacterias sin NPs. En la Figura 7.23 se pueden observar las imágenes del control en diferentes magnificaciones y el efecto de la interacción de nAg en concentraciones de 100 µg/mL y 200 µg/mL. En las **Figs. 7.23-a** y **7.23-b** se aprecia que las bacterias presentan una longitud promedio de 1.45 µm por un ancho de 0.5 µm, además presentan una pared celular de alrededor de 30 nm de espesor, lo cual coincide con la morfología característica de *P. aeruginosa*¹⁴⁷. Por otro lado, la interacción de 100 μg/mL de nAg (Figs. 7.23-c y 7.23-d) produce la interacción de las NPs con la estructura de la pared celular bacteriana. Al incrementar la concentración a 200 µg/mL (Figs. 7.23-e y 7.23-f) se puede apreciar a las nAg adheridas y agregadas sobre la superficie bacteriana, y que en algunas zonas de la bacteria existe penetración de las partículas en la pared celular. El comportamiento de adhesión y posible penetración de las nAg sobre la pared celular



bacteriana sugiere la alteración de la permeabilidad bacteriana y, por lo tanto, daño irreversible en las células, lo que puede dar como resultado la muerte celular^{8,101}.

Para determinar la interacción de nCu con *P. aeruginosa*, se obtuvieron las micrografías TEM después de incubar con 50 μg/mL y 100 μg/mL (**Figura 7.24**) En la imagen se puede apreciar que en la concentración de 50 μg/mL se presentan algunos aglomerados de NPs que se encuentran localizados en la periferia de las bacterias (**Fig. 7.24-c**). Con la concentración de 100 μg/mL se observa una saturación de NPs en el área (**Fig. 7.24-c**) y se observan bacterias dañadas, las cuales pierden su morfología característica. En la **Figura 7.24-f** se puede apreciar que las nCu tienden a adherirse al contorno de la pared celular, y que esta adhesión produce una alteración irreversible de la membrana, induciendo la penetración de las NPs dentro de la bacteria. Es importante mencionar que las bacterias interaccionadas con nCu a una concentración de 100 μg/mL presentan una cantidad significativa de restos celulares, en donde se observa la presencia de NPs aglomeradas, atribuido al posible daño y ruptura celular de las bacterias al interaccionar con altas concentraciones de nCu.



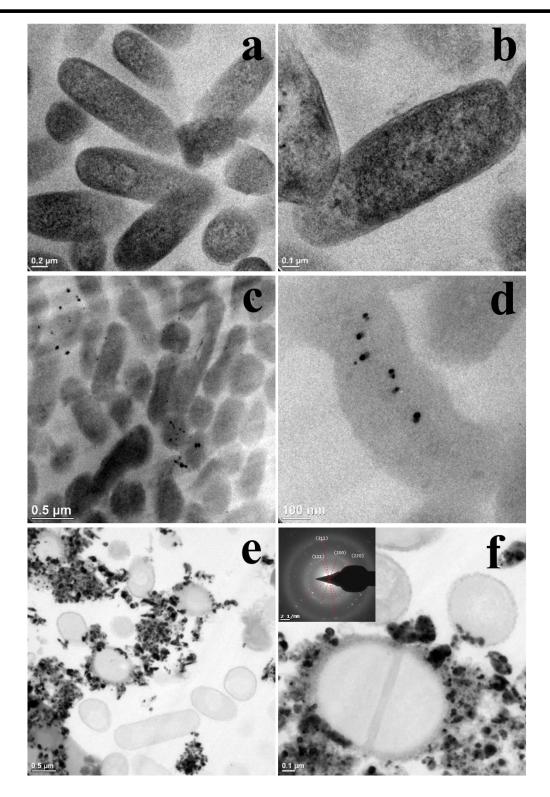


Figura 7.23. Micrografías TEM de *P. aeruginosa* **y su interacción con nAg.** Efecto de la interacción de 100 μg/mL (c y d) y 200 μg/mL (e y f) de nAg durante 1 hora a 37 °C y su comparación con bacterias sin nanopartículas (a y b).



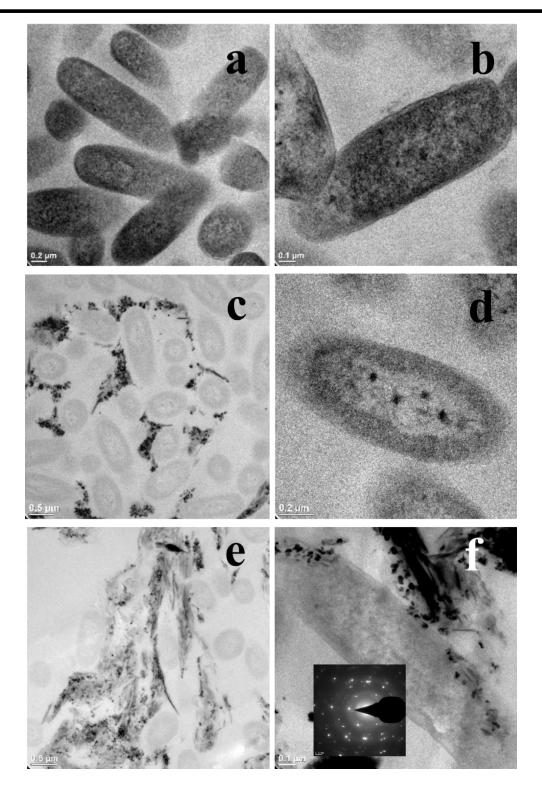


Fig. 7.24. Micrografías TEM de *P. aeruginosa* **y su interacción con nCu.** Efecto de la interacción de 50 μg/mL (c y d) y 100 μg/mL (e y f) de nCu durante 1 hora a 37 °C y su comparación con bacterias sin nanopartículas (a y b).



Es posible que en una etapa inicial de interacción de nAg y nCu con bacterias (1 hora) el proceso de daño se lleve a cabo por la adhesión de las NPs a la membrana celular, lo que coincide con los resultados obtenidos a partir de TEM, dando como resultado cambios en la composición estructural de las células y por lo tanto la modificación de su permeabilidad¹⁴⁸, corroborado por resultados obtenidos a partir del marcaje con fluorocromos. De acuerdo a lo anterior, es posible que en una etapa inicial de interacción se produzcan daños principalmente a nivel de membrana y proteínas asociadas con la pared celular bacteriana. Los cambios en la estructura de la membrana y la permeabilidad celular podrán permitir la posible penetración de las NPs y sus iones correspondientes con el objetivo de ejercer su efecto tóxico en función del tiempo de interacción hasta inducir la muerte celular.

7.5.4. Inhibición de Crecimiento de *P. aeruginosa* y *E. coli* producido por nAg y nCu

Con el objetivo principal de establecer las condiciones óptimas de tiempos de incubación y concentración de NPs para la evaluación de daño en función del tiempo de contacto, se obtuvieron las cinéticas de crecimiento correspondientes a la interacción de diferentes concentraciones nAg y nCu con *P. aeruginosa* y *E. coli*. En la **Figura 7.25** se presenta la cinética de inhibición de crecimiento de *P. aeruginosa* al contacto con diferentes concentraciones de nAg y nCu. En el caso de la interacción con nAg durante 6 h (**Fig. 7.25-a**) se aprecia que la concentración de 100 µg/mL presenta un crecimiento similar al control, mientras que la concentración de 200 µg/mL inhibe el 70 % del crecimiento bacteriano. Por otro lado, en la interacción con diferentes concentraciones de nCu (**Fig. 7.25-b**) se observa que la inhibición de crecimiento es directamente proporcional a la concentración de NPs en el medio de interacción. Bajo las mismas condiciones de evaluación, las nCu presentan una mayor actividad antimicrobiana que las nAg.



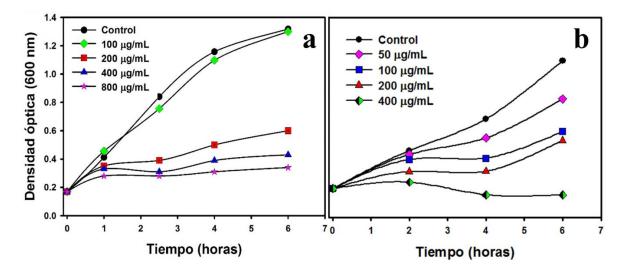


Figura 7.25. Efecto de nAg y nCu sobre el crecimiento de *P. aeruginosa*. Cinética de crecimiento de cultivos de *P. aeruginosa* en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de: a) nAg y b) nCu evaluadas a 37 °C.

Por otro lado, se obtuvieron las curvas de inhibición de crecimiento de *E. coli* portadora de ADN extracromosomal (plásmido) en presencia de diferentes concentraciones de nAg y nCu (**Figura 7.26**). En la interacción con nAg (**Fig. 7.26-a**) se puede observar que la concentración de 100 μg/mL se inhibe el 60 % de crecimiento de bacterias, mientras que la concentración de 200 μg/mL ya no presenta crecimiento bacteriano. En la interacción de diferentes concentraciones de nCu durante 6 h (**Fig. 7.26-b**) se aprecia que la concentración de 100 μg/mL inhibe el 10 % de crecimiento, mientras que la concentración de 200 μg/mL inhibe el 50 % de crecimiento bacteriano. Finalmente, la concentración de 400 μg/mL no presenta crecimiento de microorganismos.



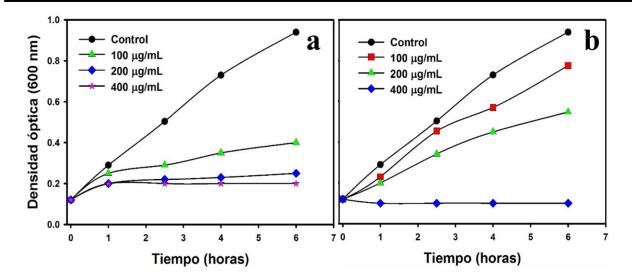


Figura 7.26. Efecto de nAg y nCu sobre el crecimiento de *E. coli***.** Cinética decrecimiento de cultivos de *E. coli* en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de: a) nAg y b) nCu evaluadas a 37° C.

De acuerdo con las curvas de inhibición de crecimiento obtenidas, se seleccionaron los tiempos de 2 y 6 horas de interacción para la evaluación de la integridad del material genético (ADNg y ADNp), daño en proteínas totales y la integridad de la estructura bacteriana, en función de su exposición frente a diferentes concentraciones de NPs.

