

#### **TESIS**

## "SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA BIOLÓGICAMENTE ASISTIDA CON *OPUNTIA SP.* Y SU INCORPORACIÓN EN MEMBRANAS POLIMÉRICAS NANOFIBROSAS"

Presentada por:

Marco Polo Hernández Díaz

Para obtener el grado de:

Maestría en Tecnología en Polímeros

Asesores:

Dr. Antonio S. Ledezma Pérez Dr. Jorge Romero García

Saltillo, Coahuila Febrero 2013





# ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	
Índice de figuras	
Índice de tablas	
RESUMEN	
1 INTRODUCCIÓN	
2 ANTECEDENTES	
2.1 Nanopartículas	
2.2 Nanopartículas metálicas	
2.3. Métodos de Síntesis de Nanopartículas	
2.4 Métodos de Síntesis Química de Nanopartículas Metálicas	
2.5 Métodos de Síntesis Biológica de Nanopartículas	
2.5.1 Síntesis de Nanopartículas Metálicas usando Hongos	
2.5.2 Síntesis de Nanopartículas Metálicas Utilizando Bacterias.	
2.5.3 Síntesis de Nanopartículas Metálicas Utilizando Plantas	
2.6 Nanopartículas de Plata	
2.7 Aplicaciones de Nanopartículas de Plata	
2.7.1 Incorporación de nanopartículas de plata en matrices poliméricas y su	ı
procesamiento	
2.8 Nanofibras	
2.9 Proceso de Electrohilado	
2.9.1 Parámetros y condiciones en el proceso de electrohilado	
2.9.2 Polímeros utilizados en el proceso de electrohilado	
2.10 Nanofibras y Electrohilado	
2.10.1 Efecto del tamaño de fibra en el área de superficie	
2.10.2 Morfología de las nanofibras por electrohilado y sus aplicaciones	
2.11 Obtención de nanocompositos de polímeros-plata por medio de electrohilado y su	S
propiedades antimicrobianas.	
HIPÓTESIS	
OBJETIVOS	
JUSTIFICACIÓN  CONTRIBUIÇA ÓN CIENTÍFICA	
CONTRIBUCIÓN CIENTÍFICA	
3 PARTE EXPERIMENTAL	
3.1 Actividades desarrolladas en este proyecto	
3.2 Obtención de extractos acuosos a partir de los cladodios de nopal (Opuntia sp.)	
3.3 Síntesis de nanopartículas de plata	
3.4 Determinación de la fracción del extracto de nopal que actúa como agente reductor el la formación de nanopartículas de plata	1
3.5 Síntesis de nanopartículas de plata con cada una de las fracciones del extracto de nopa obtenidas en el proceso de ultrafiltración	l
3.6 Caracterización del extracto de nopal	





3.7 Caracterización de las nanopartículas de plata
3.8 Determinación del contenido de plata en la solución de reacción de nanopartículas d
plata
3.9 Preparación de nanofibras mediante la técnica de electrohilado
3.9.1 Preparación de las nanofibras PVA-AgNPs mediante mezclado
3.9.2 Síntesis "in situ" de nanopartículas de plata empleando el PVA como agent estabilizante para su posterior electrohilado
3.9.3 Síntesis "in situ" de nanopartículas de plata empleando el PVA como agent estabilizante y la adición de Quitosán, para su posterior electrohilado
3.10 Electrohilado de las soluciones poliméricas
3.11 Preparación de las membranas poliméricas para la evaluación de las propiedade antimicrobianas
3.12 Caracterización de las nanofibras obtenidas mediante electrohilado
3.13 Evaluación de la propiedad antimicrobiana y antifúngica de las membranas d nanofibras a base de nanopartículas de plata/polímero
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN
4.1 Obtención del extracto de nopal (Opuntia sp.)
4.2 Separación del extracto de nopal por el proceso de ultrafiltración
4.3 Síntesis de nanopartículas de plata con los extractos de cladodios de nopal como agent reductor y SDS como agente estabilizante
4.4 Síntesis de nanopartículas de plata empleando las fracciones del extracto de nopa obtenidas del proceso de ultrafiltrado y SDS como agente estabilizante
4.5 Síntesis de nanopartículas de plata empleando la fracción No. 1 del extracto de nopa como agente reductor
4.6 Síntesis "in situ" de nanopartículas de plata empleando la fracción del permeado d 3000 NMWC como agente reductor y el PVA como estabilizante
4.7 Preparación de nanofibras mediante electrohilado
4.7.1 Mezclado de la solución de nanopartículas de plata con la mezcla de PVA
4.7.2 Empleo de la solución de la reacción "in situ" de nanopartículas de plata y s posterior electrohilado
4.7.3 Empleo de la solución de la reacción "in situ" de nanopartículas de plata y la adición de quitosán
4.8 Entrecruzamiento de las membranas de nanofibras
4.9 Evaluación antimicrobiana de las membranas obtenidas por electrohilado
4.9.1 Evaluación antimicrobiana de las membranas obtenidas mediante el mezclado de l solución de nanopartículas de plata con la mezcla de PVA
4.9.2 Evaluación antimicrobiana de las membranas obtenidas mediante el empleo de l solución de la reacción "in situ" de nanopartículas de plata
4.9.3 Evaluación antimicrobiana de las membranas obtenidas mediante el empleo de l solución de la reacción "in situ" de nanopartículas de plata y adición de quitosán
CONCLUSIONES
Bibliografía
ANEXOS





# NDICE DE FIGURAS

- Figura 2.1.- Formas convencionales para los diversos nanocristales metálicos.
- Figura 2.2.- Esquema de las diferentes estrategias utilizadas para la síntesis de nanopartículas metálicas.
- Figura 2.3.- Enfoque "descendente" y enfoque "ascendente" para nanoestructuras.
- Figura 2.4.- Mecanismo de formación de nanopartículas de plata a partir de la reducción química en disolución de la sal de AgNO<sub>3</sub>.
- Figura 2.5.- Micrografía obtenida por FESEM (microscopía electrónica de barrido por emisión de campo), de las nanoestructuras de oro sintetizadas usando la biomasa del microorganismo.
- Figura 2.6.- Micrografía a) TEM de las nanopartículas de plata obtenidas empleando el extracto de la planta de alfalfa, y b) micrografía HRTEM de las nanopartículas de plata en estado cristalino, con un intervalo de tamaño de 2-3 nm y forma icosaédrica.
- Figura 2.7.- Mecanismos sugeridos sobre la acción bactericida de las nanopartículas de plata en diferentes microorganismos. a) A nivel de destrucción de la pared celular, y b) nivel de ataque a las biomacromoléculas (ADN, ARN, proteínas, etc.).
- Figura 2.8.- Imagen por microscopia electrónica de barrido (SEM) de nanopartículas de plata.
- *Figura 2.9.-* Esquema Básico de la Técnica de Electrohilado.
- Figura 2.10.- La micrografía muestra un cabello humano (80,000 nanómetros), colocado sobre una membrana de nanofibras obtenidas por electrohilado.
- Figura 2.11.- Efecto del diámetro de la fibra en el área de superficie.
- *Figura 3.1.* Esquema de las actividades desarrolladas en este proyecto.
- *Figura 3.2.-* Cladodios de nopal en trozos y dispersos en agua destilada.
- *Figura 3.3.* Equipo de Liofilización para secado del extracto.
- *Figura 3.4.-* Sistema de reacción para la síntesis de nanopartículas de plata.
- Figura 3.5.- Sistema de ultrafiltración empleado para fraccionar el extracto de nopal.
- *Figura 3.6.* Sistema de diálisis el cual implica la difusión de las partículas de soluto a través de la membrana semipermeable.



- *Figura 3.7.-* Esquema del proceso de electrohilado utilizado para la formación de las membranas poliméricas de nanofibras.
- Figura 3.8.- Realización del recuento viable en una campana de flujo laminar en condiciones estériles.
- Figura 4.1.- Fracciones del extracto de nopal obtenidas mediante el proceso de ultrafiltración.
- Figura 4.2.- Análisis del avance de reacción de nanopartículas de plata en presencia de extracto de nopal como agente reductor. a) Adición del AgNO<sub>3</sub>, b) adición del extracto de nopal t = 0, c) t = 30 min, d) t = 1 h, e) t = 1 h 30 min, f) t = 2 h, g) t = 2 h 30 min, h) t = 3 h.
- Figura 4.3.- Espectros de absorción UV-visible de las solución de extracto de nopal antes y después de la adición de NH<sub>4</sub>OH.
- Figura 4.4.- Espectros de absorción UV-visible en función del tiempo, de la síntesis de nanopartículas de plata empleando el extracto de nopal sin fraccionar (volumen de reacción 80 mL).
- *Figura 4.5.* Imagen TEM y distribución de tamaño de las nanopartículas de plata obtenidas empleando el extracto de nopal como agente reductor y el SDS como estabilizante.
- Figura 4.6.- Imagen TEM a bajas magnificaciones a) y alta resolución HRTEM b) de las nanopartículas de plata obtenidas empleando el extracto de nopal como agente reductor y el SDS como estabilizante.
- Figura 4.7.- Imagen TEM de las nanopartículas de plata embebidas en materia orgánica perteneciente al extracto de nopal.
- *Figura 4.8.* Patrón de difracción de rayos X de las nanopartículas de plata obtenidas empleando el extracto de nopal como agente reductor.
- Figura 4.9.- Apariencia y coloración de cada una de las soluciones de las reacciones de nanopartículas de plata empleando cada una de las fracciones obtenidas en el proceso de ultrafiltración.
- Figura 4.10.- Espectros de absorción UV-visible en función del tiempo, de la síntesis de nanopartículas de plata empleando cada una de las fracciones del extracto obtenidas por micro y ultrafiltración.
- Figura 4.11.- Espectros de absorción UV-visible en función del tiempo, de la síntesis de nanopartículas de plata empleando la fracción de 0.2 micrón.



- Figura 4.12.- Espectros de absorción UV-visible en función del tiempo, de la síntesis de nanopartículas de plata empleando el permeado obtenido de la columna de 3,000 NMWC.
- Figura 4.13.- Espectros de absorción UV-visible que muestran el comportamiento de la síntesis de nanopartículas de plata en función del tiempo empleando el extracto de nopal sin fraccionar a), y el permeado de 3000 NMWC b) como agentes de reducción.
- *Figura 4.14.* Reacción de síntesis de nanopartículas de plata con el permeado 3,000 NMWC con un volumen de reacción de 1 litro.
- *Figura 4.15.* Imagen TEM y distribución de tamaño de las nanopartículas de plata obtenidas empleando el permeado de 3000 NMWC y el SDS como estabilizante
- *Figura 4.16.* Imagen HR-TEM y patrón de difracción de las nanopartículas de plata obtenidas empleando el permeado de 3000 y el SDS como estabilizante.
- *Figura 4.17.-* Cinética de reacción monitoreada por espectroscopia de absorción UV-visible para evaluar el PVA como agente reductor en la síntesis de nanopartículas de plata.
- *Figura 4.18.* Reacción de síntesis de nanopartículas de plata empleando el PVA (13-23 kg/mol y 126 kg/mol) como agente estabilizante y extracto de nopal como reductor.
- Figura 4.19.- Imagen TEM y distribución de tamaños de las nanopartículas obtenidas de la solución de la reacción "in situ" empleando el permeado 3000 NMWC como agente reductor y el PVA como estabilizante.
- Figura 4.20.- Imagen HR-TEM y patrón de difracción de las nanopartículas de plata obtenidas de la solución de la reacción "in situ" empleando el permeado 3000 NMWC como agente reductor y el PVA como estabilizante..
- Figura 4.21.- Imagen SEM 5000 X nanofibras de a) PVA, b) PVA + 20 ppm AgNPs, c) PVA + 60 ppm AgNPs, d) PVA + 100 ppm AgNPs. Condiciones electrohilado 20 kV, 0.3 mL/h, d= 10 cm, posición de la aguja: vertical.
- Figura 4.22.- Histograma de la distribución de tamaños en las nanofibras de a) PVA, b) PVA + 20 ppm AgNPs, c) PVA + 60 ppm AgNPs, d) PVA+ 100 ppm AgNPs. Condiciones electrohilado 20 kV, 0.3 mL/h, d= 10 cm, posición de la aguja: vertical.
- Figura 4.23.- Imagen por a) SEM y b) TEM de las nanofibras de PVA con 100 ppm AgNPs. Condiciones electrohilado 20 kV, 0.3 mL/h, d=10 cm, posición de la aguja: vertical.
- *Figura 4.24.-* Membranas de nanofibras depositadas en el colector de aluminio, a) PVA y b) PVA con nanopartículas de plata incorporadas.



- Figura 4.25.- Imagen SEM de las nanofibras posición a) vertical y b) horizontal, y distribución de tamaños de las nanofibras en posición vertical c), y posición horizontal d). Condiciones electrohilado 20 kV, 0.3 mL/h, d= 10 cm.
- Figura 4.26.- Imagen SEM de las nanofibras obtenidas de PVA+ 60ppm AgNPs, a diferente distancia entre el colector y la aguja, a) d= 10 cm y b) d= 15 cm. Distribución de tamaños de las nanofibras a c) d= 10 cm y d) d= 15 cm. Condiciones electrohilado 20 kV, 0.3 mL/h, en posición horizontal.
- Figura 4.27.- Imagen SEM de las nanofibras obtenidas de PVA+ 100ppm AgNPs, a diferente distancia entre el colector y la aguja, a) d= 10 cm y b) d= 15 cm. Distribución de tamaños de las nanofibras a c) d= 10 cm y d) d= 15 cm. Condiciones electrohilado 20 kV, 0.3 mL/h, en posición horizontal.
- Figura 4.28.- Imagen SEM y distribución de tamaño de las nanofibras obtenidas de la reacción "in situ" con 120ppm AgNPs. Condiciones electrohilado 20 kV, 0.3 mL/h, d= 15 cm en posición horizontal.
- Figura 4.29.- Imagen TEM de las nanofibras de la reacción "in situ" con 120 ppm AgNPs, a) nanopartículas embebidas en las nanofibras, b)análisis EDS, c) nanofibra con AgNPs y d) patrón de difracción. Condiciones electrohilado 20 kV, 0.3 mL/h, d= 15 cm, posición de la aguja: horizontal.
- *Figura 4.30.* Espectro FTIR de las membranas obtenidas empleando la solución de reacción "in situ" de las nanopartículas de plata empleando el PVA como agente estabilizante.
- *Figura 4.31.* Espectro FTIR de las membranas obtenidas empleando la solución de reacción "in situ" de las nanopartículas de plata empleando el PVA como agente estabilizante.
- Figura 4.32.- Imagen SEM de las nanofibras de PVA con a) 1% Quitosán y b) 1% Quitosán + 20 ppm AgNPs obtenidas de la reacción "in situ".
- Figura 4.33.- Histograma de distribución de tamaño de las nanofibras de PVA con a)1% Quitosán y b) 1% Quitosán + 20 ppm AgNPs obtenidas de la reacción "in situ" empleando el permeado 3000 NMWC como agente reductor y PVA como estabilizante.
- Figura 4.34.- Análisis de la membrana de PVA, a) antes de entrecruzar, b) entrecruzada con CH<sub>3</sub>OH y c) después de sumergir en agua por 12 horas.
- Figura 4.35.- Análisis de la membrana de PVA + 100 ppm AgNPs reacción "in situ", a) antes de entrecruzar, b) entrecruzada con CH<sub>3</sub>OH y c) después de sumergir en agua por 12 horas





- Figura 4.36.- Análisis de la membrana de PVA + 1% Quitosán, a) antes de entrecruzar, b) entrecruzada con CH<sub>3</sub>OH y c) después de sumergir en agua por 12 horas.
- Figura 4.37.- Análisis de la membrana de PVA+ 100 ppm AgNPs reacción "in situ" + 1% Quitosán, a) antes de entrecruzar, b) entrecruzada con CH<sub>3</sub>OH y c) después de sumergir en agua por 12 horas.





# NDICE DE TABLAS

- *Tabla 2.1.-* Hongos utilizados en la síntesis de nanopartículas metálicas.
- **Tabla 2.2-** Bacterias utilizadas en la Síntesis de Nanopartículas Metálicas.
- *Tabla 2.3.-* Comparación de las técnicas de procesamiento para la obtención de nanofibras.
- **Tabla 2.4.-** Ventajas y desventajas de varias técnicas de procesamiento de nanofibras.
- *Tabla 2.5.-* Diferentes morfologías de nanofibras obtenidas mediante electrohilado.
- **Tabla 3.1.-** Composición de cada uno de los reactivos empleados en la síntesis de nanopartículas de plata empleando SDS como agente estabilizante.
- *Tabla 3.2.-* Tipos de columnas de fibra hueca empleadas en el proceso de ultrafiltración.
- **Tabla 3.3.-** Composición de cada uno de los reactivos empleados en la síntesis "in situ" de nanopartículas de plata.
- *Tabla 4.1.-* Composición química del extracto de nopal (Opuntia sp.)
- *Tabla 4.2.-* Composición de sacáridos presentes en el extracto de nopal (*Opuntia sp*).
- **Tabla 4.3.-** Relación de las composiciones de las fracciones del extracto de nopal con diferente peso molecular.
- **Tabla 4.4.-** Composición química del extracto de nopal sin fraccionar y la fracción del permeado 3000 NMWC.
- **Tabla 4.5.-** Composición de los azúcares presentes en el extracto de nopal sin fraccionar y en la fracción del *permeado de 3000 NMWC*.
- **Tabla 4.6.-** Tamaño de partícula y características espectrales de las nanopartículas de plata.
- **Tabla 4.7.-** Análisis de los tamaños de diámetros obtenidos al incrementar la concentración de nanopartículas en las nanofibras.
- **Tabla 4.8.-** Comportamiento de la actividad antimicrobiana de membranas de nanofibras conteniendo nanopartículas de plata expuestas a la bacteria *Escherichia coli* ATCC-25922.
- **Tabla 4.9.-** Comportamiento de la actividad antimicrobiana de membranas de nanofibras conteniendo nanopartículas de plata expuestas a la bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC-29213.



- **Tabla 4.10.-** Comportamiento de la actividad antimicrobiana de membranas de nanofibras conteniendo nanopartículas de plata obtenidas de la reacción "in situ", expuestas a la bacteria *Escherichia coli* ATCC-25922.
- Tabla 4.11.- Comportamiento de la actividad antimicrobiana de membranas de nanofibras conteniendo nanopartículas de plata de la reacción "in situ", expuestas a la bacteria Staphylococcus aureus ATCC-29213.
- **Tabla 4.12.-** Comportamiento de la actividad antimicrobiana de membranas de nanofibras conteniendo nanopartículas de plata de la reacción "in situ", expuestas a la bacteria *Pseudomona aureoginosa* ATCC-27853.
- **Tabla 4.13.-** Comportamiento de la actividad antimicrobiana de membranas de nanofibras conteniendo nanopartículas de plata de la reacción "in situ", expuestas al hongo *Aspergillus niger* ATCC-9642.
- **Tabla 4.14.-** Comportamiento de la actividad antimicrobiana de membranas de nanofibras conteniendo nanopartículas de plata de la reacción "in situ", expuestas al hongo de *Candida Albicans*.
- **Tabla 4.15.-** Comportamiento de la actividad antimicrobiana de membranas de nanofibras conteniendo nanopartículas de plata obtenidas de la reacción "in situ" y quitosán, expuestas a la bacteria *Escherichia coli* ATCC-25922.
- **Tabla 4.16.-** Comportamiento de la actividad antimicrobiana de membranas de nanofibras conteniendo nanopartículas de plata obtenidas de la reacción "in situ" y quitosán, expuestas a la bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC-29213
- **Tabla 4.17.-** Comportamiento de la actividad antimicrobiana de membranas de nanofibras conteniendo nanopartículas de plata obtenidas de la reacción "in situ" y quitosán, expuestas a la bacteria *Pseudomona aureoginosa* ATCC-27853.
- **Tabla 4.18.-** Comportamiento de la actividad antimicrobiana de membranas de nanofibras conteniendo nanopartículas de plata obtenidas de la reacción "in situ" y quitosán, expuestas al hongo *Aspergillus niger* ATCC-9642.
- **Tabla 4.19.-** Comportamiento de la actividad antimicrobiana de membranas de nanofibras conteniendo nanopartículas de plata obtenidas de la reacción "in situ" y quitosán, expuestas al hongo *Candida Albicans*.







En este trabajo se sintetizaron nanopartículas de plata con actividad antimicrobiana a través de una estrategia de síntesis de bajo costo y amigable con el medio ambiente, en donde el extracto de los cladodios jóvenes y frescos de la planta de nopal (*Opuntia sp*) participó como agente reductor en presencia de polímeros hidrosolubles y biocompatibles [poli (vinil alcohol) y el quitosán], los cuales actuaron como agente estabilizante y antimicrobiano respectivamente.

Se analizaron diferentes fracciones del extracto de los cladodios de nopal, obtenidos mediante micro y ultrafiltración con el fin de identificar los principales componentes del extracto que pudieran participar como agentes reductores en los iones de plata. En el proceso de micro y ultrafiltración se utilizaron membranas de fibra hueca con diferente tamaño de poro o límite de peso molecular. Los principales componentes químicos que se encontraron en el extracto completo de los cladodios de nopal se distribuyeron de la siguiente forma: 4 % de sólidos insolubles, 11.16% de proteína total, 0.53 % de proteína soluble, 16.54% de pectina, 11.62% de azúcares totales y 23.55% de fenoles.

Cada una de las fracciones del extracto de los cladodios de nopal obtenidas durante el proceso de micro y ultrafiltración se evaluó de la misma manera en que se realizó la síntesis de nanopartículas de plata con el extracto de nopal entero, con la finalidad de determinar en cual de estas fracciones se encontraban las partículas o moléculas responsables de la reducción de los iones de plata.

La formación de las nanopartículas de plata empleando el extracto de nopal como agente reductor fue monitoreada mediante espectroscopia UV-visible, presentando un pico máximo de absorción a una longitud de onda de 420 nm, característico de la excitación del plasmón superficial de las nanopartículas de plata.

De las fracciones del extracto de nopal obtenidas por ultrafiltración, la fracción de tamaño que presentó una mayor intensidad de absorción a la longitud de onda característica de las nanopartículas de plata fue la obtenida del permeado de la membrana con un límite de peso





molecular (NMWC) de 3,000 Kg/mol, por lo que se decidió emplear esta fracción para la obtención de las nanopartículas de plata.

Mediante análisis por microscopía electrónica de transmisión (TEM) se determinó la morfología y la distribución de tamaños de las nanopartículas de plata obtenidas con el permeado con 3,000 NMWC. La mayoría de las partículas observadas mostraron una morfología predominantemente esférica con tamaños de diámetro en el intervalo de 4 a 30 nm, y con un tamaño promedio de 17 nm.

Las nanopartículas de plata se incorporaron en una matriz polimérica de PVA, para posteriormente fabricar nanofibras mediante la técnica de electrohilado y así obtener membranas de nanofibras con nanopartículas cargadas. Durante la preparación de las nanofibras se propusieron tres métodos de preparación de la solución polimérica, empleando en cada uno de estos métodos una solución acuosa de PVA al 10% w/v, que se preparó a partir de una mezcla de PVA con pesos moleculares de M<sub>w</sub> 13,000-23,000 y M<sub>w</sub> 126,000 en una relación 50:50.

En el primer método de preparación se mezcló la solución de PVA con diferentes concentraciones de nanopartículas. En el segundo método se llevó a cabo la síntesis "in situ" de las nanopartículas de plata empleando el extracto de nopal y el PVA como agente reductor y estabilizante respectivamente y posteriormente se llevó a cabo el electrohilado de la suspensión. Las nanopartículas de plata obtenidas de ésta reacción "in situ" se caracterizaron mediante TEM, observando una mayor presencia de nanopartículas de morfología esférica con tamaños de diámetro inferiores a los 5 nm. En el último método se empleó la solución de nanopartículas de plata obtenidas de la reacción "in situ" con PVA y se adicionó quitosán de bajo peso molecular al 1% w/v, con la finalidad de contribuir al efecto antimicrobiano de las membranas.

Las membranas de nanofibras fueron caracterizadas por microscopia electrónica de barrido (SEM), donde fue posible observar fibras con morfología uniforme y escasos defectos. El intervalo de tamaño de diámetro de las nanofibras fue de 40 a 400 nm, con un tamaño promedio de 250 nm. Mediante un análisis por TEM fue posible observar las nanopartículas de plata embebidas en la nanofibra, observando una mejor dispersión de las nanopartículas en aquellas nanofibras electrohiladas a partir de la solución de reacción de nanopartículas de plata empleando la solución de PVA como agente estabilizante.





Se comprobó la actividad antibacteriana de las membranas de nanofibras con nanopartículas de plata incorporadas, empleando las cepas de *Escherichia coli, Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aureoginosa*, usando el método de dilución en caldo de soya tripticasa, así como la actividad antifúngica empleando el método de dilución en caldo dextrosa y papa, y caldo YPD (extracto de levadura, dextrosa y papa) para las cepas de *Aspergillus niger* y *Candida albicans* respectivamente.

Las membranas obtenidas mediante el mezclado de la solución de PVA con las nanopartículas de plata mostraron un efecto antimicrobiano con una inhibición del 99.9% de la bacteria *Escherichia Coli* al utilizar una concentración de 300 ppm de nanopartículas de plata, en tanto que para el *Staphylococcus aureus* con ésta misma concentración de nanopartículas se logró obtener una inhibición del 94.1%, esto se ha atribuido a la diferencia entre las paredes celulares entre las bacterias Gram positiva y Gram negativa.

Las membranas obtenidas a partir de la solución de la reacción "in situ" de las nanopartículas de plata con PVA presentaron una mejor propiedad antimicrobiana en comparación con las membranas obtenidas de la mezcla de las nanopartículas con el PVA, obteniendo una inhibición total tanto para las cepas de bacterias como las de hongos al utilizar una concentración de 20 ppm de nanopartículas de plata.

Se comprobó la actividad antimicrobiana del quitosán incorporado en las membranas de PVA, al exhibir por sí solo una inhibición total de las cepas de bacterias y hongos evaluados, excepto para la cepa de *Aspergillus niger*, donde el quitosán logró una inhibición del 95 %, en tanto que el quitosán con una concentración de 10 ppm de nanopartículas de plata permitió alcanzar una inhibición del 99.8%.



## 1. Introducción

Los constantes avances en la tecnología y la fabricación de nuevos materiales y dispositivos en dimensiones nanométricas, que conserven o mejoren sus propiedades, ha hecho que hoy en día la nanotecnología capte un gran interés y se proyecte como una solución prometedora a los problemas en el campo científico y tecnológico.

Una de las áreas más importantes en la cual se ha enfocado la nanotecnología es la biomédica, donde se han aplicado nanopartículas metálicas para liberación de fármacos, terapia génica, síntesis de nuevos medicamentos, detección de células tumorales, entre otras <sup>(1)</sup>. En ésta área, las nanopartículas de plata han desempeñado un papel importante debido a su fuerte actividad bactericida y fungicida, empleándose ampliamente en medicina para el control de infecciones.

Para la producción de nanopartículas metálicas, como en el caso de las nanopartículas de plata, se han desarrollado diferentes métodos de síntesis, dentro de los cuales se encuentran la síntesis química mediante microemulsión, reducción química, irradiación ultrasónica, síntesis electroquímica y más recientemente la aplicación de métodos biológicos que hacen uso de microorganismos, plantas y sus extractos.

El incremento gradual en la contaminación ambiental ha hecho que la comunidad científica tome conciencia y enfoque sus esfuerzos hacia la búsqueda de nuevas alternativas para la obtención de estas nanopartículas con metodologías limpias que eviten problemas de contaminación ambiental. Por esa razón se ha considerado que la síntesis biológica representa una de estas alternativas limpias, presumiblemente no tóxica y amigable con el medio ambiente igualando e incluso sobrepasando las expectativas de las nanopartículas sintetizadas por los otros métodos tradicionales <sup>(2)</sup>.

Dentro de los métodos de síntesis biológica de nanopartículas metálicas se encuentra el uso de bacterias, hongos, plantas y sus extractos como agentes de reducción. Entre ellos, el estudio de la síntesis de nanopartículas por medio del uso de plantas y sus extractos ha sido poco estudiado, razón por la que en este trabajo se llevó a cabo un estudio detallado con el fin de desarrollar una





tecnología verde, a través del uso del extracto de cladodios de nopal (*Opuntia sp.*) como agente reductor para la fabricación de nanopartículas de plata.

Actualmente la incorporación de nanopartículas metálicas en matrices poliméricas esta despertando un gran interés en muchos campos de la ciencia, lo que ha permitido el desarrollo de materiales con mejores propiedades físicas y mecánicas <sup>(3)</sup>. Entre estos materiales, las nanofibras se caracterizan por presentar diámetros que se encuentran en la escala nanométrica, con una gran área superficial por unidad de volumen y tamaños de poro pequeños, lo cual hace posible su uso en aplicaciones muy variadas.

Entre las técnicas para la formación de nanofibras se encuentra el electrohilado, el cual se caracteriza por ser un proceso continuo y de bajo costo, que permite obtener nanofibras con diferentes morfologías dependiendo de las condiciones del proceso.

Mediante el proceso de electrohilado, se han incorporado nanopartículas de plata a nanofibras, las cuales, debido a las propiedades antimicrobianas y fungicidas que les atribuye la plata, pueden aplicarse en materiales textiles, vendajes para heridas, medios de filtración, entre otros.

En este trabajo se planteó desarrollar la síntesis de nanopartículas de plata empleando el extracto acuoso del nopal (Opuntia sp.) como agente reductor en presencia de un polímero hidrosoluble y biocompatible como el poli (vinil alcohol), el cual participó como agente estabilizador de las nanopartículas. Para ello fue necesario establecer los parámetros óptimos de síntesis, caracterización y su aplicación en la preparación de nanofibras mediante el proceso de electrohilado. Se incorporó un polímero natural como el quitosán que coadyuvara a la propiedad antimicrobiana de las fibras, llevando a cabo la evaluación de la actividad antimicrobiana y morfología de las membranas nanofibrosas obtenidas.



### 2.Antecedentes

#### 2.1 Nanopartículas

La nanotecnología es una de las áreas de investigación más activas en la ciencia de materiales modernos debido al gran interés y creciente desarrollo de técnicas para sintetizar y caracterizar materiales y dispositivos a escala nanométrica, así como la manera de ampliar los límites alcanzados en diversos campos como la medicina, electrónica, química e ingeniería. Hoy en día las tecnologías requieren reducir lo más posible el tamaño de los componentes que utilizan con propiedades específicas que realicen algún tipo de función útil, razón por la cual, la producción de nanopartículas es uno de los desafíos más importantes de la nanotecnología.

La definición de nanopartículas difiere dependiendo de los materiales, campos y aplicaciones concernientes. En relación a sus dimensiones físicas, las nanopartículas se definen como partículas que poseen un tamaño en un intervalo de 1 a 100 nm <sup>(4)</sup>.

Una nanopartícula típica se compone de pequeñas "partículas primarias", las cuales tienen una relación de superficie-volumen muy alta. Poseen cerca del 98, 40 y 10 % del total de sus átomos sobre las superficies o en los límites de grano si sus partículas primarias son del orden de 1, 5 y 20 nm respectivamente. La alta proporción de átomos en su superficie y en los límites de grano es responsable de las diferentes propiedades de las nanopartículas (electrónica, óptica, eléctrica, magnética, química, biológica y mecánica) con respecto a los materiales nanoestructurados.

Las nanopartículas pueden clasificarse como: naturales, incidentales, de ingeniería, amorfas, cristalinas, poliméricas, o de materiales compuestos. De acuerdo a su química predominan las nanopartículas no metálicas (por ejemplo, las de carbono), las metálicas (como las de oro Au y plata Ag), semiconductoras (como las de selenuro de cadmio CdSe) y combinadas.

La forma de la nanopartícula es una característica importante que se toma en cuenta para las posibles aplicaciones en el área de la nanotecnología. En base a su forma encontramos nanopartículas esféricas, cilíndricas, en barras y plaquetas. Sus propiedades físicas están relacionadas con su tamaño y composición química. Las propiedades químicas de la superficie,





incluyendo defectos e impurezas, contribuyen a su reactividad <sup>(5)</sup>. En la figura 2.1 se presentan las formas convencionales de diversas nanoestructuras metálicas.

Estructura	Formas	Dibujo esquemático	Metales
Cristal único	Cubo perfecto/ truncado		Pd, Ag, Au, Pt, Cu, Rh, Bi, Fe
	Octaedro perfecto/ truncado	♦ ♦	Pd, Ag, Au, Pt
	Tetraedro perfecto/ truncado		Ag, Au, Pt, Rh
	Barra rectangular		Pd, Ag, Pt
	Barra octagonal		Pd, Au, Fe, Co, Ni
	Alambre octagonal o rectangular	11	Pb, In, Sn, Sb, Fe, Co
Maclado individualmente	Bipirámide derecha	<b>*</b>	Pd, Ag
	Rayo		Ag
Maclado múltiple	Decaedro	<b>&amp;</b>	Pd, Ag, Au
	Icosaedro	<b>Ø</b>	Pd, Au
	Barra pentagonal maclada cinco veces	<i>d</i>	Pd, Ag, Au, Cu
	Alambre pentagonal maclado cinco veces	1	Ag, Cu
	Plato triangular/ hexagonal		Pd, Ag, Au, Cu, Pb, Bi, Co, Ni
	Disco	0	Sn, Co

*Figura 2.1.*- Formas convencionales para los diversos nanocristales metálicos <sup>(6)</sup>.