7.5.5. Efecto de la Interacción de nAg y nCu sobre la Integridad del ADNg

El ADN se define como un polinucleótido que contiene toda la información genética e instrucciones de desarrollo y funcionamiento de todos los organismos vivos, en donde su principal función es heredar de una generación a otra las características que definen a un organismo. En el caso específico de bacterias, esta información se encuentra distribuida en el ADN genómico (ADNg)¹⁴⁹, el cual contiene toda la información necesaria para el funcionamiento celular y el ADN plasmídico (ADNp) que se define como el material extracromosomal circular que puede conferir algunas ventajas adaptativas a las bacterias, principalmente relacionadas con las resistencia a antibióticos¹⁵⁰.



Con el objetivo de evaluar el daño al material genético bacteriano, se realizó la extracción y purificación del ADNg de las muestras de P. aeruginosa cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de nAg y nCu durante 2 y 6 horas de interacción. Las muestras fueron obtenidas a partir de las curvas de inhibición de crecimiento presentadas en la Figura 7.25. El ADNg obtenido fue sometido a electroforesis en geles de agarosa, teñido y visualizado con luz UV. La degradación del ADNg se produce cuando la cadena helicoidal presenta rupturas significativas, las cuales se ven directamente reflejadas en la disminución de la intensidad de la banda principal, acompañada de un barrido, que es el indicativo de degradación. En la Figura 7.27 se presentan las imágenes de los geles obtenidos a partir de la interacción de P. aeruginosa con nAg y nCu en diferentes concentraciones. En la Fig. **7.27-a** se puede observar el ADNg de *P. aeruginosa* que no fue expuesto a NPs (control), en donde se encuentra una banda de un tamaño por encima de los 12 000 pb, lo cual refleja la integridad del material. El ADNg obtenido de bacterias expuestas a diferentes concentraciones de nAg presenta una banda similar a la del control sin señales aparentes de degradación. Es de resaltar que P. aeruginosa a pesar de que su crecimiento fue totalmente inhibido a las 6 horas de interacción en las concentraciones de 400 µg/mL y 800 µg/mL respectivamente, no se observan señales de degradación del material genético. Resultados similares fueron obtenidos al interaccionar P. aeruginosa con diferentes concentraciones de nCu (Fig. 7.27-b), en donde no se aprecian cambios significativos en la intensidad de las bandas asociados a procesos de degradación del ADNg obtenido. La disminución de la intensidad de la banda de ADNg procedente de bacterias expuestas a altas concentraciones de NPs, se debe principalmente a que la cantidad de bacterias bajo esas condiciones es muy baja.



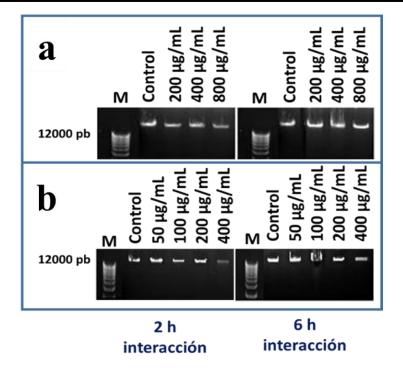


Figura 7.27. Evaluación de la integridad del ADNg de *P. aeruginosa* al interaccionar con nAg y nCu. Extracción del ADNg de bacterias incubadas a 2 y 6 horas con diferentes concentraciones de a) nAg y b) nCu. M: marcadores de tamaño molecular en pares de bases (pb).

El hecho de no observar una degradación aparente en el ADNg, no descarta la posibilidad de que el material genético haya sufrido rupturas específicas en la cadena helicoidal, las cuales no se alcanzan a visualizar a partir de un barrido en el ADNg¹⁵¹. Martínez-Gutiérrez y col. 152 demostraron que la exposición de altas concentraciones de nAg al contacto con células humanas producen daños al material genético, determinado a partir de ensayos cometa. A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se sugiere que el ADNg se encuentra físicamente protegido de un daño producido por potenciales agentes genotóxicos, tales como las NPs metálicas. Lo anterior no descarta que se estén llevando a cabo alteraciones específicas y que incluso puedan estar siendo reparadas por parte de sistema de autoreparación bacteriano, por lo cual es necesario la implementación de nuevas estrategias para la evaluación específica del daño al material genético celular.



7.5.6. Evaluación del Efecto Genotóxico de nAg y nCu sobre *P. aeruginosa* mediante RAPDs

Con el objetivo de determinar alteraciones específicas al material genético bacteriano asociados al daño generado por el contacto con diferentes concentraciones de nAg y nCu, se realizaron ensayos conocidos como RAPDs a partir del ADNg obtenido de las bacterias interaccionadas a diferentes tiempos. En el caso de que el ADN presente ruptura de cadenas asociadas a daño, el patrón de amplificación de bandas se verá modificado, incrementando la amplificación de bandas de bajo peso molecular. Bajo este criterio, el análisis de daño al ADN mediante RAPDs resulta ser una herramienta con mayor sensibilidad para la detección de la ruptura de cadena helicoidal. Para ello, se realizó un ensayo de amplificación aleatoria RAPDs a partir de ADN purificado de *P. aeruginosa*, en donde se probaron un total de 16 oligonucleótidos. El objetivo del ensayo fue seleccionar aquellos oligonucleótidos con los que se amplifique un mayor número de bandas en el ADNg control que permita visualizar la presencia de diferentes pesos moleculares de las bandas y, por lo tanto, al colocar el templado sometido a interacción con NPs, poder apreciar cambios en la amplificación de bandas por efecto de las NPs.

En la **Figura 7.28** se presentan las imágenes obtenidas a partir de geles de electroforesis de los RAPDs de *P. aeruginosa* con los diferentes oligonucleótidos evaluados, en donde se observa que lo oligonucleótidos denominados E01, E03, E09 y 2 únicamente presentan una banda, por lo que su uso para la evaluación de daño al material genético no es de utilidad, mientras que los oligonucleótidos denominados E02, E05 y 6 presentan un amplio patrón de bandas de diferentes pesos moleculares, por lo que resultan candidatos efectivos para la evaluación del daño al material genético celular.



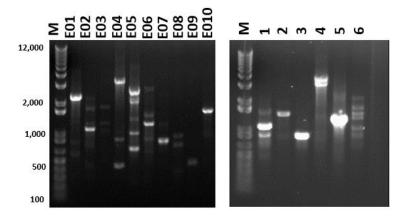


Figura 7.28. RAPDs de *P. aeruginosa* **en presencia de diferentes oligonucleótidos.**Amplificación mediante reacciones de PCR del ADNg de *P. aeruginosa* con la presencia de 16 oligonucleótidos de 10 bases. M: Marcador de diferentes tamaños moleculares en pares de bases (pb).

De acuerdo con estos resultados, se seleccionaron los oligonucleótidos E02, E05 y 6 puesto que presentaron perfiles de amplificación con diversas bandas que permiten la evaluación tanto de bandas de alto peso molecular como de mediano peso para realizar los ensayos de RAPDs con el ADNg que estuvo en contacto con diferentes concentraciones de nAg y nCu en función del tiempo. En la **Figura 7.29** se presentan los perfiles de amplificación de los oligonucleótidos E02, E05 y 6 a partir del ADNg de *P. aeruginosa* cultivada con diferentes concentraciones de nAg durante 2 y 6 horas de interacción. Con los oligonucleótidos E05 y 6 no se aprecian cambios significativos en los perfiles de amplificación, mientras que con el oligonucleótido E02 se aprecia un cambio en el perfil de bandas a altas concentraciones de nAg y en un tiempo de 6 horas, en donde de acuerdo a la curva de crecimiento, se inhibe por completo el crecimiento bacteriano. Con base a lo anterior, solo en condiciones extremas se alcanza a detectar un cambio en el perfil de amplificación, lo que sugiere un daño al ADNg al contacto con nAg en condiciones extremas de tiempo y concentración de partículas.



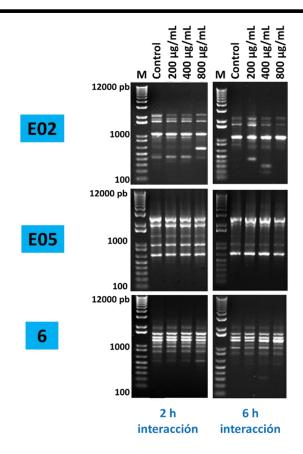


Figura 7.29. RAPDs de *P. aeruginosa* cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de nAg. Amplificación por PCR usando como templado el ADNg de bacterias incubadas con diferentes concentraciones de nAg y la separación de los productos en un gel de agarosa al 0.8 %. E02, E05 y 6 son los oligonucleótidos de 10 bases, M:

Marcadores de tamaño molecular en pares de bases (pb).

Bajo las mismas condiciones, se obtuvieron los perfiles de amplificación del ADNg de *P. aeruginosa* al contacto con diferentes concentraciones de nCu (**Figura 7.30**), en donde se observó un cambio en el perfil de amplificación con los tres oligonucleótidos empleados, encontrándose en todos los casos un cambio significativo en el perfil de bandas de amplificación a la mayor concentración de nCu analizada (400 μg/mL) en los tiempos de 2 y 6 horas de interacción. De acuerdo con estos resultados, es posible que la interacción de nAg y nCu produzca daños específicos sobre el ADNg de *P. aeruginosa* evaluado mediante RAPDs, y que este daño es superior con las nCu en comparación con el efecto producido por las nAg.



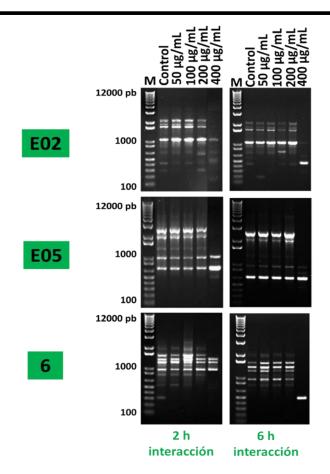


Figura 7.30. RAPDs de *P. aeruginosa* cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de nCu. Amplificación por PCR usando como templado el ADNg de bacterias incubadas con diferentes concentraciones de nCu y separación de los productos en un gel de agarosa al 0.8 %. E02, E05 y 6 son los oligonucleótidos de 10 bases. M: marcadores de tamaño molecular en pares de bases (pb).