Debido a las nuevas aplicaciones encontradas para las nanopartículas, se busca la preparación de nuevos métodos de síntesis con un mejor control en los parámetros de crecimiento, dirigidos a la producción de nanopartículas con propiedades a la medida para aplicaciones específicas, por lo que es fundamental la comprensión del mecanismo de formación así como de su crecimiento <sup>(7)</sup>.

Las nanopartículas de origen metálico como el oro, platino, paladio, cobalto, rodio y plata se han desarrollado con una variedad de técnicas experimentales, generando un interés particular en las





partículas ultrafinas, las cuales poseen un mayor número de bordes, esquinas y caras que les proporciona una alta relación de superficie/ volumen, motivo por el cual son muy útiles en diversas áreas de la química <sup>(8)</sup>.

#### 2.2 Nanopartículas metálicas

Las nanopartículas metálicas se definen como agregados aislados de átomos de metales rodeados de una cápsula protectora o estabilizadora que evita su aglomeración <sup>(9), (10)</sup>. Las nanopartículas metálicas son importantes desde un punto de vista teórico y práctico, ya que representan las clases de nanomateriales más prometedoras en virtud de sus propiedades optoelectrónicas, térmicas, magnéticas y su alta capacidad catalítica.

Las propiedades ópticas de las nanopartículas están en función de si la nanopartícula se comporta como semiconductora o conductora. En una nanopartícula semiconductora, la banda de valencia se encuentra completamente ocupada por electrones y la banda de conducción esta completamente vacía <sup>(4)</sup>. En el campo de la física del estado sólido de semiconductores, se denomina "banda de conducción" al nivel de energía donde la atracción del núcleo del átomo sobre los electrones es más débil. Este nivel corresponde a la órbita más externa del átomo, en donde todos los electrones que están en esta banda se encuentran compartidos por otros átomos del sólido, permitiendo que estos se desplacen por el mismo en forma de nube electrónica. En una nanopartícula metálica la banda de conducción se encuentra parcialmente llena de electrones, por lo que no existe diferencia en la excitación electrónica. Los electrones conducidos en el metal forman un tipo de estado de plasma, y la transición de electrones dentro de la banda se describe como el movimiento colectivo de electrones libres. La oscilación de electrones mediante este movimiento colectivo, en otras palabras, las oscilaciones repetitivas de electrones para proteger la polarización provocada por campos externos tales como los rayos de luz y electrones, se conoce como oscilación de plasma. Ésta onda oscilatoria se expresa como una partícula y se denomina como un plasmón <sup>(11)</sup>.

Las nanopartículas metálicas muestran extraordinarias propiedades ópticas, un ejemplo de ello se tiene en una cadena lineal de nanopartículas de Ag o Au, la cual puede conducir el flujo de energía electromagnética a distancias de cientos de nanómetros sin tener una pérdida significativa <sup>(12)</sup>, una propiedad que se ha convertido en la base de un nuevo concepto de dispositivos fotónicos integrados a la escala nanométrica <sup>(13)</sup>. Debido a que el tamaño de las partículas están en el orden





de unos cuantos nanómetros y hasta 100 nm, en consecuencia la absorción de luz por estos materiales suele darse a una longitud de onda específica, que es conocida como la absorción de plasmones, y que a su vez se asocia a la frecuencia de resonancia de la onda plasmónica <sup>(14)</sup>. Según el tamaño de la nanopartícula la longitud de onda se desplaza hacia menores o mayores longitudes de onda, y de acuerdo a la distribución de tamaños de las nanopartículas varía el ancho de la banda. Sin embargo, ambas propiedades dependen también de otros factores como el tipo de solvente, agente estabilizante, entre otros <sup>(15)</sup>.

En la estabilización de las nanopartículas de oro y plata durante su síntesis, se han utilizado agentes estabilizantes entre los que se incluyen surfactantes y algunos polímeros. En un estudio realizado por Sato y colaboradores <sup>(16)</sup> se demostró que además de que el surfactante previene y evita la agregación de las nanopartículas de plata, desempeña un papel importante en la reducción de los iones de plata a plata atómica.

Los primeros indicios de que las nanopartículas de oro presentan una estructura ordenada, fue proporcionado por Schiffrin <sup>(17)</sup>. Estas partículas de oro de 8 nm fueron preparadas en un sistema líquido de dos fases y estabilizado por ditioles. Este mismo autor y sus colaboradores, también hicieron otro descubrimiento importante cuando fabricaron conjuntos bimodales de partículas de oro nanométricas. Suslick y colaboradores (1996) <sup>(18)</sup>, reportaron por primera vez la preparación sonoquímica de una variedad de nanopartículas metálicas. Rakhimov y colaboradores prepararon nanopartículas metálicas (Fe, Co y Ni) dispersadas en una matriz polimérica mediante la exposición de mezclas de reacción que contenían precursores de sales metálicas, un polímero y un agente de reducción como el borohidruro de sodio (NaBH<sub>4</sub>) mediante la acción de pulsos de onda elástica <sup>(19)</sup>.

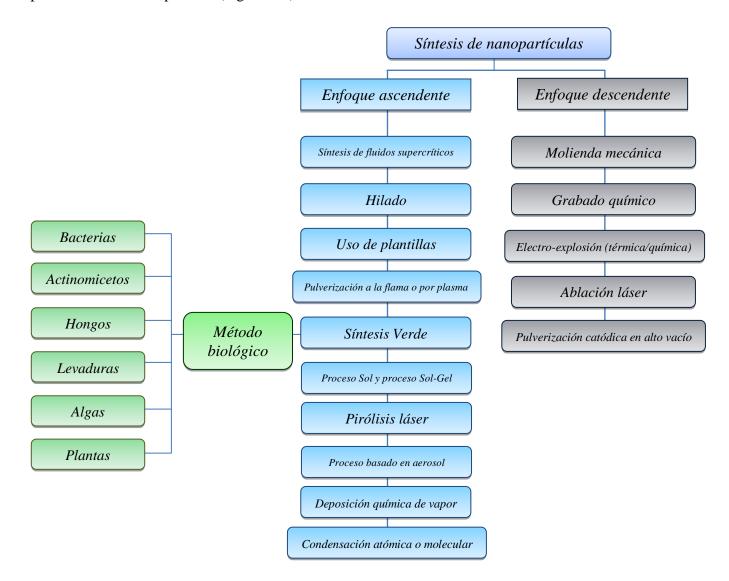
Actualmente existe un enorme interés en la preparación de nanopartículas metálicas que presenten formas y tamaños uniformes, lo que ha incrementado la búsqueda de nuevos procedimientos de síntesis fácilmente escalables y rentables <sup>(20)</sup>.

#### 2.3. Métodos de Síntesis de Nanopartículas

Existen numerosos métodos disponibles para sintetizar nanopartículas, sin embargo el enfoque o desafío actual se dirige hacia el control del tamaño de la nanopartícula, distribución de tamaño,



morfología, cristalinidad y propiedades. Todo esto con el fin de aplicar las nanopartículas a un propósito determinado y preparar una variedad de materiales. Los métodos de síntesis reportados pueden clasificarse de acuerdo a su estrategia de síntesis, fuentes de energía utilizadas así como por la naturaleza del proceso (Figura 2.2) (21).



*Figura 2.2.*- Esquema de las diferentes estrategias utilizadas para la síntesis de nanopartículas metálicas.

#### 2.3.1 Por estrategia de síntesis

Las estrategias son importantes para la síntesis de nanopartículas. Hay dos estrategias básicas usadas en la síntesis de nanopartículas: la ascendente y la descendente. En el enfoque ascendente las nanopartículas se construyen átomo por átomo, o molécula por molécula. La estrategia



descendente consiste esencialmente en transformar objetos de la escala micrométrica a la nanométrica, donde las nanopartículas se sintetizan al romper gradualmente los materiales y transformarlos en tamaños más pequeños (Figura 2.3) (21).

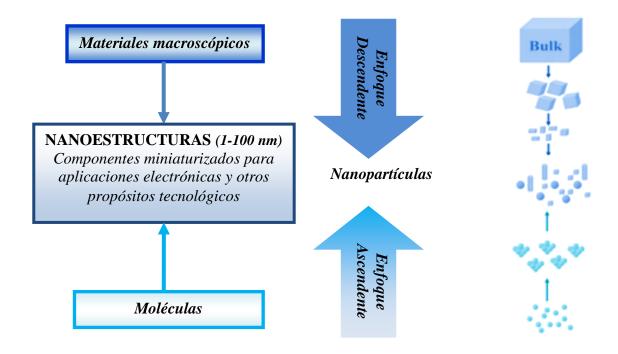


Figura 2.3.- Enfoque "descendente" y enfoque "ascendente" para nanoestructuras (22), (23).

#### 2.3.2. Por fuentes de energía

La energía esta siempre involucrada en la síntesis de nanopartículas. Los métodos de síntesis de nanopartículas pueden entonces clasificarse en función de los tipos de energía usados en el proceso de síntesis. Algunos ejemplos de estos métodos son: rayos láser, plasma, calentamiento Joule, pulverización catiónica (sputtering), rayo de electrones, microondas, hidrotérmico, liofilización, combustión y flama.

#### 2.3.3 Por naturaleza del proceso

En las diferentes técnicas para la preparación de nanopartículas pueden involucrarse procesos físicos, químicos, biológicos, o inclusive alguna combinación de estos (24), (25), (26).

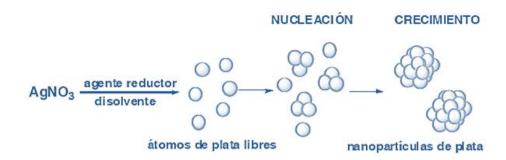




#### 2.4 Método de Síntesis Química de Nanopartículas en Medios Acuosos

El agua posee una permisividad alta que la convierte en un buen disolvente para compuestos polares o iónicos, por lo que muchas reacciones químicas se llevan a cabo en medio acuoso. Las nanopartículas de metales preciosos, tales como el Au, Ag, Pt y Pd, que son elementales para aplicaciones catalíticas y biomédicas, pueden prepararse mediante la adición de agentes de reducción solubles en agua a las soluciones acuosas de sus sales metálicas respectivas en presencia de un estabilizador.

La elección del agente de reducción puede afectar drásticamente la velocidad de nucleación y el crecimiento de la partícula que a su vez influye en la morfología, el tamaño de partícula y en la distribución de tamaños de las mismas. Los agentes de reducción que se han utilizado con mayor frecuencia para la síntesis de nanopartículas incluyen el borohidruro de sodio, hidracina, citrato de sodio y alcoholes <sup>(27), (28)</sup>. Caswell y colaboradores <sup>(29)</sup> prepararon nanoalambres cristalinos de Ag mediante la reducción de la sal de AgNO<sub>3</sub>, con citrato de sodio en presencia de NaOH a 100 °C, en la figura 2.4 se presenta el mecanismo propuesto para la formación de las nanopartículas de plata. La cantidad de NaOH fue un factor importante para determinar la morfología del producto final.



*Figura 2.4.*- Mecanismo de formación de nanopartículas de plata a partir de la reducción química en disolución de la sal de AgNO<sub>3</sub> <sup>(30)</sup>.

El tamaño de partícula y la morfología de las nanopartículas metálicas puede controlarse mediante la elección adecuada de agentes de terminación (*capping agent*), así como variando la relación de las concentraciones del agente de terminación con respectos al de las sales metálicas.

El uso del método de síntesis química en medio acuoso para la preparación de nanopartículas metálicas requiere una atención especial a fin de evitar subproductos contaminantes indeseables.





Si en una reacción rápida y mal controlada quedan atrapadas impurezas como sales y otros productos de reacción dentro de las partículas o se forman aglomerados, en donde puede que estos no se eliminen por completo, incluso repitiendo los procedimientos de lavado. Debido a la alta reactividad de las nanopartículas metálicas, originada por su gran área superficial, se requiere tener especial cuidado durante el lavado y filtrado de las mismas para evitar una hidrólisis u oxidación indeseada. Después del secado se requiere con frecuencia de procedimientos asistidos por vacío para evitar la oxidación de los materiales.

#### 2.5 Métodos de Síntesis Biológica de Nanopartículas

La síntesis biológica de nanopartículas se denomina también como "síntesis verde", donde es factible llevar a cabo la síntesis de nanopartículas a partir del uso de microorganismos, biomasa de microorganismo, plantas o sus extractos y también mediante la participación de proteínas, azúcares, fenoles y otras enzimas. De esta forma la síntesis biológica representa una alternativa limpia, presumiblemente no tóxica, amigable con el medio ambiente y que además su uso en algunas ocasiones iguala o sobrepasa las expectativas de las nanopartículas sintetizadas por métodos físicos y químicos, en cuanto a costo y calidad de las nanopartículas obtenidas <sup>(2)</sup>.

Uno de los procesos fundamentales en la síntesis biomimética de nanopartículas metálicas, implica la biosorción y bioreducción. En este proceso, los iones metálicos en solución son generalmente absorbidos a la superficie microbiana por los grupos químicos funcionales de los compuestos o biopolímeros que constituyen la pared celular y luego son reducidos *in situ* a átomos metálicos mediante la reducción por medio de azúcares a partir de polisacáridos hidrolizados de biomasa <sup>(31)</sup>.

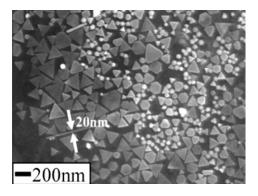
Algunas enzimas presentes en los microorganismos como las reductasas, son también responsables de la reducción de metales <sup>(32)</sup>. La nucleación y crecimiento de estructuras inorgánicas son en su mayoría controlados por proteínas y otras biomacromoléculas <sup>(33), (34)</sup>. Fendler <sup>(35)</sup> demostró que un enfoque biomimético en la síntesis de nanopartículas es posible tener compartimentos capaces de proporcionar controles estructurales, espaciales y químicos para la estabilización y generación de nanopartículas. El enfoque biomimético ha generado exitosamente nanocristales de Ag<sub>2</sub>O y partículas monodispersadas de Pt, Pd, Rh, con menos de 10nm, gracias al uso de micelas acuosas, vesículas, monocapas, microemulsiones y hasta una membrana de bicapa lípidica <sup>(21)</sup>.



#### 2.5.1 Síntesis de Nanopartículas Metálicas usando Hongos

Se ha investigado y reportado el uso de diferentes tipos de hongos para llevar a cabo la formación de nanoestructuras metálicas. Mediante estos estudios se ha demostrado que estos microorganismos poseen la capacidad para llevar a cabo la reducción de iones metálicos a nanopartículas metálicas (36). Las principales características en las que se fundamenta su aplicación son debidas a la secreción de una gran cantidad de enzimas (responsables de la reducción de los iones metálicos), facilidad de manejo, económicamente viable y facilidad de manejo, proceso económicamente viable y facilidad de realizar reacciones a escala mayor.

Recientemente, Xie y colaboradores (37) reportaron el uso de diferentes partes del microorganismo y productos del medio de cultivo del hongo filamentoso, *Aspergillus niger*. En este estudio se evaluó la superficie celular (biomasa del hongo), contenido intracelular (extracto de la biomasa del hongo), y productos metabólicos secretados para llevar a cabo la síntesis de nanocristales de oro con diferentes morfologías (esférica, nanoplaca regular, nanoplaca en espiral, nanopared, nanoaglomerado lamelar), logrando un alto rendimiento de las nanoestructuras metálicas formadas (Figura 2.5). Estos mismos autores, observaron que la forma y tamaño de estas nanoestructuras podía ser controlado mediante el uso de diferentes estructuras o componentes del microorganismo, así como variando las condiciones experimentales de síntesis. Estos resultados sugieren que posiblemente, las proteínas localizadas en la pared celular del hongo, y los extractos del mismo hongo, podrían ser los componentes primarios implicados en la síntesis de nanocristales de oro. En contraste, se determinó que la formación de nanoplacas de oro ocurre como resultado de la catálisis enzimática, donde varias moléculas pequeñas y algunas enzimas participan en el proceso de óxido-reducción mediante el mecanismo sustrato y catalizador, respectivamente.



*Figura 2.5.* Micrografía obtenida por FESEM (microscopía electrónica de barrido por emisión de campo), de las nanoestructuras de oro sintetizadas usando la biomasa del microorganismo <sup>(37)</sup>.



Aunque se ha demostrado el uso de hongos para producir nanopartículas metálicas de plata, oro y platino, la mayoría de estudios se enfocan en la síntesis de nanopartículas de plata. Entre las especies de hongos que se han estudiado se encuentran: *Aspergillus niger, Aspergillus fumigates, Aspergillus flavus, Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici, Fusarium semitectum, Phaenerochaete chrysosporium y Verticillium.* La síntesis de nanopartículas de plata usando hongos ha generado resultados interesantes en relación al tipo y distribución del tamaño de las nanopartículas formadas (38), (39), (40), (41), (42). La Tabla 2.1 muestra algunas especies de hongos que han sido reportados como mediadores en la síntesis de nanopartículas metálicas.

Tabla 2.1.- Hongos utilizados en la síntesis de nanopartículas metálicas.

Microorganismo	Nanopartícula	Caracterización	Tamaño de partícula	Referencia
Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici	Pt	TEM (morfología cúbica y rectangular)	10-100 nm	(32)
Phaenerochaete chrysosporium	Ag	ESEM	50-200nm	(38)
Fusarium oxysporum	Au	TEM (morfología esférica y triangular)	20-40 nm	(39)
Fusarium oxysporum	Ag	TEM	5-50 nm	(39)
Fusarium semitectum	Ag	Difracción de Rayos X XRD, TEM	35 nm	(41)
Aspergillus flavus	Ag	TEM	9± 16 nm	(42)
Verticillium	Ag	TEM	25 ± 12 nm	(42)
Rhizopus oryzae	Au	TEM	10 nm	(43)
Phoma Sp.3.2883	Ag	TEM esférica	$71.06 \pm 3.46$	(44)





#### 2.5.2 Síntesis de Nanopartículas Metálicas Utilizando Bacterias.

Uno de los primeros ejemplos de la síntesis de nanopartículas metálicas usando bacterias fue reportado por Beveridge y colaboradores <sup>(45)</sup>. En este estudio, se demostró la precipitación de oro coloidal de dimensiones nanométricas en el citoplasma de diferentes células bacterianas. Estas observaciones ocurrieron cuando estos microorganismos se desarrollaban en un medio de cultivo conteniendo iones de Au<sup>3+ (45), (46)</sup>. Análogamente, otros estudios han mostrado que los sobrenadantes de los cultivos de ciertas especies de bacterias como *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli* y *Enterobacter cloacae* (*Enterobacteriacae*) son capaces de promover la síntesis de nanopartículas de plata, con tan solo exponer durante un periodo de cinco minutos, iones de plata ante los extractos filtrados de estos microorganismos <sup>(47)</sup>.

Algunas especies también son capaces de reducir iones de metales preciosos en solución o sintetizar nanopartículas metálicas tanto en el interior de la célula bacteriana o mediante la secreción de agentes reductores (enzimas) hacia el medio de cultivo. Las bacterias *Bacillus subtilis, Shewanella algae, Pseudomonas stutzeri, Thermomonospora sp., Rhodococcus sp., filamentous cyanobacteria (plectonema borganum), Acidithiobacillis thiooxidans y Rhodopseudomonas capsulata* se han utilizado para sintetizar nanopartículas de plata y oro. Sin embargo, el uso de bacterias para reducir los iones metálicos y formar nanopartículas metálicas es escaso, una posible causa es la toxicidad de elementos tales como el platino y la plata en los sistemas biológicos. La Tabla 2.2 muestra ejemplos de bacterias que han sido capaces de llevar a cabo la síntesis de nanopartículas metálicas.





Tabla 2.2- Bacterias utilizadas en la Síntesis de Nanopartículas Metálicas.

Bacteria	Nanopartícula	Caracterización	Tamaño de partícula	Referencia
Pseudomonas stutzeri AG259	Ag	TEM (morfología triangular y hexagonal)	200	(34)
Rhodopseudomas capsulata	Au	TEM (forma esférica)	10-20 nm	(48)
Plectonema borganum	Au	TEM (forma octaédrica)	10 nm	(49)
Plectonema borganum	Pt	TEM (forma esférica)	Múltiples tamaños	(49)
Pseudomonas aeruginosa	Au	TEM	40 ± 10 nm	(50)
Klebsiella pneumonia	Ag	TEM (forma esférica)	28-120 nm	(51)
Lactobacillus sp. (Aislados de la mantequilla)	Ag	TEM (morfología triangular, hexagonal y otras formas)	20 – 50	(52)

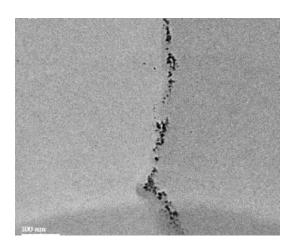
#### 2.5.3 Síntesis de Nanopartículas Metálicas Utilizando Plantas

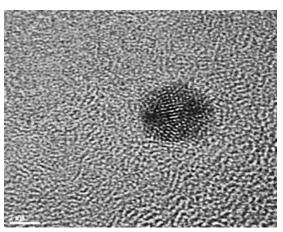
Para prolongar la vida útil de las nanopartículas metálicas, y evitar efectos no deseados como la agregación en soluciones acuosas y solventes orgánicos, así como la reutilización y el reciclaje de las nanopartículas, es vital seleccionar agentes estabilizadores y formas de funcionalización que sean amigables con el medio ambiente, no tóxicas y fáciles de implementar <sup>(64)</sup>. Es por ello que la formación de nanopartículas mediante el uso de plantas y sus extractos como agente reductor y agente estabilizante ha captado gran atención.

El primer reporte de producción de nanopartículas mediante el uso de plantas se acreditó a Gardea-Torresdey y colaboradores <sup>(53)</sup>, quienes encontraron que las plantas de alfalfa (*Medicago sativa*) crecían por dos semanas en un medio enriquecido en Au(III) y después reducían el Au(III) a Au(0), formando estructuras en la configuración cúbica centrada en las caras (FCC). Las



imágenes de TEM del oro reducido dentro de los tejidos de las plantas mostró una estructura icosaédrica, la cual se considera como la configuración de más baja energía para el Au (0). Subsecuentemente, se realizó el mismo cultivo en un medio enriquecido en plata, y se encontró que la planta también mostraba una capacidad para formar nanopartículas (Figura 2.6) (54), (55). Las imágenes de TEM de los arreglos de segmentos de las nanoestructuras de plata mostraron un intervalo de tamaño de partícula entre 2 y 20 nm distribuidos en todo el arreglo del segmento.





*Figura 2.6.-* Micrografía a) TEM de las nanopartículas de plata obtenidas empleando el extracto de la planta de alfalfa, y b) micrografía HRTEM de las nanopartículas de plata en estado cristalino, con un intervalo de tamaño de 2-3 nm y forma icosaédrica (54), (55).

Tiempo después, Gardea-Torresdey y colaboradores, en la Universidad de Texas, reportaron que el sauce del desierto (*Chilopsis linearis*), una especie de planta de desierto que crece en residuos mineros, es capaz de absorber y reducir arriba del 67% del Au(III) a Au(0), aun en presencia de tiourea o tiocianato <sup>(53)</sup>. Un análisis por espectroscopia de absorción de rayos X (XAS) y microscopia electrónica de transmisión (TEM) de las muestras con nanopartículas de oro, mostró que el sauce del desierto es capaz de producir nanopartículas de oro en el interior de las células de sus tejidos.

Huang y colaboradores estudiaron la reducción de los iones de plata y oro en hojas secas de *Cinnamomum camphora* <sup>(56)</sup>. Al analizar las nanopartículas de plata formadas en la biomasa mediante su caracterización con microscopia electrónica de transmisión (TEM), se observó la distribución del tamaño de partícula en el intervalo de 20 a 85 nm, aunque la mayoría se encontró en el intervalo de 50 a 85 nm, con una mayor proporción entre 65 y 75 nm. El análisis por difracción de rayos X (XRD) indicó que las nanopartículas de oro y plata sintetizadas en la





biomasa de la C. camphora, tuvieron estructuras con configuración cúbica centrada en las caras (FCC), mostrando planos cristalinos con índices de Miller (111), (200) y (311) para la plata y el oro. En este estudio se establece que los componentes poliol y los componentes heterocíclicos solubles en agua fueron los principales responsables de la reducción de iones de plata o iones cloroauratos, así como de la estabilización de las nanopartículas, respectivamente. En este estudio, las hojas secadas al sol fueron muy propicias para la síntesis simple de las nanopartículas.

Los extractos de Aloe Vera, hojas de geranio, hierbas de limón, extractos de la fruta Emblica officinalis y caldo de las hojas del Neem han sido usados para sintetizar nanopartículas de Au (0), Ag (0) u oro/plata. Las técnicas de síntesis en este tipo de estudio implican la obtención de un extracto de la planta mediante la cocción en agua del material vegetal fresco cortado en diferentes proporciones para crear una solución acuosa o extracto la cual contiene ácidos orgánicos y otros compuestos orgánicos presentes en las plantas. Este extracto se hace reaccionar con los iones de oro o de plata a diferentes tiempos, temperaturas y concentraciones (57), (58), (59), (60), (61).

Chandran y colaboradores (58) sintetizaron nanotriángulos de oro y nanopartículas esféricas de plata mediante un procedimiento simple usando el extracto de la hoja del Aloe Vera como agente reductor. La reducción de los iones de plata condujeron a la formación de nanopartículas de plata esféricas de  $15.2 \pm 4.2$  nm de tamaño. El análisis por TEM y difracción de electrones comprobó la formación de nanopartículas esféricas de Ag (0), presentando planos cristalinos con índices de Miller (111), (200), (220) y (311) en la estructura cúbica centrada en las caras (FCC).

Ankamwar y colaboradores (59) reportaron la síntesis extracelular de nanopartículas de oro y plata usando el extracto de la fruta Emblica Officinalis (grosella de la India) como agente reductor para sintetizar las nanopartículas de plata y oro. En este estudio, el análisis mediante microscopia electrónica de transmisión indicó una distribución de tamaño de partícula en un intervalo de 10 -20 nm para las nanopartículas de oro, mientras que las nanopartículas de plata mostraron una distribución en el intervalo de 15 y 25 nm.

En otros estudios, se han sintetizado nanopartículas de plata usando los extractos de la planta Capsicum annum L. (pimiento de Cayena) (60). En este trabajo se establece que dependiendo de las condiciones de reacción, el tamaño promedio de partícula, determinado mediante su análisis por difracción de rayos X y utilizando la ecuación de Debye- Scherrer, fue de 42- 46 nm.





Adicionalmente, el análisis por TEM mostró la presencia de nanopartículas esféricas originadas por la reducción de la sal de plata por los extractos. Este estudio sugiere que la reducción de los iones de plata y la estabilización de las nanopartículas de plata ocurrió a través de la participación de proteínas presentes en los extractos de las planta. El tamaño de las nanopartículas de plata se incrementó conforme se incrementaba el tiempo de reacción, y la naturaleza cristalina de las nanopartículas cambió de policristalina a cristal único.

Shankar y colaboradores <sup>(57)</sup> reportaron el uso del extracto de la hoja del geranio *Pelargonium* graveolens, para llevar a cabo la biosíntesis extracelular de nanopartículas de plata. En el tratamiento de la solución acuosa de nitrato de plata con el extracto de la hoja de geranio, se observó la rápida reducción de los iones de plata conduciendo a la formación de nanopartículas de plata de gran estabilidad en la solución. Mediante un análisis de las partículas de plata por microscopia electrónica de transmisión se observó que las nanopartículas de plata obtenidas registraron una distribución de tamaños de partícula en un intervalo entre 16 – 40 nm.

Posteriormente, Shankar y colaboradores continuaron su estudio de síntesis de nanopartículas de oro y plata, y nanopartículas bimetálicas de Au/ Ag, pero en esta ocasión su estudio se realizó con extractos del caldo de hojas de Neem (Azadirachta indica) (61). Durante el tratamiento de las soluciones acuosas de nitrato de plata y ácido cloroáurico con el extracto de la hoja de Neems, observaron una formación rápida de nanopartículas de plata y oro estables a altas concentraciones. Las nanopartículas de plata y oro que se obtuvieron fueron polidispersas, con un gran porcentaje de partículas de oro exhibiendo una interesante morfología plana tipo placa. Un análisis de TEM mostró que el tamaño de las nanopartículas sintetizadas mediante este método se encontraban en el intervalo de 50 a 100 nm, también se observaron nanopartículas entre 50-70 nm, con nanopartículas más pequeñas de 15 – 20 nm. Estos autores compararon la velocidad de reducción de los iones de plata utilizando los extractos de la hoja de geranio y de la hoja de Neem con estudios anteriores en los cuales emplearon microorganismos como el hongo Fusarium oxysporum (39), y llegaron a la conclusión de que la velocidad de reducción de los iones de plata empleando los extractos de las hojas resultó ser más rápida que la observada con los hongos, destacando así la posibilidad de que las metodologías de biosíntesis de nanopartículas lograrán velocidades de síntesis comparables a las de los métodos químicos (57), (58), (59), (60), (61).



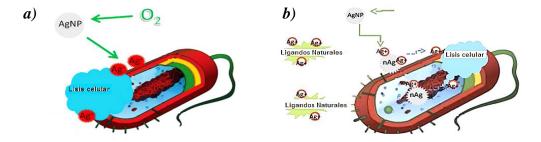
Lo importante de los estudios anteriores es que se ha demostrado la posibilidad de efectuar un proceso de síntesis sencillo y eficiente de nanopartículas metálicas ya sea con plantas vivas o muertas.

#### 2.6 Nanopartículas de Plata

En los últimos años las nanopartículas de plata se han investigado ampliamente debido a la dependencia de su tamaño con las propiedades ópticas, eléctricas y magnéticas. En la escala nanométrica, la plata presenta inusuales propiedades físicas, químicas y biológicas, además de su actividad antimicrobiana <sup>(62)</sup>. Actualmente la aplicación de las nanopartículas de plata se encuentra enfocada en su uso como agentes bactericidas o fungicidas en áreas tales como: la biotecnología, bioingeniería, medicina, ingeniería textil, tratamiento del agua y productos de consumo a base de plata <sup>(63)</sup>.

Debido a su fuerte actividad bactericida, las nanopartículas de plata se utilizan ampliamente en el campo biomédico para el control de infecciones <sup>(64), (65)</sup>, en recubrimientos de varios materiales textiles y en determinados implantes, además de usarse en el tratamiento de heridas y quemaduras, así como también se ha comercializado como un desinfectante para el agua.

Algunos estudios con nanopartículas de plata realizados por Sondi y Salopek-Sondi, demostraron que las nanopartículas con un diámetro de 12nm, muestran un fuerte efecto bactericida sobre cepas de la bacteria *E. coli* <sup>(66)</sup>. Mediante microscopia electrónica de barrido (SEM) y microscopia electrónica de transmisión (TEM) se observó que las nanopartículas de plata se acumulan en la membrana celular de la bacteria *Escherichia coli* ocasionando un daño a las células mediante la interrupción del crecimiento y algunas funciones metabólicas (Fig. 2.7).



*Figura 2.7.-* Mecanismos sugeridos sobre la acción bactericida de las nanopartículas de plata en diferentes microorganismos. a) A nivel de destrucción de la pared celular, y b) nivel de ataque a las biomacromoléculas (ADN, ARN, proteínas, etc.).





En otros estudios se ha evaluado la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata con tamaño de partícula promedio de 13.5 nm sobre cepas de *E.coli y Staphylococcus aureus* <sup>(67)</sup>, donde el crecimiento microbiano de la cepa de *E. coli* fue inhibido a una concentración de nanopartículas de plata de 3.3 nM, mientras que los efectos inhibidores de crecimiento en la cepa de *S.aureus* fueron leves. Estos resultados sugieren que las nanopartículas de plata pueden ser utilizadas como inhibidores de crecimiento de microorganismos patógenos, por lo que se pueden aplicar en diversos dispositivos médicos y sistemas de control antimicrobiano.

La plata es actualmente el material de nano-ingeniería más comúnmente usado para productos de consumo. Entre varios productos de consumo basados en la nanotecnología, de acuerdo a un estudio realizado por el centro de investigación *Woodrow Wilson International Center for Scholars* los materiales más comunes en las descripciones de un producto es la plata, seguido de carbono (por los fullerenos), zinc (óxido de zinc), titanio (óxido de titanio), sílice y oro (23).

Aun con los métodos existentes para la producción de nanopartículas y materiales a base de plata, continúa la búsqueda de métodos que sean fáciles, económicos, eficientes, con buenas propiedades bactericidas y ambientalmente amigables al reducir el uso de temperaturas altas y reactivos tóxicos.

#### 2.7 Aplicaciones de Nanopartículas de Plata

Cómo se mencionó anteriormente la aplicación de las nanopartículas de plata se enfoca en áreas como la biotecnología, bioingeniería, medicina, ingeniería textil, tratamiento del agua y productos de consumo a base de plata <sup>(63)</sup>.