Los daños al ADN que pueden ser detectados mediante el uso de la técnica RAPDs son la generación de rupturas en una de las hebras de la cadena helicoidal, o en un caso severo la ruptura de las 2 hebras, por lo que se pierde la integridad del material genético y se induce la muerte celular. En el caso particular de NPs de óxido de cobre (CuO), se ha reportado que su interacción con células humanas produce estrés oxidativo, debido principalmente a la formación de ROS lo que ocasiona daños al material genético por cortes o cambios en los pares de bases, induciendo la muerte celular 153-154.



7.5.7. Efecto de nAg y nCu sobre el ADNp

Se efectuó el análisis de la interacción de diferentes concentraciones de nAg y nCu directamente en contacto con el ADN plasmídico (ADNp) purificado libre de células y, además, se realizó el análisis sobre bacterias que contienen el plásmido y su posterior purificación para su evaluación a partir de la obtención de geles de agarosa y su separación en sus distintas formas estructurales. Para la evaluación directa de las NPs sobre el plásmido, éste se purificó a partir de células transformadas de E. coli TOP 10 con el plásmido pTZ19R. Se realizó la exposición con diferentes concentraciones de nAg y nCu durante 2 horas a temperatura ambiente. En la **Figura 7.31** se puede apreciar que el ADNp control presenta 3 bandas principales, las cuales corresponden a las tres conformaciones características de un plásmido: circular relajada (banda superior), enrollada (banda intermedia) y súper enrollada (banda inferior)¹⁵⁵. Los cambios en la intensidad de las bandas después de la interacción con NPs indican una alteración del plásmido, generalmente asociadas con el corte de una cadena, que produce la relajación del enrollamiento que generalmente presenta el plásmido. La interacción con nAg favorece la conformación enrollada, la cual es dependiente de la concentración de NPs en el medio, mientras que las nCu inducen un efecto superior al compararse con las nAg, bajo las mismas condiciones experimentales.



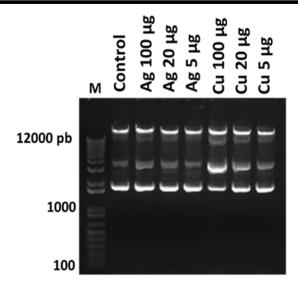


Figura 7.31. Efecto de la interacción directa de nAg y nCu sobre el ADNp de E. coli.

ADNp purificado de bacterias e incubado durante 2 horas con la presencia de diferentes concentraciones de nAg y nCu y separado mediante un gel de agarosa al 0.8 %. M: marcadores de diferentes tamaños moleculares en pares de bases (pb).

Por otro lado, al evaluar el efecto de nAg y nCu sobre el plásmido contenido en bacterias, y su posterior purificación para su análisis, no se apreciaron cambios significativos en la intensidad de las 3 conformaciones plasmídicas (**Figura 7.32**). Esto confirma que las bacterias por sí solas representan una barrera física que impide el contacto directo entre el ADNp y las NPs.



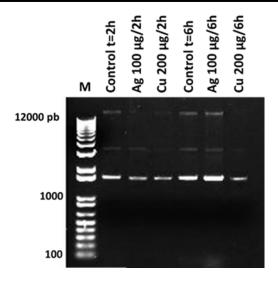


Figura 7.32. Efecto de la interacción de bacterias *E. coli* con nAg y nCu y la posterior extracción del ADNp. Obtención de ADNp de bacterias incubadas durante 2 y 6 h con 100 μg/mL y 200 μg/mL de nAg, y su separación mediante gel de agarosa al 0.8 %. M: marcadores de diferentes tamaños moleculares en pares de bases (pb).

La interacción directa entre plásmidos purificados y NPs metálicas produce cambios conformacionales asociados con la relajación del plásmido, lo cual puede ser atribuido a un posible daño, en donde las nCu producen un daño superior en comparación con el efecto obtenido por las nAg. Diversos autores señalan que los daños producidos al ADNp se encuentran directamente asociados con el estrés oxidativo que producen las NPs, en particular las que se encuentran en su estado oxidado, tales como óxido de cobre (CuO) y dióxido de titanio (TiO₂)¹⁵⁶⁻¹⁵⁷, que al liberar ROS generan mutaciones y la ruptura de cadenas de ADN, que dan como resultado la muerte celular.

De acuerdo con los resultados obtenidos, es posible que el material genético se encuentre físicamente protegido por la estructura celular bacteriana, por lo que no se alcanzan a percibir daños en el ADN total, únicamente se presentan cambios significativos al poner en contacto altas concentraciones de NPs de cobre como se demostró a partir de los ensayos RAPDs. Por otro lado, se determinó que el ADNp expuesto directamente con diferentes concentraciones de NPs sufre alteraciones en su conformación, lo cual significa que el material genético sufre



alteraciones al contacto con nAg y nCu. De acuerdo a lo anterior, es posible que la muerte bacteriana no sea una consecuencia directa de la interacción de NPs con su material genético, lo cual puede ser considerado como un evento secundario, relacionado con el daño previo a la membrana celular obtenido a partir de las imágenes TEM y los resultados encontrados con el uso de biosensores bacterianos.

7.5.8. Efecto de nAg y nCu sobre el Perfil de Proteínas Totales de *P. aeruginosa*

Con el objetivo de determinar si se presentan cambios significativos en el perfil de proteínas totales de *P. aeruginosa* que reflejen su degradación como consecuencia de su interacción con NPs, se realizó la extracción de proteínas totales de bacterias incubadas con diferentes concentraciones de nAg y nCu interaccionadas durante 2 y 6 h. Las muestras procesadas fueron cargadas en un gel de acrilamida para la separación de proteínas totales de acuerdo a su peso molecular. En la **Figura 7.33** se presentan los perfiles de proteínas que comprenden principalmente a las proteínas que se encuentren entre 20 a 250 kDa. En este caso no se aprecia un cambio significativo en el perfil de proteínas a las 2 y 6 horas de interacción con diferentes concentraciones de nAg y nCu. Estos resultados indican que las bacterias que permanecen íntegras después de la interacción con NPs presentan un perfil de proteínas totales aparentemente normal. La evaluación de proteínas específicas y/o su actividad deberá ser evaluada.



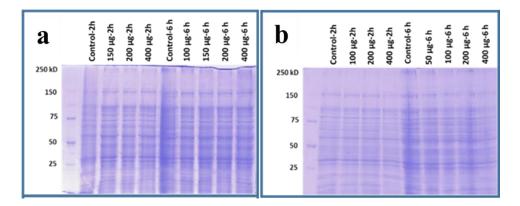


Figura 7.33. Perfil de proteínas totales de *P. aeruginosa* después de su interacción con **nAg y nCu.** Efecto de la incubación de bacterias con diferentes concentraciones de a) nAg y b) nCu durante 2 y 6 h. Separación de productos mediante geles de acrilamida al 10 % y teñidos con azul de Comassie. Carril 1 marcador de pesos moleculares en kDa.



7.6. Mecanismo Antimicrobiano de NPs Metálicas

Existen varios reportes en la literatura que mencionan los procesos de interacción de nAg y nCu, así como los daños que éstas generan sobre algunos procesos o biomoléculas de las células bacterianas^{24,106}. En el presente trabajo se propone una estrategia integral para estudiar el mecanismo antibacteriano de NPs metálicas (nAg y nCu) bajo las mismas condiciones experimentales en una etapa inicial de interacción (mecanismo primario) y en bacterias ya afectadas irreversiblemente en una etapa tardía de interacción (mecanismo secundario). De acuerdo con los resultados obtenidos, el mecanismo antimicrobiano de NPs metálicas puede ser abordado en función del tiempo de interacción con las bacterias y los daños producidos por el contacto entre ambos.

En la **Figura 7.34** se presenta el modelo propuesto para el mecanismo primario de nAg y nCu sobre las bacterias. En una etapa temprana de interacción se produce la adhesión de las NPs en la superficie de la pared celular bacteriana y la posible liberación de iones en solución, demostrado a partir de imágenes de microscopia electrónica de transmisión, lo que produce cambios importantes en la permeabilidad de la membrana ya que incorpora fluorocromos vitales para células dañadas (ioduro de propidio) en función de la concentración de NPs, demostrando la muerte celular por la presencia de nAg y sobre todo de nCu. Producto de esta alteración inicial a nivel de membrana, las bacterias responden al estrés expresando el gen FabA de respuesta a daño membranal, lo cual fue determinado a partir del uso de biosensores bacterianos que emiten fluorescencia cuando se altera la membrana celular. Se ha descrito que las NPs tienen la capacidad de liberar iones en un medio líquido, lo que genera estrés oxidativo en las células 153,157, lo cual fue evidenciado por la emisión de fluorescencia del biosensor KatG, que regula la expresión del gen KatG en respuesta a la formación de ROS y la inducción al estrés oxidativo. Como consecuencia de la alteración a la membrana celular y/o del estrés oxidativo, algunas proteínas ya sea membranales o del citosol pueden perder su estructura u oxidarse, lo cual fue detectado por un biosensor que expresa el gen DnaK cuando se dañan las proteínas. Aunque el ADN también es un blanco del estrés oxidativo¹⁵⁸, no se detectó una alteración significativa en la etapa inicial. El daño y la respuesta de las bacterias en una etapa inicial en general dieron respuesta al contacto con nAg y nCu en



función del daño a proteínas, membrana, ADN y estrés oxidativo. Es importante mencionar que la respuesta al daño fue superior en todos los casos al contacto con las nCu en comparación con nAg, lo que sugiere que las nCu tienden a ser más tóxicas al contacto con microorganismos y, por lo tanto, presentan mayor efecto antimicrobiano.



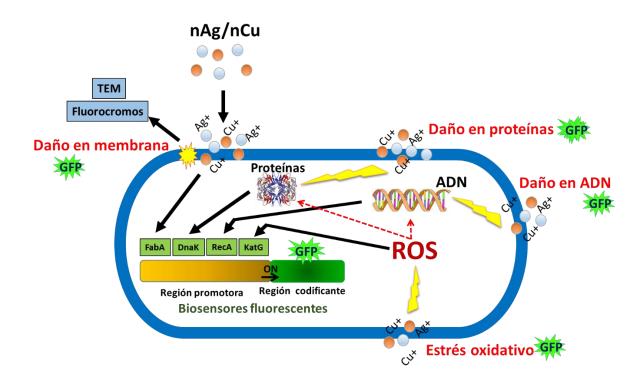


Figura 7.34. Modelo propuesto para el mecanismo primario de actividad antimicrobiana de NPs metálicas. Propuesta formulada a partir de la interacción de nAg y nCu con bacterias Gram (-) en una etapa inicial.