Una aplicación de las nanopartículas de plata es su uso como un catalizador. Jiang y colaboradores (68) investigaron las propiedades catalíticas de las nanopartículas de plata soportadas en esferas de sílice. Las nanopartículas de plata inmovilizadas en las esferas de sílice probaron su capacidad para la reducción de los colorantes mediante borohidruro de sodio (NaBH<sub>4</sub>). La catálisis de los colorantes fue elegida debido a que es fácil de detectar un cambio de color cuando son reducidos. En ausencia de nanopartículas de plata la muestra fue casi estacionaria mostrando muy poca o ninguna reducción de los colorantes, en cambio cuando se agregaron las nanopartículas de plata a la solución, la muestra fue reducida rápidamente. En este tipo de reacción, las nanopartículas de





plata actúan como un liberador de electrones, ayudando en la transferencia de electrones de los iones de  $BH_4^-$  a los colorantes, y por lo tanto causando una reducción de los colorantes. Los iones del  $BH_4^-$  son nucleófilos mientras que los colorantes son electrófilos. Los iones nucleófilos pueden donar electrones a partículas metálicas, mientras que un electrófilo puede capturar electrones de las partículas de metal. Se ha demostrado que los iones del  $BH_4^-$  y los colorantes son simultáneamente absorbidos en la superficie de las partículas de plata cuando éstas se encuentran juntas.

Las nanopartículas de plata tienen una fuerte tendencia a aglomerarse, lo cual reduce la relación de superficie-volumen y de tal modo el efecto catalítico disminuye. Para prevenir este fenómeno, con frecuencia se utiliza un agente estabilizador. El agente se absorbe en la superficie de las nanopartículas protegiéndolas de los oxidantes y reductores y por lo tanto puede inhibir la catálisis, por lo que actualmente se buscan métodos para estabilizar las nanopartículas, pero que al mismo tiempo conserven su capacidad catalítica. Se ha comprobado que las fuerzas intermoleculares, las cuales mantienen inmovilizadas a las nanopartículas en las esferas de sílice, son lo suficientemente fuertes como para evitar que las partículas formen agregados.

Otra aplicación de las nanopartículas de plata es su uso para la preparación de sensores ópticos de alta sensibilidad en el orden del zeptomol  $(10^{-21})^{-(69)}$ . Mc. Farland y Duyne demostraron que usando el efecto de resonancia de plasmón de superficie (LSPR), las nanopartículas de plata obtenían una sensibilidad muy alta y las mediciones podían llevarse a cabo en tiempo real. Los experimentos realizados por McFarland and Duyne mostraron que hay poca diferencia entre la sensibilidad de una sola nanopartícula de plata y en su conjunto, ya que las sensibilidades fueron de 191 y 197 RIU<sup>-1</sup> (unidades de índice de refracción) para las nanopartículas individuales y en conjunto, respectivamente. El estudio mostró resultados que indicaron una relación lineal de la forma y tamaño de las nanopartículas. Una de las posibles aplicaciones de la alta sensibilidad de la LSPR es para la detección *in vivo*. Con ello es posible monitorear la cantidad de especies químicas dentro de una célula así como el proceso dinámico que ocurre.

Otra área donde se ha demostrado que las nanopartículas de plata son efectivas, es en el control y eliminación del crecimiento bacteriano. Se han desarrollado varias aplicaciones en las cuales se aprovecha el efecto bactericida de las nanopartículas de plata. Jain y Pradeep (70) realizaron un





estudio en el cual demostraron el efecto bactericida de una espuma de poliuretano cubierta con nanopartículas de plata, mediante la exposición durante toda la noche de las espumas en soluciones de nanopartículas de plata. De igual manera demostraron también que las nanopartículas eran estables en la espuma y que al momento de lavar la espuma, las nanopartículas no eran arrastradas por el agua. A fin de establecer las propiedades antimicrobianas del material con las nanopartículas de plata, se llevaron a cabo tres diferentes pruebas; la prueba del tubo de ensayo, prueba de flujo y prueba de zona de inhibición. Los resultados de estas metodologías arrojaron resultados que demostraron que la espuma cubierta con nanopartículas tuvo un efecto bactericida contra la bacteria E. coli. Las pruebas y los resultados están en conformidad con las normas establecidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1996) para el agua potable. Con este estudio se mostró una aplicación más de las nanopartículas de plata, en la cual las espumas pueden ser cubiertas con nanopartículas de plata para ser utilizadas como filtros de agua.

Otros investigadores han estudiado la aplicación de las nanopartículas de plata para la fabricación de telas de algodón con un acabado textil antibacteriano (71). En este estudio, la tela de algodón se trató con nanoplata coloidal mediante un método de impregnación para proporcionar propiedades antibacterianas a la tela de algodón. El tamaño de las partículas de plata preparadas en este estudio fue entre 10 - 30 nm. La solución de nanoplata coloidal mostró buena estabilidad aun después de 2 meses. Los resultados de las pruebas realizadas indicaron que la tela de algodón tratada con plata exhibió una reducción de la población de la bacteria Staphylococcus aureus del 99.01%, y una reducción de la bacteria Escherichia coli del 99.26% cuando se utilizó un material textil tratado con un contenido de plata en el algodón de alrededor de 88 mg/kg. Otros usos de las nanopartículas de plata incluyen su aplicación a calcetines con el fin de prevenir el crecimiento de las bacterias que causan el mal olor, y también sobre una gama de productos para el cuidado de la salud, tales como vendas para quemaduras, excoriaciones y donantes de tejidos. En la figura 2.8 se presenta una imagen por microscopia electrónica de barrido (SEM) de las nanopartículas de plata usadas para la impregnación de estos productos.



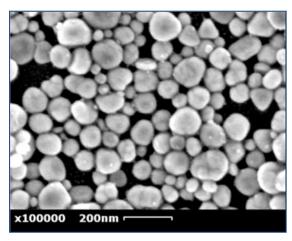


Figura 2.8.- Imagen por microscopia electrónica de barrido (SEM) de nanopartículas de plata (72).

Lee y colaboradores <sup>(73)</sup>, prepararon fibras ultrafinas con actividad antimicrobiana utilizando poli (acrilonitrilo) (PAN) y nanopartículas de plata. La formación de nanopartículas de plata se llevó a cabo mediante la reducción de los iones de plata contenidos en una solución de PAN y la solución resultante de nanopartículas fue electro-hilada en fibras ultrafinas de PAN. La cantidad de nanopartículas de Ag distribuidas en las fibras ultrafinas de PAN incrementó conforme la cantidad de AgNO<sub>3</sub> en la solución de reacción se incrementó de 0.05 a 0.5 % P/V. La morfología de las nanopartículas de Ag obtenidas en este sistema fue de forma esférica con un diámetro promedio de menos de 5,8 nm.

#### 2.7.1 Incorporación de nanopartículas de plata en matrices poliméricas y su procesamiento

La incorporación de nanopartículas metálicas en matrices poliméricas esta despertando un gran interés en muchos campos de la química, física y la ciencia de los materiales <sup>(3)</sup>, permitiendo el desarrollo de materiales que presenten mejores propiedades físico-mecánicas derivadas del tamaño nanométrico y de la forma de las nanopartículas <sup>(74)</sup>, así como de las interacciones de las nanopartículas con la matriz polimérica (la adsorción, solubilidad, encapsulación).

Entre estos materiales las fibras se caracterizan por su alta área de superficie específica, flexibilidad y fuerza direccional, haciendo que esta forma de material sea preferida para muchas aplicaciones que van desde prendas de vestir hasta refuerzos para estructuras aeroespaciales. Los materiales fibrosos en la escala nanométrica son los pilares fundamentales de mecánica de soporte, sostén y movilidad en los sistemas vivientes, conduciendo señales eléctricas y químicas que





resultan de diversos tipos de estimulación. Estas señales dirigen funciones de las células tales como el almacenamiento de energía, recuperación y almacenamiento de información y regeneración de tejidos <sup>(75)</sup>.

En la actualidad la incorporación de nanopartículas de plata en matrices poliméricas para proporcionar propiedades bactericidas, conductivas u optoelectrónicas, representa un gran reto tanto para el área académica así como para el sector industrial.

#### 2.8 Nanofibras

La preparación de nanofibras constituye un área de investigación emergente e interdisciplinaria, con importantes aplicaciones comerciales, además de ser una tecnología dominante en las nuevas economías del mundo. Las nanofibras son capaces de formar una malla de alta porosidad (76) además de caracterizarse por poseer un área superficial específica excepcionalmente alta, lo que permite que una alta proporción de átomos se encuentren en la superficie de la fibra, dando lugar a una eficiencia cuántica, efecto de energía superficial excepcionalmente alta, reactividad de la superficie, alta conductividad térmica y eléctrica, y una alta resistencia (77).

De acuerdo a la Fundación Nacional de Ciencia (NSF) y a literatura científica relacionada con las fibras, las nanofibras se definen como fibras que poseen un diámetro igual o inferior a 100 nm, pero normalmente las nanofibras se definen como estructuras alargadas y delgadas en forma de hilo que tienen diámetros de menos de un micrón <sup>(75), (78)</sup>.

Las nanofibras poliméricas pueden ser procesadas y obtenidas mediante varias técnicas que a continuación se enlistan:

- Dibujado
- Síntesis de Plantillas
- Separación de Fases
- Autoensamblado
- Electrohilado

Una comparación de los distintos aspectos relacionados con estos métodos de elaboración y algunas ventajas y desventajas para la preparación de nanofibras se presenta a continuación en las tablas 2.3 y 2.4:





*Tabla 2.3.-* Comparación de las técnicas de procesamiento para la obtención de nanofibras <sup>(79)</sup>.

Técnica	Avances Tecnológicos	¿Puede ser llevado a escala?	Repetitividad	¿Es conveniente para el proceso?	Control de las dimensiones de las fibras
Dibujado	Laboratorio	×	<b>✓</b>	<b>~</b>	*
Síntesis en Plantilla	Laboratorio	ж	<b>√</b>	<b>√</b>	<b>V</b>
Separación de Fases	Laboratorio	×	V	V	ж
Autoensamblado	Laboratorio	×	<b>√</b>	×	х
Electrohilado	Laboratorio (con potencial para procesamiento industrial)	<b>~</b>	<b>~</b>	<b>✓</b>	<b>~</b>

*Tabla 2.4.-* Ventajas y desventajas de varias técnicas de procesamiento de nanofibras <sup>(79)</sup>.

Técnica	Ventaja	Desventaja
Dibujado	Requiere mínimo equipo.	Proceso discontinuo
Síntesis en Plantilla	Se pueden obtener fibras de diferentes diámetros mediante el uso de diferentes plantillas.	
Separación de Fases	Requiere mínimo equipo. Se puede fabricar directamente una matriz nanofibrosa. Las propiedades mecánicas de la matriz se pueden adaptar mediante el ajuste de la concentración del polímero.	Limitado a ciertos polímeros
Autoensamblado	Bueno para obtener nanofibras muy pequeñas.	Proceso complejo
Electrohilado	Proceso continuo y de bajo costo.	Inestabilidad del chorro





Entre estas técnicas el proceso de electrohilado es la metodología más barata y directa con la capacidad única para producir nanofibras de diferentes materiales en varios tejidos fibrosos, con el cual se pueden elaborar una variedad de nanofibras para aplicaciones en: salud, almacenamiento de energía, biotecnología, ingeniería ambiental, defensa y la seguridad <sup>(76)</sup>.

#### 2.9 Proceso de Electrohilado

El proceso de electrohilado fue patentado por Formhals en 1934, en donde un equipo experimental se destacó por la producción de filamentos de polímero usando la fuerza electrostática <sup>(80)</sup>. Cuando se usó este proceso para hilar fibras, el proceso fue denominado como *electrohilado*. El electrohilado es un proceso de fabricación novedoso y eficiente que puede utilizarse para ensamblar tejidos de fibras poliméricas, formados por fibras con diámetros que oscilan desde los micrones hasta los nanómetros. Este método de procesamiento electrostático utiliza un campo eléctrico de alto voltaje para formar fibras sólidas a partir de una corriente de fluido polimérico (en solución o fundido) liberado a través de una boquilla de escala milimétrica <sup>(79)</sup>.

El proceso de electrohilado consiste básicamente de las siguientes etapas:

- a) Un campo electrostático lo suficientemente fuerte, es aplicado entre dos polos opuestos conformados por una aguja o sistema de inyección y una placa metálica o colector, (el cual está a un potencial cero) donde se depositan las fibras nanométricas formando un tejido con textura, color y densidad características, las variables anteriores dependen fuertemente de las condiciones ambientales, humedad y temperatura.
- b) Se agrega un polímero en un tubo de cristal, generalmente una pipeta, la cual se conecta a una jeringuilla. Una bomba de infusión o perfusión unida al émbolo de la jeringuilla genera una presión y un flujo constante a través de la pipeta, al aparecer los efectos de polarización y carga, debido al campo eléctrico presente, la solución es arrojada en forma de chorro hacia una superficie conductora conectada a tierra a una distancia entre 5 a 30 cm del cono o aguja. Durante la creación del chorro, el solvente gradualmente se evapora, y el producto obtenido es una plantilla de fibra no tejida compuesta de nanofibras con diámetros que puede variar entre 50 nm y 10μm.





En el flujo electro-hidrodinámico del chorro, las cargas son inducidas en el fluido a través de la distancia de los electrodos (pipeta y colector), rompiéndose la tensión superficial a través del campo eléctrico y descomponiéndose en una tangencial y una normal formando el cono de Taylor. A medida que el chorro toma una aceleración, su diámetro disminuye en magnitud y forma, la componente tangencial y la componente normal son balanceadas; finalmente el chorro se solidifica creando una fibra de medidas nanométricas (Fig. 2.9) (81).

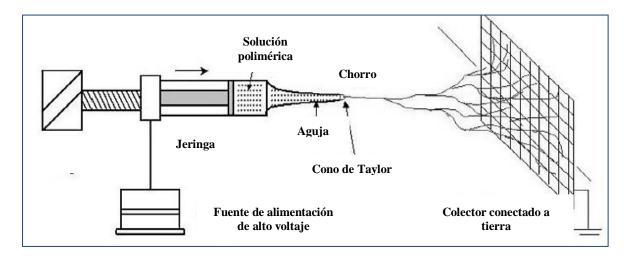


Figura 2.9.- Esquema Básico de la Técnica de Electrohilado

### 2.9.1 Parámetros y condiciones en el proceso de electrohilado

Los parámetros que afectan el electrohilado y las fibras se pueden clasificar en los parámetros de solución del polímero y condiciones de procesamiento. Entre las condiciones de procesamiento se incluyen el voltaje aplicado, la temperatura, el efecto del colector, y las condiciones del ambiente. Con la comprensión de estos parámetros, es posible mostrar configuraciones para producir estructuras fibrosas de diversas formas y arreglos, así como también es posible crear nanofibras con morfología diferente mediante la variación de éstos (77), (79).

### I.-Parámetros de Solución del Polímero

Las propiedades de la solución de polímero tienen la influencia más significativa en el proceso de electrohilado y la morfología de la fibra resultante. La tensión superficial desempeña un papel importante en la formación de esferas a lo largo de la longitud de la fibra. La viscosidad de la





solución y sus propiedades eléctricas determinan el grado de alargamiento de la solución. Esto a su vez tendrá un efecto sobre el diámetro de las fibras de electrohilado resultantes <sup>(79)</sup>.

### a) Peso Molecular y viscosidad de la solución

Uno de los factores que afecta la viscosidad de la solución es el peso molecular del polímero. Una de las condiciones necesarias para que el electrohilado ocurra, es que el peso molecular del polímero contenido en la solución, debe ser lo suficientemente alto, para que la solución alcance la viscosidad mínima para el inicio del proceso de electrohilado. El peso molecular del polímero representa la longitud de la cadena de polímero, que a su vez tiene un efecto sobre la viscosidad de la solución ya que la longitud del polímero determinará la cantidad de enmarañamientos de las cadenas de polímero en el solvente. Una forma de aumentar la viscosidad de la solución es aumentar la concentración del polímero. Al igual que aumentar el peso molecular, un incremento en la concentración dará lugar a una mayor proporción de enmarañamiento de cadenas de polímero dentro de la solución, lo cual es necesario para mantener la continuidad del chorro durante el electrohilado (79).

### b) Tensión superficial

Cuando el chorro viaja hacia el colector, la tensión superficial puede causar formaciones esféricas a lo largo del chorro, además de disminuir el área de superficie por unidad de masa de un fluido. En este caso, cuando hay una alta concentración de moléculas del solvente libres, hay una mayor tendencia de las moléculas del solvente a reunirse y adoptar una forma esférica debido a la tensión superficial. El uso de solventes como el etanol provoca una baja tensión superficial, por lo que pueden ser agregados para fomentar la formación de fibras lisas. Otra forma de reducir la tensión superficial es agregando un surfactante a la solución, lo que produce fibras más uniformes (79).

### c) Conductividad de la solución

En el proceso de electrohilado, el estiramiento del chorro de la solución es originado por la repulsión de las cargas en su superficie. Así, cuando se incrementa la conductividad de la solución, más cargas pueden llevarse por el chorro de electrohilado. La conductividad de la solución se puede aumentar mediante la adición de iones <sup>(79)</sup>.





### d) Efecto Dieléctrico del Solvente

La constante dieléctrica de un solvente tiene una influencia significativa en el proceso de electrohilado. Por lo general, una solución con una propiedad dieléctrica mayor reduce las formaciones esféricas y el diámetro de la fibra resultante. Solventes, como N, N-dimetilformamida (DMF) pueden añadirse a una solución para aumentar su propiedad dieléctrica y mejorar la morfología de la fibra <sup>(82)</sup>.

### II.- Condiciones de procesado

Los factores externos pueden también afectar el proceso de electrohilado. Esto incluye el voltaje aplicado, la velocidad de alimentación, la temperatura de la solución, el tipo de colector, el diámetro de la aguja y la distancia entre la punta de la aguja y el colector. Estos parámetros tienen una cierta influencia en la morfología de la fibra, aunque son menos importantes que los parámetros de la solución <sup>(79)</sup>.

### a) Voltaje

Un elemento crucial en el electrohilado es la aplicación de un voltaje alto a la solución. El alto voltaje induce las cargas necesarias sobre la solución y junto con el campo eléctrico externo, inician el proceso de electrohilado al momento que la fuerza electrostática en la solución sobrepase la tensión superficial de la solución. Generalmente, un voltaje negativo o positivo de más de 6 kV es capaz de provocar que la gota de solución en la punta de la aguja se distorsione, para dar lugar a la formación del bien conocido cono de Taylor, durante el primer chorro (82). El voltaje va ligado a la distancia entre el inyector y la superficie de recolección. A mayor potencial eléctrico las fibras son más delgadas y livianas que es, proporcional a la inyección (81).

### b) Velocidad de alimentación

La velocidad de alimentación es un parámetro que determina la cantidad de solución disponible para el electrohilado. Para un voltaje determinado, hay una velocidad de alimentación correspondiente para que sea posible mantener el cono de Taylor estable. Cuando la velocidad de alimentación se incrementa, hay un incremento correspondiente en el diámetro de la fibra o en el tamaño de esferas. Esto es evidente ya que hay un mayor volumen de solución que se aleja de la punta de la aguja (79).



### c) Temperatura

La temperatura de la solución tiene el efecto de incrementar su velocidad de evaporación y reducir la viscosidad de la solución de polímero <sup>(79)</sup>.

### d) Efecto del colector

Debe haber un campo eléctrico entre la fuente y el colector para iniciar el electrohilado. Por lo que en la configuración de electrohilado, el plato colector está hecho de un material conductor, como papel aluminio, y se conecta a tierra para que haya una diferencia de potencial estable entre la fuente y el colector <sup>(79)</sup>.

### e) Distancia entre la punta y el colector

La distancia recorrida por el chorro hacia el colector se puede definir como distancia de inyección, ésta depende de la variación de voltaje aplicado y de la densidad del polímero empleado <sup>(81)</sup>.

Variando la distancia entre la punta y el colector se tiene una influencia directa tanto en el tiempo de vuelo y la intensidad de campo eléctrico, los cuales afectan el proceso de electrohilado y las fibras resultantes.

Cuando la distancia entre la punta y el colector disminuye, el chorro tiene una distancia más corta para viajar antes de que llegue al plato colector. Por otra parte, la intensidad de campo eléctrico también se incrementará al mismo tiempo y esto incrementará la aceleración del chorro al colector.

#### f) Parámetros del ambiente

Cualquier interacción entre el entorno y la solución de polímero puede tener un efecto significativo sobre la morfología de las fibras formadas a través del proceso de electrohilado. Se ha encontrado a través de diversos estudios que un incremento en la humedad ocasiona la formación de poros circulares sobre la superficie de las fibras. Ya que el electrohilado es afectado por el campo eléctrico externo, cualquier cambio en el ambiente durante el proceso de formación de las nanofibras, afectara también el proceso de electrohilado (79).





### 2.9.2 Polímeros utilizados en el proceso de electrohilado

Un gran número de polímeros se han aplicado para la obtención de fibras usando la técnica de electrohilado, obteniendo materiales en forma de fibra con diámetros uniformes en varios intervalos de micrómetros a decenas de nanómetros (83), (84), (85).

En la actualidad, más de 100 diferentes polímeros, tanto sintéticos como naturales, han sido exitosamente utilizados en el proceso de electrohilado para la formación de nanofibras, la mayor parte de estos materiales se ha aplicado preparando los polímeros en solución.

Es importante señalar que el electrohilado es un proceso físico. Por lo tanto, en el electrohilado de un polímero en solución, todos los polímeros pueden ser electrohilados en nanofibras, siempre y cuando el peso molecular del polímero sea lo suficientemente alto y el solvente pueda ser evaporado en el tiempo durante el transcurso del recorrido del chorro entre la punta y el colector. Para controlar y promover la evaporación del disolvente, se puede introducir un flujo de gas adicional a elevadas temperaturas. Esto provoca reducciones en la viscosidad de la solución así como también en la tensión superficial, llevando a una ampliación de la gama de soluciones de polímeros que pueden ser utilizadas en el proceso de electrohilado <sup>(86)</sup>.

Entre los polímeros exitosamente electrohilados para formar nanofibras se incluyen el nylon-6, poliacrilonitrilo (PAN), polibenzimidazole (PBI), policarbonatos, poli $(\epsilon$ - caprolactona) (PCL), poli $(\epsilon$ - caprolactona) (PCL), poli $(\epsilon$ - caprolactona) (PEO), poli $(\epsilon$ - caprolactona) (PEO), poli $(\epsilon$ - caprolactona) (PCL), poli $(\epsilon$ - caprolactona) (PS), kevlar [poli $(\epsilon$ - caprolactona) (PEO), poli $(\epsilon$ - caprolactona) (PS), kevlar [poli $(\epsilon$ - caprolactona) (PS), poli $(\epsilon$ - caprolactona) (PS), kevlar [poli $(\epsilon$ - caprolactona) (PS), poli $(\epsilon$ - caprolactona) (PS), kevlar [poli $(\epsilon$ - caprolactona) (PCL), poli $(\epsilon$ - caprolactona) (PS), kevlar [poli $(\epsilon$ - caprolactona) (PCL), poli $(\epsilon$ - caprolactona) (PS), kevlar [poli $(\epsilon$ - caprolactona) (PCL), poli $(\epsilon$ - caprolactona) (PCL), pol

Entre los polímeros anteriormente mencionados, el PVA se caracteriza por ser un polímero sintético no tóxico, biodegradable, hidrosoluble, biocompatible y ampliamente usado en el campo biomédico. Además, el PVA presenta mejores propiedades formadoras de fibras y han sido comercializadas desde 1950 <sup>(88)</sup>.

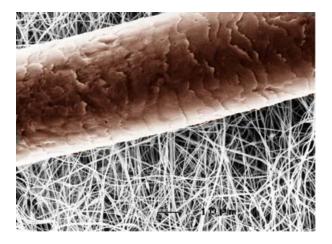




El electrohilado también ha sido usado para producir nanofibras de polímeros naturales, incluyendo proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos. Las fibras electrohiladas de polímeros naturales se han caracterizado con respecto a sus aplicaciones como materiales biocompatibles o bioabsorbibles. Debido a su producción abundante en la naturaleza y excelente biocompatibilidad, el quitosán es un polímero muy prometedor para este propósito. El quitosán es un polímero derivado de la quitina, uno de los polisacáridos naturales más abundantes, se conoce por sus propiedades únicas antimicrobianas y de inhibir el crecimiento de una amplia variedad de hongos, levaduras y bacterias, por lo que puede ser benéfico para uso en el campo de la biomedicina (89).

### 2.10 Nanofibras y Electrohilado

El electrohilado es capaz de producir fibras de polímero con diámetros en la escala nanométrica donde dependiendo del polímero específico que se utiliza, se pueden conseguir una amplia gama de propiedades en los tejidos, tales como la fuerza, peso, porosidad, funcionalidad de la superficie entre otras. Esta novedosa técnica de hilado de fibras proporciona también la capacidad para ensamblar una variedad de tipos de polímeros, fibras, y partículas para producir capas ultradelgadas (Figura 2.10) <sup>(90)</sup>.



*Figura 2.10.*- La micrografía muestra un cabello humano (80,000 nanómetros), colocado sobre una membrana de nanofibras obtenidas por electrohilado <sup>(90)</sup>.

Las nanofibras por electrohilado son de indispensable importancia para la renovación científica y económica de los países en desarrollo, ya que se consideran para varios tipos de aplicaciones como: telas no tejidas, fibras reforzadas, soporte para enzimas, soportes para catalizadores, sistemas de liberación de medicamentos, celdas de combustible, polímeros conductores y materiales compuestos, fotónica, sensores, medicina, farmacia, vendajes para heridas, filtración,





ingeniería de tejidos óseos, tejidos de fibra actuando como refuerzo de los componentes en sistemas compuestos y plantillas de fibras para la preparación de nanoestructuras funcionales como los nanotubos y nanoalambres, entre otras (77), (90).

Actualmente es posible producir fibras con un bajo costo, de alto valor y alta resistencia a partir de materiales biodegradables y renovables que permitan disminuir las preocupaciones de daños al medio ambiente <sup>(77)</sup>. Una membrana porosa estructurada con nanofibras por electrohilado, la cual es usada como vendaje para heridas, se caracteriza porque puede promover la exudación de fluidos de la herida, con la finalidad de prevenir cualquier acumulación debajo de la venda o desecación de la herida. La membrana de nanofibras por electrohilado muestra una controlada evaporación de líquidos, excelente permeabilidad al oxígeno y promueve la capacidad de desagüe de líquidos, mientras que inhibe la invasión de microorganismos exógenos debido a sus poros ultrafinos <sup>(77)</sup>.

### 2.10.1 Efecto del tamaño de fibra en el área de superficie

Una de las características más significativas de las nanofibras es la enorme disponibilidad de área superficial por unidad de masa. Para fibras que tienen diámetros de 5 a 500 nm, como se muestra en la figura 2.11 el área de superficie por unidad de masa es alrededor de 10,000 a 1, 000,000 m²/kg. En nanofibras que tienen 3 nm de diámetro, y las cuales contienen 40 moléculas, aproximadamente la mitad de sus moléculas se encuentran en la superficie (75).

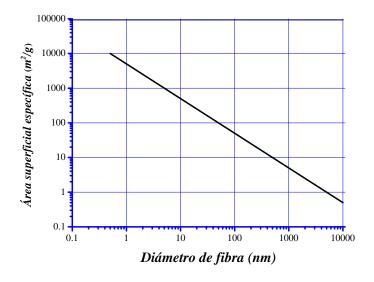


Figura 2.11.- Efecto del diámetro de la fibra en el área de superficie.





Como se puede observar en la figura 2.11, la enorme área superficial de las nanofibras proporciona una notable capacidad para la inserción o liberación de grupos funcionales, moléculas absorbidas, iones, restos de catalizador, y las partículas a escala nanométrica de muchos tipos <sup>(75)</sup>.

### 2.10.2 Morfología de las nanofibras por electrohilado y sus aplicaciones

El electrohilado es capaz de producir diferentes tipos de nanofibras con la morfología de interés deseada mediante la variación de parámetros. En la tabla 2.5 se presentan diferentes morfologías de nanofibras y algunas de sus aplicaciones.

*Tabla 2.5.-* Diferentes morfologías de nanofibras obtenidas mediante electrohilado.

Morfología	Parámetros y condiciones de electrohilado que afectan la morfología	Aplicaciones	Esquema	Referencia
Porosas	Humedad, tipo de polímero, presión de vapor del solvente usado, y condiciones de electrohilado.	Liberación controlada de fármacos, sistemas de filtración e ingeniería de tejidos.	500 nm	(91)
Cintas o aplanadas	Evaporación del solvente durante el proceso de electrohilado.	Biosensor, materiales médicos, dispositivos optoelectrónicos.		(92)
Ramificadas	Formación de un chorro inestable debido a un cambio en el equilibrio entre las fuerzas eléctricas y la tensión superficial.	Dispositivos optoeléctronicos.	1	(93)
Helicoidales	Propiedad electroquímica del polímero y un equilibrio entre la fuerza de repulsión electrostática y la fuerza de restauración viscoelástica en el chorro del polímero.	Nanotubos de carbón, cerámicos, metales y polímeros con aplicación industrial en separación, almacenamiento de gases y conversión de energía.	20 µm	(94)
Huecas	El proceso de electrohilado convencional, método de deposición química de vapor (CVD) y el método de electrohilado coaxial directo,	Electroquímica, baterías de litio, dispositivos fluídicos, guías de onda óptica, sensores de gas.	—500 nm	(95)





## 2.11 Obtención de nanocompositos de polímeros-plata por medio de electrohilado y sus propiedades antimicrobianas

El proceso de electrohilado proporciona flexibilidad operacional para la incorporación de otras especies en las fibras, por lo que se han realizado diversos estudios en los que se han incorporado nanopartículas de plata en varias fibras de polímero mediante el proceso de electrohilado, y los resultados obtenidos evidenciaron que estas fibras compuestas presentaban una actividad antibacteriana (96), (97).

Dan y colaboradores (98) prepararon nanofibras de sílice con nanopartículas de plata usando el método químico de sol-gel y la técnica de electrohilado, para evaluar sus propiedades antibacterianas y desodorantes. La actividad antibacteriana de las nanofibras se indujo mediante la adición de nitrato de plata dentro de la solución del electrohilado. Los iones de plata se redujeron a nanopartículas metálicas de plata mediante tratamiento térmico y/o irradiación UV, y las nanopartículas de plata se ubicaron sobre la superficie de la nanofibra que tenía un diámetro de 73 nm. Aunque las nanopartículas de plata se ubicaron sobre la superficie, la mayoría de la plata se mantuvo en las nanofibras de sílice cuando las nanofibras se sumergieron en el agua, lo que indicó que el efecto antibacteriano de la plata continuaría por un tiempo prolongado. Las propiedades antibacterianas de las nanofibras se evaluaron con las bacterias Staphylococcus aureus (ATCC 6538) y Klebsiella pneumoniae (ATCC 4352). Al comparar las nanofibras de sílice puras, estas no presentaron actividad antibacteriana, mientras que las nanofibras de sílice con 0.5% de AgNO3 mostraron un aumento en la actividad antibacteriana, con una reducción de bacterias mayor al 99.9%. Las actividades desodorantes de las nanofibras se examinaron con el uso de NH<sub>3</sub> como gas de prueba. Al igual que en el caso de la actividad antibacteriana, las nanofibras de sílice/ Ag mostraron excelente actividad desodorante.

Con este estudio se demostraron las excelentes propiedades antibacterianas y desodorantes de las nanofibras de sílice con nanopartículas de plata, así como también se comprobó que la permeabilidad del aire de las redes de nanofibras es menor que las de los filtros comerciales HEPA (filtros de aire de alta eficiencia), y logró ser controlado mediante la modificación de las condiciones de procesamiento del electrohilado. Estos resultados proporcionaron la posibilidad de usar las nanofibras en aplicaciones de filtrado que requieren propiedades antibacterianas, así como de estabilidad química y térmica.



Won y colaboradores (99) encontraron por primera vez que las nanofibras de polímero con nanopartículas de Ag sobre su superficie, podían ser producidas por irradiación UV de las nanofibras de polímero electrohiladas con pequeñas cantidades de nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub>). A través de este estudio, observaron que cuando las nanofibras de acetato de celulosa (CA) electrohiladas a partir de las soluciones de CA con 0,5% en peso de AgNO<sub>3</sub> fueron irradiadas con luz ultravioleta a 245 nm, las nanopartículas de Ag se generaron principalmente en la superficie de las nanofibras de CA. El número y el tamaño de las nanopartículas de Ag se incrementaron continuamente hasta 240 min. Se obtuvieron nanopartículas de Ag con un tamaño de partícula promedio de 21 nm, las cuales mostraron una actividad antimicrobiana fuerte. La actividad antimicrobiana de las nanofibras de CA que contenían las nanopartículas de Ag se pusieron a prueba frente a las bacterias S. aureus Gram-positivas y E. coli Gram-negativas, K. pneumoniae y P. aeruginosa. Las bacterias Gram-negativas son responsables de más del 80% de todas las infecciones. Cuando estas bacterias se incubaron en las nanofibras de CA, no se observo la formación de colonias bacterianas. Además el número de bacterias se redujo en un 99,9% después de 18 h de incubación, lo que indicó que las nanopartículas de Ag con un tamaño promedio de 21 nm inhibieron con éxito el crecimiento de estas bacterias (99).