En la **Figura 7.35** se presenta la propuesta correspondiente al mecanismo secundario de actividad antimicrobiana de NPs metálicas. A partir del análisis de RAPDs se determinó que únicamente se presenta daño en el ADNg de las bacterias en concentraciones que inhiben por completo el crecimiento bacteriano y en tiempo de interacción largos. En particular, la evidencia del daño al ADN generado por nAg se observó solamente con la mayor concentración y a tiempos largos de incubación, mientras que con nCu el daño se aprecia desde una etapa inicial (2 h) a diferentes concentraciones de NPs. Debido a que no se observó una respuesta significativa de daño a ADN como mecanismo primario a partir del uso de biosensores, se sugiere que esta biomolécula puede estar físicamente protegida por la estructura celular, ya que inicialmente no existe un contacto directo entre el ADN y las NPs, lo cual fue corroborado cuando se realizó la exposición directa entre el ADNp y diferentes concentraciones de nAg y nCu.



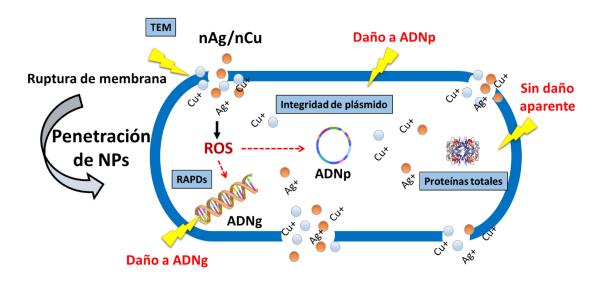


Figura 7.35. Modelo propuesto para el mecanismo secundario de actividad antimicrobiana de NPs metálicas. Propuesta formulada a partir de la interacción de nAg y nCu con bacterias Gram (-) en una etapa tardía.



Bajo este criterio, es posible que en etapas tardías de interacción entre NPs metálicas y bacterias se estén llevando a cabo diversos fenómenos de manera simultánea: la penetración de las NPs y la liberación en el interior de la célula de los iones y especies reactivas de la superficie de las NPs, y posteriormente la interacción y en consecuencia el daño a biomoléculas como el ADNg y el ADNp por la formación de ROS capaces de alterar el metabolismo celular, y en consecuencia la muerte bacteriana.

7.7.Mecanismo Antimicrobiano de Nanocompuestos Poliméricos Erosionados con Plasma

La interacción de NPs metálicas con bacterias Gram (-) en diversas etapas de contacto, determinó que es posible que las nanopartículas liberen iones de su superficie, los cuales son capaces de producir ROS que al contacto con bacterias producen daños en biomoléculas específicas y en corto plazo, la muerte celular. En el caso de nanocompuestos poliméricos, la presencia de cargas nanométricas restringe esta interacción, puesto que las NPs quedan embebidas en el polímero, interfiriendo en el proceso de interacción¹⁵.

Bajo este criterio, el presente trabajo describe el proceso de erosión y activación superficial de nanocompuestos a partir de plasma de argón con el objetivo de incrementar la exposición superficial de las NPs sin que sean desprendidas del polímero. De acuerdo a lo anterior, el modelo propone que la interacción de los nanocompuestos PP/nAg y PP/nCu erosionados con bacterias suspendidas en un ambiente líquido incrementa la liberación de iones de la superficie de las partículas, aunado al incremento en la rugosidad superficial y la hidrofilicidad de la película que promueven el contacto entre los nanocompuestos y las bacterias (**Figura 7.36**). Esta interacción incrementa el contacto entre las bacterias y los iones metálicos que pueden adherirse a la pared celular y producir daños irreversibles, que en consecuencia inhiben por completo el crecimiento microbiano en un tiempo inferior a las 3 horas de interacción.



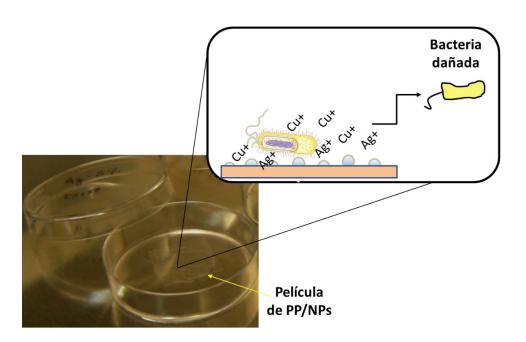
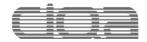


Figura 7.36. Modelo propuesto para el mecanismo de actividad antimicrobiana de nanocompuestos PP/nAg y PP/nCu erosionados con plasma. Efecto antibacteriano de películas formuladas con diferentes cantidades de nAg y nCu y su interacción con bacterias patógenas en un ambiente líquido que favorece la liberación de iones en la superficie de los nanocompuestos y produce la inhibición de crecimiento bacteriano.



8. CONCLUSIONES

El presente trabajo describe la actividad antimicrobiana y el mecanismo de interacción entre bacterias y NPs metálicas incorporadas a polipropileno, los cuales fueron erosionados con plasma. De acuerdo a lo anterior, se puede concluir:

Las nAg y nCu empleadas presentan actividad antimicrobiana bajo diferentes condiciones de crecimiento, siendo las nCu más efectivas sobre *P. aeruginosa* y *S. aureus* en comparación con las nAg.

La incorporación de NPs en PP mediante mezclado en fundido asistido con ultrasonido incrementó la dispersión de las nCu en comparación con las nAg en el polímero, además de que el tratamiento con plasma de argón incrementa la exposición superficial de las NPs y la rugosidad de los nanocompuestos sin afectar sus propiedades en masa.

El plasma de argón produce sitios activos capaces de reaccionar con el aire, promoviendo la inserción superficial de nitrógeno y oxígeno, lo que incrementa la polaridad de los nanocompuestos. El cambio en la superficie por efecto del tratamiento con plasma incrementó el efecto antimicrobiano de los nanocompuestos. Bajo las mismas condiciones se determinó que la exposición de NPs y el efecto antimicrobiano fue superior en los nanocompuestos formulados con nCu comparado con los formulados con nAg.

La interacción de nAg y nCu con bacterias Gram (-) en etapas tempranas de contacto producen daños en la membrana celular, en proteínas asociadas a membrana y al material genético, obtenido a partir de la respuesta de biosensores bacterianos. El análisis de microscopia TEM demostró la adhesión de NPs a la pared celular y alteraciones en la membrana. De acuerdo a lo anterior, la estructura celular representa una barrera física que impide la interacción de NPs con el material genético, ya que en etapas tardías las NPs y sus



iones liberados penetran a las bacterias, ocasionando daños severos en el ADN celular, lo que induce a la muerte celular.

Se propone un modelo del mecanismo antimicrobiano de nAg y nCu en función del tiempo de interacción y del daño producido a biomoléculas. Bajo las mismas condiciones de crecimiento, las nCu producen un daño superior comparado con el efecto producido por nAg. De acuerdo con los resultados obtenidos, es posible que el mecanismo antimicrobiano de nanocompuestos poliméricos se efectúe por efecto iónico de las nanopartículas expuestas en la superficie y la interacción con microorganismos suspendidos en un ambiente líquido, lo que evita la difusión de las NPs al exterior y, por lo tanto, se disminuyen los efectos tóxicos de nanomateriales funcionales sin intervenir en sus características antimicrobianas.



9. TRABAJO A FUTURO

- Determinación del daño a proteínas y actividades enzimáticas específicas.
- Realizar pruebas de daño a biomoléculas específicas (ADNg, ADNp y proteínas) empleando iones metálicos de Ag y Cu, con el objetivo de comparar el efecto iónico contra el efecto de las nanopartículas al contacto con microorganismos patógenos.
- Efectuar pruebas de liberación de iones de los nanocompuestos poliméricos erosionados con plasma a corto, mediano y largo plazo con el objetivo de cuantificar los iones liberados y relacionarlos con el efecto antimicrobiano.
- Evaluación del efecto citotóxico y genotóxico de nanocompuestos poliméricos al contacto con líneas celulares específicas, en función del tiempo de contacto y de su aplicación final.



10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Rosenthal, V. D.; Maki, D. G.; Jamulitrat, S.; Medeiros, E. A.; Todi, S. K.; Gomez, D. Y.; Leblebicioglu, H.; Abu Khader, I.; Miranda Novales, M. G.; Berba, R.; et al. International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) Report, Data Summary for 2003-2008, Issued June 2009. *Am. J. Infect. Control* **2010**, *38*, 95–104.e2.
- (2) Weber, D. J. Nosocomial Infections in the ICU *. CHEST J. 1999, 115, 34S.
- (3) HORAN, T.; GAYNES, R.; MARTONE, W.; JARVIS, W.; GRACEEMORI, T. CDC Definitions of Nosocomial Surgical Site Infections, 1992: A Modification of CDC Definitions of Surgical Wound Infections. *Am. J. Infect. Control* **1992**, *20*, 271–274.
- (4) Jones, M.; Ying, J.; Huttner, B.; Evans, M.; Maw, M.; Nielson, C.; Rubin, M. A.; Greene, T.; Samore, M. H. Relationships between the Importation, Transmission, and Nosocomial Infections of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus: An Observational Study of 112 Veterans Affairs Medical Centers. *Clin. Infect. Dis.* **2014**, 58, 32–39.
- (5) Melzer, M.; Eykyn, S. J.; Gransden, W. R.; Chinn, S. Is Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus More Virulent than Methicillin-Susceptible S. Aureus? A Comparative Cohort Study of British Patients with Nosocomial Infection and Bacteremia. *Clin. Infect. Dis.* **2003**, *37*, 1453–1460.
- (6) Levin, A. S.; Barone, A. A.; Penço, J.; Santos, M. V; Marinho, I. S.; Arruda, E. A.; Manrique, E. I.; Costa, S. F. Intravenous Colistin as Therapy for Nosocomial Infections Caused by Multidrug-Resistant Pseudomonas Aeruginosa and Acinetobacter Baumannii. *Clin. Infect. Dis.* **1999**, 28, 1008–1011.
- (7) Lautenbach, E.; Patel, J. B.; Bilker, W. B.; Edelstein, P. H.; Fishman, N. O. Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Escherichia Coli and Klebsiella Pneumoniae: Risk Factors for Infection and Impact of Resistance on Outcomes. *Clin. Infect. Dis.* **2001**, *32*, 1162–1171.
- (8) Sondi, I.; Salopek-Sondi, B. Silver Nanoparticles as Antimicrobial Agent: A Case Study on E. Coli as a Model for Gram-Negative Bacteria. *J. Colloid Interface Sci.* **2004**, *275*, 177–182.
- (9) Foster, H. A.; Ditta, I. B.; Varghese, S.; Steele, A. Photocatalytic Disinfection Using Titanium Dioxide: Spectrum and Mechanism of Antimicrobial Activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *90*, 1847–1868.
- (10) Rai, M.; Yadav, A.; Gade, A. Silver Nanoparticles as a New Generation of Antimicrobials. *Biotechnol. Adv.* **2009**, *27*, 76–83.



- (11) Nanu, M.; Schoonman, J.; Goossens, A. Nanocomposite Three-Dimensional Solar Cells Obtained by Chemical Spray Deposition. *Nano Lett.* **2005**, *5*, 1716–1719.
- (12) Faupel, F.; Zaporojtchenko, V.; Greve, H.; Schürmann, U.; Chakravadhanula, V. S. K.; Hanisch, C.; Kulkarni, A.; Gerber, A.; Quandt, E.; Podschun, R. Deposition of Nanocomposites by Plasmas. *Contrib. to Plasma Phys.* **2007**, *47*, 537–544.
- (13) Dubas, S. T.; Kumlangdudsana, P.; Potiyaraj, P. Layer-by-Layer Deposition of Antimicrobial Silver Nanoparticles on Textile Fibers. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2006**, 289, 105–109.
- (14) Zhang, W.; Zhang, Y.; Ji, J.; Yan, Q.; Huang, A.; Chu, P. K. Antimicrobial Polyethylene with Controlled Copper Release. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2007**, *83*, 838–844.
- (15) Palza Sebastian; Delgado, Katherine; Salazar, Oriana; Fuenzalida, Victor; Avila, Jonathan I.; Figueroa, Guillermo; Quijada, Raúl, H. G. Toward Tailor-Made Biocide Materials Based on Poly(propylene)/copper Nanoparticles. *Macromol. Rapid Commun.* **2010**, *31*, 563–567.
- (16) España-Sánchez, B. L.; Ávila-Orta, C. A.; Padilla-Vaca, F.; Neira-Velázquez, M. G.; González-Morones, P.; Rodríguez-González, J. A.; Hernández-Hernández, E.; Rangel-Serrano, Á.; Barriga-C., E. D.; Yate, L.; et al. Enhanced Antibacterial Activity of Melt Processed Poly(propylene) Ag and Cu Nanocomposites by Argon Plasma Treatment. *Plasma Process. Polym.* **2014**, *11*, 353–365.
- (17) Lingaiah, S.; Sadler, R.; Ibeh, C.; Shivakumar, K. A Method of Visualization of Inorganic Nanoparticles Dispersion in Nanocomposites. *Compos. Part B Eng.* 2008, 39, 196–201.
- (18) Auffan, M.; Rose, J.; Bottero, J.-Y.; Lowry, G. V; Jolivet, J.-P.; Wiesner, M. R. Towards a Definition of Inorganic Nanoparticles from an Environmental, Health and Safety Perspective. *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 634–641.
- (19) Guo, Z.; Pereira, T.; Choi, O.; Wang, Y.; Hahn, H. T. Surface Functionalized Alumina Nanoparticle Filled Polymeric Nanocomposites with Enhanced Mechanical Properties. *J. Mater. Chem.* **2006**, *16*, 2800.
- (20) Choi, S. U. S.; Eastman, J. A. Enhancing Thermal Conductivity of Fluids with Nanoparticles. **1995**.
- (21) Fedlheim, D. L.; Foss, C. A. Metal Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Applications; 2001.



- (22) Ramyadevi, J.; Jeyasubramanian, K.; Marikani, A.; Rajakumar, G.; Rahuman, A. A. Synthesis and Antimicrobial Activity of Copper Nanoparticles. *Mater. Lett.* **2012**, *71*, 114–116.
- (23) Ruparelia, J. P.; Chatterjee, A. K.; Duttagupta, S. P.; Mukherji, S. Strain Specificity in Antimicrobial Activity of Silver and Copper Nanoparticles. *Acta Biomater.* **2008**, *4*, 707–716.
- (24) Hajipour, M. J.; Fromm, K. M.; Ashkarran, A. A.; Jimenez de Aberasturi, D.; de Larramendi, I. R.; Rojo, T.; Serpooshan, V.; Parak, W. J.; Mahmoudi, M. Antibacterial Properties of Nanoparticles. *Trends Biotechnol.* **2012**, *30*, 499–511.
- (25) Choi, O.; Deng, K. K.; Kim, N.-J.; Ross, L.; Surampalli, R. Y.; Hu, Z. The Inhibitory Effects of Silver Nanoparticles, Silver Ions, and Silver Chloride Colloids on Microbial Growth. *Water Res.* **2008**, *42*, 3066–3074.
- (26) Atiyeh, B. S.; Costagliola, M.; Hayek, S. N.; Dibo, S. A. Effect of Silver on Burn Wound Infection Control and Healing: Review of the Literature. *Burns* **2007**, *33*, 139–148.
- (27) Wang, H.; Qiao, X.; Chen, J.; Ding, S. Preparation of Silver Nanoparticles by Chemical Reduction Method. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2005**, 256, 111–115.
- (28) Chen, J. P.; Lim, L. . Key Factors in Chemical Reduction by Hydrazine for Recovery of Precious Metals. *Chemosphere* **2002**, *49*, 363–370.
- (29) Kim, D.; Jeong, S.; Moon, J. Synthesis of Silver Nanoparticles Using the Polyol Process and the Influence of Precursor Injection. *Nanotechnology* **2006**, *17*, 4019–4024.
- (30) Li, T.; Park, H. G.; Choi, S.-H. Γ-Irradiation-Induced Preparation of Ag and Au Nanoparticles and Their Characterizations. *Mater. Chem. Phys.* **2007**, *105*, 325–330.
- (31) Salkar, R. A.; Jeevanandam, P.; Aruna, S. T.; Koltypin, Y.; Gedanken, A. The Sonochemical Preparation of Amorphous Silver Nanoparticles. *J. Mater. Chem.* **1999**, 9, 1333–1335.
- (32) Ankamwar, B.; Damle, C.; Ahmad, A.; Sastry, M. Biosynthesis of Gold and Silver Nanoparticles Using <I>Emblica Officinalis</I> Fruit Extract, Their Phase Transfer and Transmetallation in an Organic Solution. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2005**, *5*, 1665–1671.
- (33) Mukherjee, P.; Ahmad, A.; Mandal, D.; Senapati, S.; Sainkar, S. R.; Khan, M. I.; Parishcha, R.; Ajaykumar, P. V.; Alam, M.; Kumar, R.; et al. Fungus-Mediated



- Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Immobilization in the Mycelial Matrix: A Novel Biological Approach to Nanoparticle Synthesis. *Nano Lett.* **2001**, *1*, 515–519.
- (34) Jiang, H.; Moon, K.; Zhang, Z.; Pothukuchi, S.; Wong, C. P. Variable Frequency Microwave Synthesis of Silver Nanoparticles. *J. Nanoparticle Res.* **2006**, *8*, 117–124.
- (35) Sun, Y.; Xia, Y. Shape-Controlled Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles. *Science* **2002**, 298, 2176–2179.
- (36) Moon, K.-S.; Dong, H.; Maric, R.; Pothukuchi, S.; Hunt, A.; Li, Y.; Wong, C. P. Thermal Behavior of Silver Nanoparticles for Low-Temperature Interconnect Applications. *J. Electron. Mater.* **2005**, *34*, 168–175.
- (37) Lok, C.-N.; Ho, C.-M.; Chen, R.; He, Q.-Y.; Yu, W.-Y.; Sun, H.; Tam, P. K.-H.; Chiu, J.-F.; Che, C.-M. Silver Nanoparticles: Partial Oxidation and Antibacterial Activities. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2007**, *12*, 527–534.
- (38) Jiang, Z.-J.; Liu, C.-Y.; Sun, L.-W. Catalytic Properties of Silver Nanoparticles Supported on Silica Spheres. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 1730–1735.
- (39) Lee, K.-S.; El-Sayed, M. A. Gold and Silver Nanoparticles in Sensing and Imaging: Sensitivity of Plasmon Response to Size, Shape, and Metal Composition. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 19220–19225.
- (40) Kim, J. S.; Kuk, E.; Yu, K. N.; Kim, J.-H.; Park, S. J.; Lee, H. J.; Kim, S. H.; Park, Y. K.; Park, Y. H.; Hwang, C.-Y.; et al. Antimicrobial Effects of Silver Nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2007**, *3*, 95–101.
- (41) Pal, S.; Tak, Y. K.; Song, J. M. Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium Escherichia Coli. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 1712–1720.
- (42) Panacek, A.; Kvítek, L.; Prucek, R.; Kolar, M.; Vecerova, R.; Pizúrova, N.; Sharma, V. K.; Nevecna, T.; Zboril, R. Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 16248–16253.
- (43) Kethirabalan Chitra and Gurusamy Annadurai. Antibacterial Activity of pH-Dependent Biosynthesized Silver Nanoparticles against Clinical Pathogen. *Biomed Res. Int.* **2014**, *2014*, 6.
- (44) AshaRani, P. V; Low Kah Mun, G.; Hande, M. P.; Valiyaveettil, S. Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells. *ACS Nano* **2009**, *3*, 279–290.