Wul y colaboradores <sup>(100)</sup> elaboraron una novedosa membrana nanofibrosa antibacterial mediante la técnica de electrohilado. Esta membrana contenía cuatro componentes activos: apatita, Ag, AgBr y TiO<sub>2</sub>, en donde cada componente cumplía una función diferente: la hidroxiapatita actuaba como el material de adsorción para capturar la bacteria, las nanopartículas de Ag actuaron como el agente antibacteriano de liberación activa, las nanopartículas de AgBr actuaron como agentes antibacterianos de liberación activa visibles y sensibles, y el TiO<sub>2</sub> actuó como el material antibacterial sensible a la radiación UV y sustrato para otros compuestos funcionales. El diámetro promedio de las fibras obtenidas fue alrededor de 300 nm.

La actividad antibacteriana de las nanofibras con diferentes composiciones fue determinada principalmente aplicando la evaluación cualitativa con un método de Kirby-Bauer modificado y la evaluación cuantitativa utilizando la norma oficial AATCC 100 – 2004. En estas evaluaciones se utilizaron como organismos de prueba las cepas de *E. coli y S. aureus* para investigar cualitativamente la propiedad de la membrana. A través de estos estudios, se demostró que las membranas nanofibrosas multicomponentes presentaron una excelente actividad antimicrobiana a





la luz ultravioleta, luz visible y en un ambiente oscuro, la cual atribuyeron a la acción sinérgica de los cuatro componentes funcionales, así como a la estructura porosa y la gran área superficial de las membranas.

Consideraron también que la combinación de las excelentes propiedades antibacterianas derivadas de los multicomponentes y las características estructurales únicas de la membrana de electrohilado son una forma más eficiente para la fabricación de materiales antibacterianos, así como también una gran promesa para su aplicación en respiradores, filtros de aire acondicionado y recubrimientos antibacterianos, entre otros.



### <u>Hipótesis</u>

El extracto acuoso de nopal (Opuntia sp.) puede emplearse como agente reductor para llevar a cabo la preparación de nanopartículas de plata, y su posterior incorporación en una matriz polimérica para formar nanofibras mediante electrohilado, generando así membranas nanofibrosas con propiedades antimicrobianas.

### **OBJETIVOS**

### Objetivo General

Utilizar extractos de cladodios de nopal como agente reductor en la obtención de nanopartículas de plata, utilizando poli (vinil alcohol) como agente estabilizador de las nanopartículas y electrohilado de esta solución para la obtención de membranas de nanofibras que puedan evaluarse sobre microorganismos de importancia clínica. Así como la adición de quitosán, que contribuya a la propiedad antimicrobiana de las membranas.

### Objetivos Específicos

- 1.- Obtener extractos de cladodios de nopal (Opuntia sp.) para evaluar su capacidad como agente reductor en la síntesis de nanoestructuras metálicas.
- 2.- Sintetizar nanopartículas de plata mediante reducción química con extracto de nopal como agente reductor y un polímero hidrosoluble [poli (vinil alcohol)] como agente estabilizador, evaluando en la síntesis el efecto de la concentración del extracto de nopal, concentración del compuesto metálico, tiempo de reacción, tipo y concentración del polímero, sobre el tamaño y morfología de las nanoestructuras de plata obtenidas.
- 3.- Caracterización de las nanopartículas de plata mediante la técnica de difracción de rayos X, microscopia electrónica de transmisión (TEM) y espectroscopia de absorción atómica.





- 4.- Establecer las condiciones y parámetros óptimos de operación en el proceso de electrohilado, para la obtención de nanofibras a partir de las soluciones a base de polímero hidrosoluble/nanopartículas de plata.
- 5.- Caracterización de las membranas fibrosas obtenidas por electrohilado mediante las técnicas de microscopia electrónica de transmisión (TEM), microscopia electrónica de barrido (SEM) y espectroscopia infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR).
- 6.- Incorporación de quitosán dentro de las membranas que contribuya en la actividad antimicrobiana de las membranas poliméricas.
- 7.- Evaluar las propiedades antimicrobianas de membranas de nanofibras polímero hidrosoluble/nanopartículas de plata mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida (CMB), utilizando microorganismos de importancia clínica.

### **J**USTIFICACIÓN

La generación de nuevas tecnologías y los avances en la ciencia, han fomentado la necesidad de investigar nuevos métodos para la obtención de materiales a nivel nanométrico que puedan aplicarse en las diferentes áreas de la ciencia y tecnología, y que permitan de cierto modo contribuir a la solución de problemas que se enfrentan en la vida cotidiana.

La situación actual, exige la búsqueda de metodologías que no sean tóxicas y no perjudiquen el medio ambiente, además de que no requieran excesivos gastos en infraestructura y que de alguna u otra forma sean factibles.

Actualmente la demanda de productos y materiales en el área biomédica está incrementando, y con ello la necesidad de crear productos de mejor calidad, y con mejores propiedades, que reduzcan el costo de fabricación y que contribuyan a la innovación. Una alternativa a esto ha sido la aplicación de nanopartículas de plata, las cuales se caracterizan por sus excelentes propiedades antibacterianas y fungicidas.





Es por ello que en este proyecto se realizó un estudio de la fabricación de nanopartículas de plata mediante una síntesis verde, en la cual se empleó como agente reductor el extracto del nopal, del cual hasta el momento los estudios son muy escasos e incompletos. Esta parte se complementa con la incorporación de las nanopartículas en nanofibras por el proceso de electrohilado, un proceso de bajo costo y continuo, llevando a cabo la formación de una membrana nanofibrosa que permitió evaluar sus propiedades antibacterianas.

## CONTRIBUCIÓN CIENTÍFICA

La contribución científica de este trabajo de tesis es llevar a cabo la síntesis de nanopartículas de plata mediante el empleo de un agente reductor de origen natural generado del extracto del cladodio de nopal, para proponer un proceso alternativo y ambientalmente amigable. Asimismo la aplicación de las nanopartículas de plata obtenidas en matrices poliméricas para la preparación de nanofibras mediante el proceso de electrohilado permitirá contribuir al desarrollo de nuevos materiales con propiedades antimicrobianas para su aplicación en el control de microorganismos en el área médica, filtración y de medio ambiente.



### 3.- Parte experimental

### 3.1 Actividades desarrolladas en este proyecto

Este trabajo experimental se inició con la preparación de los extractos acuosos de los cladodios de nopal (*Opuntia sp.*), los cuales fueron filtrados y liofilizados. El extracto de nopal en polvo se caracterizó para determinar el contenido de sólidos insolubles, azúcares totales, fenoles y proteínas.

La síntesis de nanopartículas de plata se llevó a cabo empleando el extracto de nopal como agente reductor y el dodecil sulfato de sodio (SDS) como agente estabilizante. Las nanopartículas de plata que se obtuvieron de la reacción fueron centrifugadas, dializadas y liofilizadas para posteriormente caracterizarlas mediante las técnicas de difracción de rayos X, microscopia electrónica de transmisión (TEM) y espectroscopia de absorción atómica.

El extracto de nopal en polvo se fraccionó mediante el proceso de ultrafiltración utilizando membranas de fibra hueca con diferente tamaño de poro. Cada una de las fracciones obtenidas durante la ultrafiltración fue evaluada para determinar la fracción responsable de la formación de nanopartículas de plata. La fracción que originó la reducción de los iones de Ag<sup>+</sup> a Ag<sup>0</sup>, se caracterizó para determinar su contenido de sólidos insolubles, azúcares totales, fenoles y proteínas.

Las nanopartículas de plata obtenidas con el uso del extracto de nopal como agente reductor y el SDS como agente estabilizante se incorporaron en una matriz polimérica de poli (vinil alcohol) (PVA) mediante la técnica de electrohilado. Para el proceso de electrohilado se emplearon tres métodos de preparación de la solución polimérica. En el primer método se preparó una mezcla de las nanopartículas de plata con la solución de PVA, el segundo método fue mediante la solución de la reacción "in situ" de las nanopartículas de plata usando el extracto de nopal como agente reductor y el PVA como agente estabilizante, y en el tercer método se utilizó la mezcla de la solución de la reacción "in situ" de nanopartículas de plata con PVA y un porcentaje de quitosán de bajo peso molecular que contribuyera al efecto antimicrobiano de las membranas.





Las membranas poliméricas fueron entrecruzadas y caracterizadas mediante microscopia electrónica de transmisión (TEM) y microscopia electrónica de barrido (SEM).

La actividad antimicrobiana de las membranas nanofibrosas con nanopartículas de plata incorporadas se evaluó usando las cepas de *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomona aureoginosa, Aspergillus niger y Candida albicans*.

A continuación se describen a detalle cada una de estas actividades realizadas.



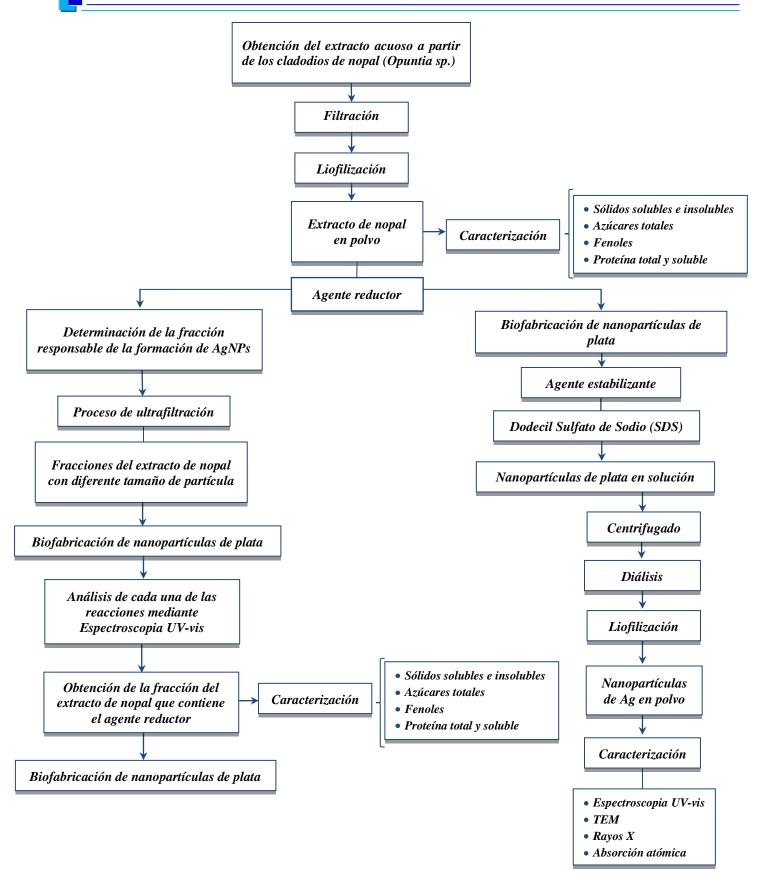


Figura 3.1. Esquema de las actividades desarrolladas en este proyecto.



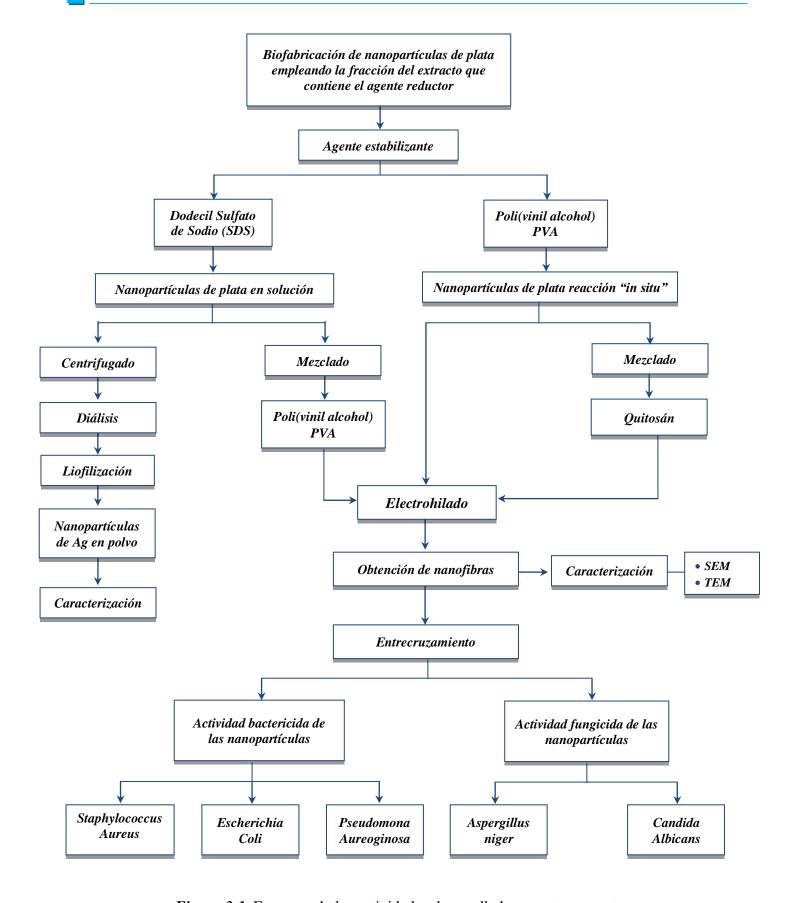


Figura 3.1. Esquema de las actividades desarrolladas en este proyecto.





### 3.2 Obtención de extractos acuosos a partir de los cladodios de nopal (Opuntia sp.)

Para la preparación de los extractos acuosos se emplearon cladodios de nopal frescos adquiridos en un supermercado de la localidad. Los cladodios fueron cortados en trozos pequeños para incrementar con ello la superficie de contacto y que esto permitiera acelerar el proceso de extracción. Para llevar a cabo el proceso de obtención del extracto, se pesaron alrededor de 143 g de material vegetal en una balanza analítica; marca Mettler Toledo, modelo AG204, y se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 500 mL.

En otro matraz de la misma capacidad se adicionó un volumen de 350 mL de agua destilada y se sometió a calentamiento hasta una temperatura aproximada de 95°C. A continuación se agregaron los trozos de nopal. El material vegetal inmerso en el agua se mantuvo en agitación y calentamiento constante durante 20 minutos (Figura 3.2).



Figura 3.2.- Cladodios de nopal en trozos y dispersos en agua destilada.

Transcurrido el tiempo de calentamiento, se retiró el matraz con el material vegetal y se dejó enfriar en un baño de agua a temperatura ambiente. Para la recuperación del extracto, se preparó un sistema de filtración formado por un embudo que contenía en su interior una gasa esterilizada, y a la salida de éste se encontraba un matraz Erlenmeyer de 500 mL donde fue recolectado el extracto acuoso de nopal después de filtrarlo. Al momento de filtrar el extracto, quedaron los residuos de nopal extraídos, estos se exprimieron manualmente para aprovechar la mayor cantidad de extracto posible. La apariencia del extracto acuoso después de filtrarlo fue parcialmente turbia



y presentaba una coloración entre amarilla- verdosa muy tenue. Siguiendo esta metodología se procesaron 3 Kg de nopal.

### 3.2.1 Liofilización de los extractos acuosos de nopal

Después de haber filtrado el extracto, se procedió a su liofilización (Freeze Dry System/ Freezone 4.5 marca LABCONCO) (Figura 3.3), previa congelación del material en frascos de 600 mL.

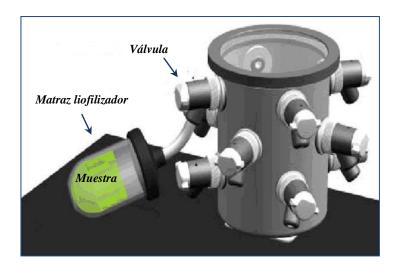


Figura 3.3.- Equipo de Liofilización para secado del extracto.

Una vez concluido el secado del material, el extracto seco situado en las paredes del matraz se retiró y pulverizó con una espátula de acero inoxidable, y enseguida se vació en un recipiente totalmente limpio y seco. El recipiente fue sellado con parafilm y almacenado en refrigeración a una temperatura de 4°C para evitar la descomposición del extracto. Este stock de material se utilizó para llevar a cabo la caracterización del mismo, posterior procesamiento, purificación y lo más importante, su utilización como agente reductor en la obtención de las nanopartículas de plata.

# 3.3 Síntesis de nanopartículas de plata empleando el extracto de nopal como agente reductor y SDS como agente estabilizante.

La síntesis de nanopartículas de plata se realizó tomando como base los parámetros de reacción reportados en estudios recientes (101). La reacción se llevó acabo en un reactor de vidrio de tres bocas con chaqueta de calentamiento situado sobre una parrilla de agitación y conectado a un baño termostático abierto (JULABO); con el que fue posible controlar la temperatura de reacción (Figura 3.4). En una de las bocas se colocó un termómetro para verificar la temperatura en el



interior del reactor, y en el interior se introdujo un agitador magnético que permitió el mezclado uniforme de los reactivos durante su adición.

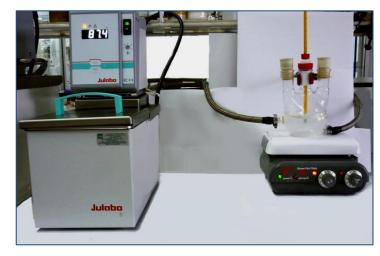


Figura 3.4.- Sistema de reacción para la síntesis de nanopartículas de plata.