- (45) Hussain, S. M.; Hess, K. L.; Gearhart, J. M.; Geiss, K. T.; Schlager, J. J. In Vitro Toxicity of Nanoparticles in BRL 3A Rat Liver Cells. *Toxicol. In Vitro* **2005**, *19*, 975–983.
- (46) Carlson, C.; Hussain, S. M.; Schrand, A. M.; Braydich-Stolle, L. K.; Hess, K. L.; Jones, R. L.; Schlager, J. J. Unique Cellular Interaction of Silver Nanoparticles: Size-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 13608–13619.
- (47) Maneerung, T.; Tokura, S.; Rujiravanit, R. Impregnation of Silver Nanoparticles into Bacterial Cellulose for Antimicrobial Wound Dressing. *Carbohydr. Polym.* **2008**, 72, 43–51.
- (48) Furno, F.; Morley, K. S.; Wong, B.; Sharp, B. L.; Arnold, P. L.; Howdle, S. M.; Bayston, R.; Brown, P. D.; Winship, P. D.; Reid, H. J. Silver Nanoparticles and Polymeric Medical Devices: A New Approach to Prevention of Infection? *J. Antimicrob. Chemother.* **2004**, *54*, 1019–1024.
- (49) Cioffi Luisa; Ditaranto, Nicoletta; Tantillo, Giuseppina; Ghibelli, Lina; Sabbatini, Luigia; Bleve-Zacheo, Teresa; D'Alessio, Maria; Zambonin, P. Giorgio; Traversa, Enrico, N. T. Copper Nanoparticle/Polymer Composites with Antifungal and Bacteriostatic Properties. *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 5255–5262.
- (50) Lee, Y.; Choi, J.-R.; Lee, K. J.; Stott, N. E.; Kim, D. Large-Scale Synthesis of Copper Nanoparticles by Chemically Controlled Reduction for Applications of Inkjet-Printed Electronics. *Nanotechnology* **2008**, *19*, 415604.
- (51) Magdassi, S.; Grouchko, M.; Kamyshny, A. Copper Nanoparticles for Printed Electronics: Routes Towards Achieving Oxidation Stability. *Materials (Basel).* **2010**, *3*, 4626–4638.
- (52) Park, B. K.; Jeong, S.; Kim, D.; Moon, J.; Lim, S.; Kim, J. S. Synthesis and Size Control of Monodisperse Copper Nanoparticles by Polyol Method. *J. Colloid Interface Sci.* **2007**, *311*, 417–424.
- (53) Dhas C. Paul; Gedanken, A., N. A. Synthesis, Characterization and Properties of Metallic Copper Nanoparticles. *Chem. Mater.* **1998**, *10*, 1446–1452.
- (54) Ohde, H.; Hunt, F.; Wai, C. M. Synthesis of Silver and Copper Nanoparticles in a Water-in-Supercritical-Carbon Dioxide Microemulsion. *Chem. Mater.* **2001**, *13*, 4130–4135.
- (55) Garg, J.; Poudel, B.; Chiesa, M.; Gordon, J. B.; Ma, J. J.; Wang, J. B.; Ren, Z. F.; Kang, Y. T.; Ohtani, H.; Nanda, J.; et al. Enhanced Thermal Conductivity and Viscosity of Copper Nanoparticles in Ethylene Glycol Nanofluid. *J. Appl. Phys.* **2008**, *103*, 074301.



- (56) Jeong, S.; Woo, K.; Kim, D.; Lim, S.; Kim, J. S.; Shin, H.; Xia, Y.; Moon, J. Controlling the Thickness of the Surface Oxide Layer on Cu Nanoparticles for the Fabrication of Conductive Structures by Ink-Jet Printing. *Adv. Funct. Mater.* 2008, 18, 679–686.
- (57) Crooks, R. M.; Zhao, M.; Sun, L.; Chechik, V.; Yeung, L. K. Dendrimer-Encapsulated Metal Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Applications to Catalysis. *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 181–190.
- (58) Salavati-Niasari, M.; Davar, F. Synthesis of Copper and copper(I) Oxide Nanoparticles by Thermal Decomposition of a New Precursor. *Mater. Lett.* **2009**, *63*, 441–443.
- (59) Pedersen Shiliang, D. B.; Wan. Surface Plasmon Resonance Spectra of 2.8 ± 0.5 Nm Diameter Copper Nanoparticles in Both Near and Far Fields. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 17493–17499.
- (60) Ren Dawei; Cheng, Eileen W. C.; Vargas-Reus, Miguel A.; Reip, Paul; Allaker, Robert P., G. H. Characterisation of Copper Oxide Nanoparticles for Antimicrobial Applications. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2009**, *33*, 587–590.
- (61) Ren, G.; Hu, D.; Cheng, E. W. C.; Vargas-Reus, M. A.; Reip, P.; Allaker, R. P. *Characterisation of Copper Oxide Nanoparticles for Antimicrobial Applications*; 2009; Vol. 33, pp. 587–590.
- (62) Raffi, M.; Mehrwan, S.; Bhatti, T. M.; Akhter, J. I.; Hameed, A.; Yawar, W.; Hasan, M. M. Investigations into the Antibacterial Behavior of Copper Nanoparticles against Escherichia Coli. *Ann. Microbiol.* **2010**, *60*, 75–80.
- (63) Bogdanović, U.; Lazić, V.; Vodnik, V.; Budimir, M.; Marković, Z.; Dimitrijević, S. Copper Nanoparticles with High Antimicrobial Activity. *Mater. Lett.* **2014**, *128*, 75–78.
- (64) R. Betancourt-Galindo, P. Y. Reyes-Rodriguez, B. A. Puente-Urbina, C. A. Avila-Orta, O. S. Rodríguez-Fernández, G. Cadenas-Pliego, R. H. Lira-Saldivar, and L. A. G.-C. Synthesis of Copper Nanoparticles by Thermal Decomposition and Their Antimicrobial Properties. *J. Nanomater.* **2014**, *2014*.
- (65) Buzea, C.; Pacheco, I. I.; Robbie, K. Nanomaterials and Nanoparticles: Sources and Toxicity. *Biointerphases* **2007**, *2*, MR17.
- (66) Chen, Z.; Meng, H.; Xing, G.; Chen, C.; Zhao, Y.; Jia, G.; Wang, T.; Yuan, H.; Ye, C.; Zhao, F.; et al. Acute Toxicological Effects of Copper Nanoparticles in Vivo. *Toxicol. Lett.* **2006**, *163*, 109–120.



- (67) Kissel J.H.; Meyer, J.A., J. . H. Handbook of Polypropylene and Polypropylene Composites; Karian, H. G., Ed.; Marcel Dekker: USA, 1999.
- (68) Moore, E. P. *Polypropylene Handbook*; Hanser: Munich, 1996; p. 439.
- (69) Eckstein J.; Friedrich, C.; Maier, R. D.; Sassmannshausen, J.; Bochmann, M.; Mulhaupt, R., A. . S. Determination of Plateau Moduli and Entanglement Molecular Weights of Isotactic, Syndiotactic, and Atactic Polypropylenes Synthesized with Metallocene Catalysts. *Macromolecules* **1998**, *31*, 1335–1340.
- (70) Lu, B.; Chung, T. C. Synthesis of Maleic Anhydride Grafted Polyethylene and Polypropylene, with Controlled Molecular Structures. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2000**, *38*, 1337–1343.
- (71) Fu, Z.; Fan, Z.; Zhang, Y.; Xu, J. Chain Structure of Polyethylene/polypropylene in-Reactor Alloy Synthesized in Gas Phase with Spherical Ziegler–Natta Catalyst. *Polym. Int.* **2004**, *53*, 1169–1175.
- (72) Fillon, B.; Wittmann, J. C.; Lotz, B.; Thierry, A. Self-Nucleation and Recrystallization of Isotactic Polypropylene (α Phase) Investigated by Differential Scanning Calorimetry. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* **1993**, *31*, 1383–1393.
- (73) Thomann, R.; Wang, C.; Kressler, J.; Mülhaupt, R. On the Γ-Phase of Isotactic Polypropylene. *Macromolecules* **1996**, 29, 8425–8434.
- (74) Finch, C. A. *Handbook of Polymer Science and Technology*; Cheremisinoff, N. P., Ed.; Marcel Dekker Inc, 1989; Vol. 1: Synthes, pp. 277–278.
- (75) Hudson, J. E.; Frith, J. E.; Donose, B. C.; Rondeau, E.; Mills, R. J.; Wolvetang, E. J.; Brooke, G. P.; Cooper-White, J. J. A Synthetic Elastomer Based on Acrylated Polypropylene Glycol Triol with Tunable Modulus for Tissue Engineering Applications. *Biomaterials* **2010**, *31*, 7937–7947.
- (76) Alariqi, S. A. S.; Pratheep Kumar, A.; Rao, B. S. M.; Singh, R. P. Stabilization of Γ-Sterilized Biomedical Polyolefins by Synergistic Mixtures of Oligomeric Stabilizers. Part II. Polypropylene Matrix. *Polym. Degrad. Stab.* **2007**, *92*, 299–309.
- (77) Rafiee Javad; Wang, Zhou; Song, Huaihe; Yu, Zhong-Zhen; Koratkar, Nikhil, M. A.; Rafie. Enhanced Mechanical Properties of Nanocomposites at Low Graphene Content. *ACS Nano* **2009**, *3*, 3884–3890.
- (78) Tjong, S. C. Structural and Mechanical Properties of Polymer Nanocomposites. *Mater. Sci. Eng. R Reports* **2006**, *53*, 73–197.



- (79) Leszczyńska, A.; Njuguna, J.; Pielichowski, K.; Banerjee, J. R. Polymer/montmorillonite Nanocomposites with Improved Thermal Properties. *Thermochim. Acta* **2007**, *453*, 75–96.
- (80) Du, F.; Scogna, R. C.; Zhou, W.; Brand, S.; Fischer, J. E.; Winey, K. I. Nanotube Networks in Polymer Nanocomposites: Rheology and Electrical Conductivity. *Macromolecules* **2004**, *37*, 9048–9055.
- (81) Kong, H.; Song, J.; Jang, J. Photocatalytic Antibacterial Capabilities of TiO(2)-Biocidal Polymer Nanocomposites Synthesized by a Surface-Initiated Photopolymerization. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 5672–5676.
- (82) Dallas, P.; Sharma, V. K.; Zboril, R. Silver Polymeric Nanocomposites as Advanced Antimicrobial Agents: Classification, Synthetic Paths, Applications, and Perspectives. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2011**, *166*, 119–135.
- (83) Sahoo, N. G.; Rana, S.; Cho, J. W.; Li, L.; Chan, S. H. Polymer Nanocomposites Based on Functionalized Carbon Nanotubes. *Prog. Polym. Sci.* **2010**, *35*, 837–867.
- (84) Su, S.; Jiang, D. D.; Wilkie, C. A. Poly(methyl Methacrylate), Polypropylene and Polyethylene Nanocomposite Formation by Melt Blending Using Novel Polymerically-Modified Clays. *Polym. Degrad. Stab.* **2004**, *83*, 321–331.
- (85) Yeo, S. Y.; Jeong, S. H. Preparation and Characterization of Polypropylene/silver Nanocomposite Fibers. *Polym. Int.* **2003**, *52*, 1053–1057.
- (86) Sumita, M.; Tsukumo, Y.; Miyasaka, K.; Ishikawa, K. Tensile Yield Stress of Polypropylene Composites Filled with Ultrafine Particles. *J. Mater. Sci.* **1983**, *18*, 1758–1764.
- (87) Chae, D. W.; Kim, B. C. Physical Properties of Isotactic Poly(propylene)/Silver Nanocomposites: Dynamic Crystallization Behavior and Resultant Morphology. *Macromol. Mater. Eng.* **2005**, *290*, 1149–1156.
- (88) Priya, L.; Jog, J. P. Poly(vinylidene Fluoride)/clay Nanocomposites Prepared by Melt Intercalation: Crystallization and Dynamic Mechanical Behavior Studies. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* **2002**, *40*, 1682–1689.
- (89) Gonon, P.; Boudefel, A. Electrical Properties of Epoxy/silver Nanocomposites. *J. Appl. Phys.* **2006**, *99*, 024308.
- (90) Cruz-Delgado, V. J.; España-Sánchez, B. L.; Avila-Orta, C. A.; Medellín-Rodríguez, F. J. Nanocomposites Based on Plasma-Polymerized Carbon Nanotubes and Nylon-6. Polym. J. 2012, 44, 952–958.



- (91) Liu, T.; Song, X.; Guo, Z.; Dong, Y.; Guo, N.; Chang, X. Prolonged Antibacterial Effect of Silver Nanocomposites with Different Structures. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **2014**, *116*, 793–796.
- (92) Yilmaz, O.; Karesoja, M.; Adiguzel, A. C.; Zengin, G.; Tenhu, H. Nanocomposites Based on Crosslinked Polyacrylic Latex/silver Nanoparticles for Waterborne High-Performance Antibacterial Coatings. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2014**, *52*, 1435–1447.
- (93) Damm, C.; Münstedt, H. Kinetic Aspects of the Silver Ion Release from Antimicrobial Polyamide/silver Nanocomposites. *Appl. Phys. A* **2008**, *91*, 479–486.
- (94) Xia, X.; Xie, C.; Cai, S. Non-Isothermal Crystallization Behavior of Low-Density Polyethylene/copper Nanocomposites. *Thermochim. Acta* **2005**, *427*, 129–135.
- (95) Delgado, K.; Quijada, R.; Palma, R.; Palza, H. Polypropylene with Embedded Copper Metal or Copper Oxide Nanoparticles as a Novel Plastic Antimicrobial Agent. *Lett. Appl. Microbiol.* **2011**, *53*, 50–54.
- (96) France, R. M.; Short, R. D. Plasma Treatment of Polymers: The Effects of Energy Transfer from an Argon Plasma on the Surface Chemistry of Polystyrene, and Polypropylene. A High-Energy Resolution X-Ray Photoelectron Spectroscopy Study. *Langmuir* **1998**, *14*, 4827–4835.
- (97) Liston, E. M.; Martinu, L.; Wertheimer, M. R. Plasma Surface Modification of Polymers for Improved Adhesion: A Critical Review. J. Adhes. Sci. Technol. 1993, 7, 1091–1127.
- (98) Poncin-Epaillard, F.; Legeay, G. Surface Engineering of Biomaterials with Plasma Techniques. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2003**, *14*, 1005–1028.
- (99) Favia, P.; d'Agostino, R. Plasma Treatments and Plasma Deposition of Polymers for Biomedical Applications. *Surf. Coatings Technol.* **1998**, 98, 1102–1106.
- (100) Amanatides, E.; Mataras, D.; Katsikogianni, M.; Missirlis, Y. F. Plasma Surface Treatment of Polyethylene Terephthalate Films for Bacterial Repellence. *Surf. Coatings Technol.* **2006**, *200*, 6331–6335.
- (101) Li, W.-R.; Xie, X.-B.; Shi, Q.-S.; Zeng, H.-Y.; Ou-Yang, Y.-S.; Chen, Y.-B. Antibacterial Activity and Mechanism of Silver Nanoparticles on Escherichia Coli. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *85*, 1115–1122.
- (102) Morones, J. R.; Elechiguerra, J. L.; Camacho, A.; Holt, K.; Kouri, J. B.; Ramírez, J. T.; Yacaman, M. J. The Bactericidal Effect of Silver Nanoparticles. *Nanotechnology* **2005**, *16*, 2346–2353.



- (103) Pramanik, A.; Laha, D.; Bhattacharya, D.; Pramanik, P.; Karmakar, P. A Novel Study of Antibacterial Activity of Copper Iodide Nanoparticle Mediated by DNA and Membrane Damage. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2012**, *96*, 50–55.
- (104) Dorjnamjin, D.; Ariunaa, M.; Shim, Y. K. Synthesis of Silver Nanoparticles Using Hydroxyl Functionalized Ionic Liquids and Their Antimicrobial Activity. *Int. J. Mol. Sci.* **2008**, *9*, 807–820.
- (105) Feng, Q. L.; Wu, J.; Chen, G. Q.; Cui, F. Z.; Kim, T. N.; Kim, J. O. A Mechanistic Study of the Antibacterial Effect of Silver Ions on Escherichia Coli and Staphylococcus Aureus. *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *52*, 662–668.
- (106) Li, F.; Lei, C.; Shen, Q.; Li, L.; Wang, M.; Guo, M.; Huang, Y.; Nie, Z.; Yao, S. Analysis of Copper Nanoparticles Toxicity Based on a Stress-Responsive Bacterial Biosensor Array. *Nanoscale* **2013**, *5*, 653–662.
- (107) Salton, M. R. J.; Horne, R. W. Studies of the Bacterial Cell Wall II. Methods of Preparation and Some Properties of Cell Walls. *Biochim. Biophys. Acta* **1951**, *7*, 177–197.
- (108) Cabeen, M. T.; Jacobs-Wagner, C. Bacterial Cell Shape. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 601–610.
- (109) Nair, S.; Sasidharan, A.; Divya Rani, V. V; Menon, D.; Nair, S.; Manzoor, K.; Raina, S. Role of Size Scale of ZnO Nanoparticles and Microparticles on Toxicity toward Bacteria and Osteoblast Cancer Cells. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2009**, *20 Suppl 1*, S235–41.
- (110) Chen, K. L.; Bothun, G. D. Nanoparticles Meet Cell Membranes: Probing Nonspecific Interactions Using Model Membranes. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, 873–880.
- (111) Horst, A. M.; Vukanti, R.; Priester, J. H.; Holden, P. A. An Assessment of Fluorescence- and Absorbance-Based Assays to Study Metal-Oxide Nanoparticle ROS Production and Effects on Bacterial Membranes. *Small* **2013**, *9*, 1753–1764.
- (112) Norman, R. S.; Stone, J. W.; Gole, A.; Murphy, C. J.; Sabo-Attwood, T. L. Targeted Photothermal Lysis of the Pathogenic Bacteria, Pseudomonas Aeruginosa, with Gold Nanorods. *Nano Lett.* **2008**, *8*, 302–306.
- (113) Hatchett, D. W.; White, H. S. Electrochemistry of Sulfur Adlayers on the Low-Index Faces of Silver. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 9854–9859.
- (114) Kumar, A.; Pandey, A. K.; Singh, S. S.; Shanker, R.; Dhawan, A. Engineered ZnO and TiO(2) Nanoparticles Induce Oxidative Stress and DNA Damage Leading to Reduced Viability of Escherichia Coli. *Free Radic. Biol. Med.* **2011**, *51*, 1872–1881.



- (115) Lok C.; Chen, R.; He, Q.; Yu, W.; Sun, H.; Tam, P.; Chiu, J.; Che, C., C. . H. Proteomic Analysis of the Mode of Antibacterial Action of Silver Nanoparticles. *J. Proteome Res.* **2006**, *5*, 916–924.
- (116) Tedesco, S.; Doyle, H.; Blasco, J.; Redmond, G.; Sheehan, D. Oxidative Stress and Toxicity of Gold Nanoparticles in Mytilus Edulis. *Aquat. Toxicol.* **2010**, *100*, 178–186.
- (117) Shrivastava, S.; Bera, T.; Roy, A.; Singh, G.; Ramachandrarao, P.; Dash, D. Characterization of Enhanced Antibacterial Effects of Novel Silver Nanoparticles. *Nanotechnology* **2007**, *18*, 225103.
- (118) Carlos Alberto ÁVILA-ORTA, COLUNGA Juan Guillermo MARTÍNEZ, BAQUÉZ Darío BUENO, LÓPEZ Cristina Elizabeth RAUDRY, DELGADO Víctor Javier CRUZ, MORONES Pablo GONZÁLEZ, Garza Janett Anaid Valdez, JUÁREZ María Elena ESPARZA, GONZÁLEZ Carlos José ESPINOZA, G. J. A. R. Continuous Method Assisted by Ultrasound with a Variable Amplitude and Frequency for the Preparation of Nanocompoundds Based on Polymers and Nanoparticles. US20120098163, WO2010117253A3, October 14, 2010.
- (119) Radetić, M.; Ilić, V.; Vodnik, V.; Dimitrijević, S.; Jovančić, P.; Šaponjić, Z.; Nedeljković, J. M. Antibacterial Effect of Silver Nanoparticles Deposited on Corona-Treated Polyester and Polyamide Fabrics. *Polym. Adv. Technol.* **2008**, *19*, 1816–1821.
- (120) Utsunomiya, S.; Ewing, R. C. Application of High-Angle Annular Dark Field Scanning Transmission Electron Microscopy, Scanning Transmission Electron Microscopy-Energy Dispersive X-Ray Spectrometry, and Energy-Filtered Transmission Electron Microscopy to the Characterization of Nanopar. *Environ. Sci. Technol.* **2003**, *37*, 786–791.
- (121) Wilson, J. L. Synthesis and Magnetic Properties of Polymer Nanocomposites with Embedded Iron Nanoparticles. *J. Appl. Phys.* **2004**, *95*, 1439.
- (122) Kakudo, M.; Kasai, N. X-Ray Diffraction by Polymers; 1972.
- (123) Menczel, J. D.; Prime, R. B. Thermal Analysis of Polymers, Fundamentals and Applications; 2009.
- (124) Magonov, S.; Cantow, H. Atomic Force Microscopy of Polymers. *Polym. Anal. Charact. IV* **1991**.
- (125) Avila-Orta, C.A.; Valdez-Garza, J.A.; Neira-Velázquez, M.G.; Borjas-Ramos, J.J.; González-Morones, P.; Espinoza-González, C.J.; España-Sánchez, B. L. Proceso de Desaglomeración, Fragmentación Y Disminución de Tamaño de Aglomerados de Nanopartículas Mediante La Aplicación de Ultrasonido En Fase Gas. MX/a/2010/014314, 2010.



- (126) Sharma, V. K.; Yngard, R. A.; Lin, Y. Silver Nanoparticles: Green Synthesis and Their Antimicrobial Activities. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2009**, *145*, 83–96.
- (127) Choi, C.-H.; White, J. L. Correlation and Modeling of the Occurrence of Different Crystalline Forms of Isotactic Polypropylene as a Function of Cooling Rate and Uniaxial Stress in Thin and Thick Parts. *Polym. Eng. Sci.* **2000**, *40*, 645–655.
- (128) Meille, S. V.; Ferro, D. R.; Brueckner, S.; Lovinger, A. J.; Padden, F. J. Structure of .beta.-Isotactic Polypropylene: A Long-Standing Structural Puzzle. *Macromolecules* **1994**, *27*, 2615–2622.
- (129) Cuenot, S.; Frétigny, C.; Demoustier-Champagne, S.; Nysten, B. Surface Tension Effect on the Mechanical Properties of Nanomaterials Measured by Atomic Force Microscopy. *Phys. Rev. B* **2004**, *69*, 165410.
- (130) Puzder, A.; Williamson, A.; Reboredo, F.; Galli, G. Structural Stability and Optical Properties of Nanomaterials with Reconstructed Surfaces. *Phys. Rev. Lett.* **2003**, *91*, 157405.
- (131) Ávila-Orta, Carlos A., Neira-Velázquez, M.G.; España-Sánchez, B.L.; Ortega-Ortíz, H.; González-Morones, P.; Rodríguez-González, J.A.; Valdéz-Garza, J. A. Proceso de Síntesis de Nanocompuestos Poliméricos Para Su Aplicación Como Material Antimicrobiano: Dispersión de Nanopartículas Con Ultrasonido Y Activación Superficial Del Nanocompuesto Por Plasma. Mx/a/2011/013347, 2011.
- (132) Lingaiah, S.; Shivakumar, K. N.; Sadler, R.; Sharpe, M. A Method of Visualization of Dispersion of Nanoplatelets in Nanocomposites. *Compos. Sci. Technol.* **2005**, *65*, 2276–2280.
- (133) Gogolides, E.; Constantoudis, V.; Kokkoris, G.; Kontziampasis, D.; Tsougeni, K.; Boulousis, G.; Vlachopoulou, M.; Tserepi, A. Controlling Roughness: From Etching to Nanotexturing and Plasma-Directed Organization on Organic and Inorganic Materials. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2011**, *44*, 174021.
- (134) Oehrlein, G. S.; Phaneuf, R. J.; Graves, D. B. Plasma-Polymer Interactions: A Review of Progress in Understanding Polymer Resist Mask Durability during Plasma Etching for Nanoscale Fabrication. *J. Vac. Sci. Technol. B Microelectron. Nanom. Struct.* **2011**, *29*, 010801.
- (135) Putnam, S. A.; Cahill, D. G.; Ash, B. J.; Schadler, L. S. High-Precision Thermal Conductivity Measurements as a Probe of Polymer/nanoparticle Interfaces. *J. Appl. Phys.* **2003**, *94*, 6785.
- (136) Hegemann, D.; Brunner, H.; Oehr, C. Plasma Treatment of Polymers for Surface and Adhesion Improvement. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **2003**, 208, 281–286.



- (137) Morent, R.; De Geyter, N.; Leys, C.; Gengembre, L.; Payen, E. Comparison between XPS- and FTIR-Analysis of Plasma-Treated Polypropylene Film Surfaces. *Surf. Interface Anal.* **2008**, *40*, 597–600.
- (138) Noeske, M.; Degenhardt, J.; Strudthoff, S.; Lommatzsch, U. Plasma Jet Treatment of Five Polymers at Atmospheric Pressure: Surface Modifications and the Relevance for Adhesion. *Int. J. Adhes. Adhes.* **2004**, *24*, 171–177.
- (139) Collaud, M.; Nowak, S.; Küttel, O. M.; Gröning, P.; Schlapbach, L. Surface Modifications of Polypropylene after in-Situ Ar and N2 Plasma Treatments: An XPS Study. *Appl. Surf. Sci.* **1993**, *72*, 19–29.
- (140) Song, J. Y.; Kim, B. S. Rapid Biological Synthesis of Silver Nanoparticles Using Plant Leaf Extracts. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2009**, *32*, 79–84.
- (141) Shahidi, S.; Ghoranneviss, M. Comparison between Oxygen and Nitrogen Plasma Treatment on Adhesion Properties and Antibacterial Activity of Metal Coated Polypropylene Fabrics. *Fibers Polym.* **2012**, *13*, 971–978.
- (142) Yuranova, T.; Rincon, A. G.; Bozzi, A.; Parra, S.; Pulgarin, C.; Albers, P.; Kiwi, J. Antibacterial Textiles Prepared by RF-Plasma and Vacuum-UV Mediated Deposition of Silver. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2003**, *161*, 27–34.
- (143) Fortunati, E.; Mattioli, S.; Visai, L.; Imbriani, M.; Fierro, J. L. G.; Kenny, J. M.; Armentano, I. Combined Effects of Ag Nanoparticles and Oxygen Plasma Treatment on PLGA Morphological, Chemical, and Antibacterial Properties. *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 626–636.
- (144) Katsikogianni, M. G.; Syndrevelis, C. S.; Amanatides, E. K.; Mataras, D. S.; Missirlis, Y. F. Plasma Treated and a-C:H Coated PET Performance in Inhibiting Bacterial Adhesion. *Plasma Process. Polym.* **2007**, *4*, S1046–S1051.
- (145) Li, Y.; Zhang, W.; Niu, J.; Chen, Y. Mechanism of Photogenerated Reactive Oxygen Species and Correlation with the Antibacterial Properties of Engineered Metal-Oxide Nanoparticles. *ACS Nano* **2012**, *6*, 5164–5173.
- (146) Howard-Flanders, P.; Theriot, L. Mutants of Escherichia Coli K-12 Defective in DNA Repair and in Genetic Recombination. *Genetics* **1966**, *53*, 1137–1150.
- (147) Matias, V. R. F.; Al-Amoudi, A.; Dubochet, J.; Beveridge, T. J. Cryo-Transmission Electron Microscopy of Frozen-Hydrated Sections of Escherichia Coli and Pseudomonas Aeruginosa. *J. Bacteriol.* **2003**, *185*, 6112–6118.
- (148) Zhao, J.; Wang, Z.; Dai, Y.; Xing, B. Mitigation of CuO Nanoparticle-Induced Bacterial Membrane Damage by Dissolved Organic Matter. *Water Res.* **2013**, *47*, 4169–4178.



- (149) Edwards, K.; Johnstone, C.; Thompson, C. A Simple and Rapid Method for the Preparation of Plant Genomic DNA for PCR Analysis. *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 1349.
- (150) Bimboim, H. C.; Doly, J. A Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **1979**, *7*, 1513–1523.
- (151) Rodrigo A, U.; Pareja, A.; Vásquez, N. A.; Márquez, M. E. The Comet Assay: A Technic to Evaluate Genotoxicity in DNA Bovine Oocytes. *Rev. Colomb. Ciencias Pecu.* 18, 222–227.
- (152) Martinez-Gutierrez, F.; Olive, P. L.; Banuelos, A.; Orrantia, E.; Nino, N.; Sanchez, E. M.; Ruiz, F.; Bach, H.; Av-Gay, Y. Synthesis, Characterization, and Evaluation of Antimicrobial and Cytotoxic Effect of Silver and Titanium Nanoparticles. *Nanomedicine* **2010**, *6*, 681–688.
- (153) Fahmy, B.; Cormier, S. A. Copper Oxide Nanoparticles Induce Oxidative Stress and Cytotoxicity in Airway Epithelial Cells. *Toxicol. In Vitro* **2009**, *23*, 1365–1371.
- (154) Ahamed, M.; Siddiqui, M. A.; Akhtar, M. J.; Ahmad, I.; Pant, A. B.; Alhadlaq, H. A. Genotoxic Potential of Copper Oxide Nanoparticles in Human Lung Epithelial Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *396*, 578–583.
- (155) *Current Topics in Microbiology and Immunology*; Cooper, M.; Eisen, H.; Goebel, W.; Hofschneider, P. H.; Koprowski, H.; Melchers, F.; Oldstone, M.; Rott, R.; Schweiger, H. G.; Vogt, P. K.; et al., Eds.; Current Topics in Microbiology and Immunology; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1985; Vol. 114.
- (156) Xia, T.; Kovochich, M.; Brant, J.; Hotze, M.; Sempf, J.; Oberley, T.; Sioutas, C.; Yeh, J. I.; Wiesner, M. R.; Nel, A. E. Comparison of the Abilities of Ambient and Manufactured Nanoparticles to Induce Cellular Toxicity according to an Oxidative Stress Paradigm. *Nano Lett.* **2006**, *6*, 1794–1807.
- (157) Limbach, L. K.; Wick, P.; Manser, P.; Grass, R. N.; Bruinink, A.; Stark, W. J. Exposure of Engineered Nanoparticles to Human Lung Epithelial Cells: Influence of Chemical Composition and Catalytic Activity on Oxidative Stress. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41*, 4158–4163.
- (158) Reeves, J. F.; Davies, S. J.; Dodd, N. J. F.; Jha, A. N. Hydroxyl Radicals (*OH) Are Associated with Titanium Dioxide (TiO(2)) Nanoparticle-Induced Cytotoxicity and Oxidative DNA Damage in Fish Cells. *Mutat. Res.* **2008**, *640*, 113–122.