Durante la preparación de los reactivos para la síntesis de nanopartículas se pesaron 0.21 g de SDS (dodecil sulfato de sodio) en un vial, y se disolvieron con 10 mL de agua ultrapura, esta solución se adicionó al reactor. Después se añadió un volumen de 50 mL de agua ultrapura y se tomó una fracción de éste volumen para enjuagar el recipiente que contenía la solución de SDS.

Se agregaron al reactor 4 mL de hidróxido de amonio (NH<sub>4</sub>OH) bajo agitación constante y se procedió a encender el baño termostático para elevar la temperatura del reactor a 80°C. Paralelamente, en un matraz volumétrico de 10 mL se preparó una solución de nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub>) a una concentración 10 mM, éste matraz se cubrió de la luz con papel aluminio para evitar la posible descomposición del material.

Por otra parte, el extracto de nopal mantenido en refrigeración se liofilizó durante 18 horas, con la finalidad de eliminar la humedad que pudiera haber absorbido durante su almacenamiento. A continuación se preparó una suspensión con 0.13 g del extracto de nopal en 8 mL de agua ultrapura y se mantuvo en agitación hasta que el extracto se dispersara por completo. La síntesis de nanopartículas de plata se inició con la adición de la solución de AgNO<sub>3</sub> cuando el reactor se encontraba a la temperatura de 80°C, y se dejó agitar por 5 min para permitir su disolución. Posteriormente se adicionó la dispersión de extracto de nopal. El volumen final de la reacción se completo a 80 mL.





El curso de la reacción para determinar la formación de nanopartículas de plata se dio mediante seguimiento en el cambio de absorción a 420 nm, utilizando un espectrofotómetro UV-visible (Shimadzu UV-2401 PC). Como referencia o blanco control se preparó una mezcla con todos los reactivos añadidos a excepción del AgNO<sub>3</sub> (Tabla 3.1). Una vez añadido el extracto de nopal, se retiró una alícuota (4 mL) de la mezcla de reacción y se determinó su absorbancia, ésta lectura se consideró como la muestra T<sub>0</sub>. Todas las mediciones de absorbancia se realizaron usando celdas de cuarzo. A partir de la determinación T<sub>0</sub> se realizaron mediciones de absorbancia cada 30 minutos hasta completar un tiempo de reacción de 5 horas.

*Tabla 3.1.-* Composición de cada uno de los reactivos empleados en la síntesis de nanopartículas de plata empleando SDS como agente estabilizante.

Reactivo	Reacción	Blanco control
$AgNO_3$	8 mL	0
NH₄OH	4 mL	0.5 mL
Agua Ultrapura	60 mL	7.5 mL
Dodecil Sulfato de Sodio	0.208 g	0.026 g
Extracto de nopal	0.2 g/ 8 mL	0.008 g/ 2 mL
Volumen de reacción	80 mL	10 mL

Una vez concluido el tiempo de reacción, se apagó el baño termostático y se dejó enfriar el reactor a temperatura ambiente, para después vaciar el contenido del reactor en un frasco color ámbar.

El producto obtenido de la reacción se recuperó mediante centrifugación (centrífuga Beckman Coulter Modelo Allegra 25 R). Para ello el volumen de la reacción se distribuyó en tubos para centrífuga de 50 mL, y se centrifugó a 14 000 rpm por 25 minutos y 25°C. Al finalizar el proceso de centrifugación, el material recuperado que contenía las nanopartículas de plata se resuspendió en 9 mL del líquido sobrenadante y se almacenó en un vial color ámbar para su posterior caracterización.





## 3.4 Determinación de la fracción del extracto de nopal que actúa como agente reductor en la formación de nanopartículas de plata

Después de llevar a cabo la síntesis de nanopartículas de plata empleando el extracto de nopal como agente reductor, se decidió efectuar el análisis del extracto con la finalidad de identificar la fracción del extracto que actuaba realmente como reductor en la formación de nanopartículas, y en base a ella desarrollar las pruebas siguientes. Para ello se fraccionó una determinada cantidad de extracto en diferentes tamaños de partícula o peso molecular mediante un proceso de ultrafiltración.

### 3.4.1 Proceso de Ultrafiltración

La ultrafiltración es un método utilizado para separar partículas extremadamente pequeñas o macromoléculas de diferente tamaño. Este proceso se logra a través del uso de una membrana de fibra hueca con diferente tamaño de poro. El tamaño promedio de poro de las membranas de fibra hueca utilizadas se situó entre 10-1000 A<sup>0</sup>, y se pueden expresar como tamaños nominales o absolutos. Un tamaño de poro nominal describe la capacidad del material de filtración para retener la mayoría de las partículas (60-98%) del tamaño indicado o mayor. Un tamaño de poro absoluto especifica el tamaño de poro al que una partícula o molécula de un tamaño particular será retenida con una eficacia del 100% bajo condiciones de ensayo estrictamente definidas como: la presión de prueba, la concentración y el método de detección utilizado para identificar el producto a separar (102), (103)

Para llevar acabo el proceso de ultrafiltración se empleó un equipo de Ultrafiltración Millipore Xerox, en el cual una muestra de 5 g de extracto de nopal se separó en fracciones de diferente tamaño mediante el uso de membranas de fibras huecas (MidGee<sup>TM</sup> and MidGee Hoop<sup>TM</sup>), las cuales comprendieron tamaños desde 0.2 μm hasta 3,000 NMWC (*nominal molecular weight cut off*), como se muestran en la siguiente tabla:



Tabla 3.2 - Tipos	de columnas d	de fibra bueca	empleadas en el	proceso de ultrafiltración.
1 uviu 3.2 1 1003	uc comminas	uc mora mucca	i cilipicadas cii ci	proceso de ditrafficiación.

No. Columna	Modelo Columna	Tamaño de poro
10	CFP-2-C-MM01A	0.2 micrón
2°	CFP-1-C-MM01A	0.1 micrón
3°	UFP-500-E-MM01A	500,000 NMWC
4°	UFP-300-E-MM01A	300,000 NMWC
5°	UFP-100-C-MM01A	100,000 NMWC
6°	UFP-50 -E -MM01A	50,000 NMWC
7°	UFP-30 -C -MM01A	30,000 NMWC
8°	UFP-10 -E -MM01A	10,000 NMWC
9º	UFP-3 - C -MM01A	3,000 NMWC

Para llevar a cabo el tratamiento de ultrafiltración se pesaron 5 g de extracto y se disolvieron en 100 mL de agua ultrapura, manteniéndose en agitación mecánica por 1 hora. Posteriormente se centrifugó para separar los sólidos insolubles y el sobrenadante fue añadido en un recipiente acondicionado al equipo de ultrafiltración tal como se muestra en la figura 3.5.



Figura 3.5.- Sistema de ultrafiltración empleado para fraccionar el extracto de nopal.

El proceso de filtrado se inició bombeando la muestra hacia la membrana, y controlando los flujos de permeado y retenido con la válvula a la salida. Después de que la mayor parte de la muestra había sido filtrada, se efectuaron dos lavados, utilizando un volumen de 20 mL de agua ultrapura.





El retenido obtenido se vertió en un matraz liofilizador para proceder a su proceso de secado, y el permeado se sometió al siguiente proceso de ultrafiltración empleando la siguiente membrana con un menor tamaño de poro.

Los volúmenes retenidos de cada membrana, así como el permeado obtenido en la última etapa, se secaron a través del proceso de liofilización y se almacenaron en viales completamente limpios para posteriormente utilizarlos en la caracterización y reacciones subsecuentes.

## 3.5 Síntesis de nanopartículas de plata con cada una de las fracciones del extracto de nopal obtenidas en el proceso de ultrafiltración

Considerando los porcentajes de las fracciones de tamaño contenidas en el extracto de nopal, se determinaron las cantidades de extracto requeridas para cada una de las reacciones de síntesis de las nanopartículas de plata.

La actividad catalítica de cada una de las fracciones de extracto de nopal para promover la síntesis de nanopartículas de plata se determinó utilizando viales con capacidad de 20 mL y utilizando un volumen de reacción de 10 mL. Para ello, los viales se colocaron en una gradilla y estos a su vez se sumergieron en un baño termostático controlado a 80°C, temperatura a la cual se llevó a cabo la reacción. Después de 5 horas de reacción, los viales fueron retirados del baño termostático y se cubrieron con papel aluminio para evitar que el producto obtenido estuviera en contacto con la luz.

Para determinar con cual de las fracciones se generaron nanopartículas de plata, se evaluó la absorbancia de cada una de estas reacciones en el espectrofotómetro UV-Vis. Al determinar la fracción del extracto que actuaba como agente reductor, se escalo a la producción de una mayor cantidad de nanopartículas de plata empleando únicamente esta fracción como agente reductor para posteriormente caracterizar las nanopartículas obtenidas y compararlas con las generadas al emplear el extracto completo, es decir, sin filtrar.

### 3.6 Caracterización del extracto de nopal

Después de haber obtenido el extracto de nopal seco y pulverizado, y haber determinado la fracción del extracto que originaba la formación de nanopartículas de plata, se procedió a la



caracterización de ambos para analizar su composición y determinar cuales de sus componentes se encontraban involucrados en la reducción de la sal de nitrato de plata.

Su contenido se caracterizó mediante análisis de sólidos solubles e insolubles, contenido de azúcares totales por el método de Antrona, determinación de fenoles, proteína total por método Microkjedahl y proteína soluble por Biorad [ANEXOS].

### 3.7 Caracterización de las nanopartículas de plata

Las nanopartículas obtenidas de la reacción de síntesis empleando como agente reductor el extracto de nopal sin fraccionar y con la fracción que contenía este agente, fueron preparadas para su caracterización mediante difracción de rayos X, microscopia electrónica de barrido (TEM) y espectroscopia de absorción atómica.

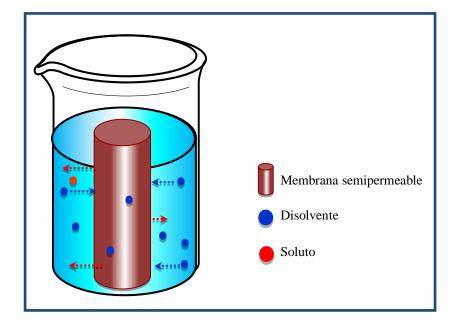
### 3.7.1 Preparación de las nanopartículas de plata para su caracterización y evaluación

La primera etapa para la preparación de las nanopartículas de plata consistió en neutralizar la solución con las nanopartículas disueltas mediante la eliminación del hidróxido de amonio, para lo cual fue necesario realizar un proceso de diálisis.

#### 3.7.1.1 Proceso de Diálisis

El proceso de diálisis se define como el transporte de una sustancia disuelta a través de una membrana semipermeable suscitado por un gradiente de concentración y sin involucrar un gasto de energía. La membrana es atravesada por el disolvente y las partículas pequeñas de bajo peso molecular, en donde el soluto se difunde desde la zona de mayor concentración a la de menor concentración, mientras que el solvente lo hace desde el sitio donde está en mayor cantidad hacia la de menor cantidad (Figura 3.6) (104), (105).





*Figura 3.6.-* Sistema de diálisis el cual implica la difusión de las partículas de soluto a través de la membrana semipermeable.

Para realizar el proceso de diálisis se utilizaron tubos de diálisis de acetato de celulosa con un corte de peso molecular de 12,000 (NMWC), 25 mm de diámetro y longitud de 15 cm, estimada en base a la cantidad de muestra que se añadiría a cada uno de éstos. Los tubos se prepararon hirviéndolos en un volumen de 2% (w/v) de bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>) y 1mM EDTA, a pH= 8 por 10 minutos.

Posteriormente se enfriaron y enjuagaron con agua destilada, procurando tomar los tubos con unas pinzas. Se sumergieron en una solución 1 mM EDTA (pH=8) en la cual fueron hervidos nuevamente durante otros 10 minutos. Finalmente se dejaron enfriar y se almacenaron a una temperatura de 4°C hasta su uso.

Para dar inicio al proceso de diálisis, se retiraron los tubos de la solución de EDTA y se lavaron con agua destilada. La dispersión de nanopartículas de plata se distribuyó en cada uno de los tubos amarrando previamente uno de los extremos con un hilo, procurando humedecerlo constantemente con agua desionizada. Después de haber depositado la muestra, se amarró el otro extremo del tubo sellándolo perfectamente para evitar cualquier derrame de la misma.

Por otro lado se prepararon 4 litros de una solución de SDS a la misma concentración a la cual se llevó a cabo la reacción de nanopartículas de plata (2.6 g/L).





Los tubos se colocaron en un vaso de precipitado sujetándolos a la parte superior e inferior de la pared del mismo. Enseguida se añadió 1 L de la solución de SDS, de manera que los tubos quedaron sumergidos en ella, dejando la solución con agitación constante para agilizar el transporte del hidróxido de amonio desde la solución de nanopartículas de plata contenida en la membrana hacia la solución de SDS. Después de 4 horas se retiró la solución de SDS y se volvió a realizar otro lavado con 1a misma solución, repitiendo este procedimiento hasta que el pH de la solución fuera neutro, es decir, hasta eliminar completamente el hidróxido de amonio. Las nanopartículas en solución dializadas, se vaciaron en un frasco color ámbar y se conservaron a temperatura ambiente.

### 3.7.1.2 Purificación de las nanopartículas de plata

La segunda etapa para la preparación de las nanopartículas de plata consistió en la eliminación del contenido de iones en exceso, remanentes de la reacción y el agente estabilizante que impedía la formación de aglomerados. Esta etapa se realizó únicamente para las muestras que serían caracterizadas por rayos X y TEM.

Antes de tomar la muestra de nanopartículas que sería purificada, se agitó previamente la solución en la cual se encontraban inmersas las nanopartículas con la finalidad de homogeneizar su contenido y que la muestra fuera representativa. Se tomaron alícuotas de 1 mL de la solución y se depositaron en tubos eppendorf de 1.5 mL de capacidad, los cuales se colocaron en una microcentrífuga (Eppendorf, modelo 5415 C), operándose a 14,000 rpm durante 15 minutos. Al término de la operación se retiró el sobrenadante de cada tubo, y el precipitado con las nanopartículas se lavó con agua ultrapura; realizando por lo menos 3 lavados para eliminar cualquier residuo de la reacción.

Finalmente se eliminó el contenido de agua a través del proceso de liofilización y se obtuvieron nanopartículas de plata en polvo, las cuales se caracterizaron por los métodos que a continuación se describen.

#### 3.7.2 Métodos de caracterización para las nanopartículas de plata

### 3.7.2.1 Difracción de Rayos X

La Difracción de Rayos-X es una técnica que permite determinar la disposición atómica y molecular mediante la interacción de la radiación electromagnética con estructuras comparables en



magnitud a la longitud de la radiación. Los rayos X son una forma de radiación electromagnética que posee una elevada energía y corta longitud de onda: del orden de los espacios interatómicos de los sólidos <sup>(106)</sup>.

Con la finalidad de confirmar que las nanopartículas formadas procedían de la plata, se decidió caracterizar la muestra de nanopartículas mediante la técnica de rayos X, con la cual se analizaron cada uno de los planos de difracción obtenidos de la muestra y se compararon con los planos pertenecientes a la plata provenientes de la base de datos del equipo.

Para la caracterización por difracción de rayos X, se pesaron aproximadamente 5 mg de la muestra de nanopartículas de plata en polvo en un tubo eppendorf y se resuspendieron en 0.5 mL de agua ultrapura, redispersándolas en un equipo de ultrasonido (Branson 200). Se tomaron 0.10 mL de la muestra con una micropipeta y se colocaron en la parte central de un portamuestra de vidrio, continuando con el secado de la misma en una estufa de vacío (Lab-line Instruments) a 80°C durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo de secado, se retiró el portamuestras de la estufa y se tomó nuevamente un volumen de las nanopartículas resuspendidas en agua y se colocó encima de la muestra seca. Este procedimiento se repitió 3 veces hasta formar una capa concentrada de nanopartículas en la parte central del vidrio con la intención de que al realizar la medición se obtuvieran patrones de difracción bien definidos y sin demasiado ruido e interferencias.

El difractómetro utilizado para la caracterización de la muestra fue un modelo D-500 marca SIEMENS. Las condiciones establecidas fueron de 35 kV y 25 mA, un tamaño de paso de 0.06 ° y un tiempo en paso de 3 seg. Por lo tanto se utilizó un velocidad angular de barrido de 1.2 °/min. El inicio y final de la lectura fue de 10 hasta 80°.

### 3.7.2.2 Microscopia electrónica de transmisión (TEM).

En un microscopio electrónico de transmisión (TEM), los electrones de una fuente, como la de un cañón de electrones, entran en una muestra delgada, se dispersan al pasar a través de ella y se enfocan con un lente de objetivo, se amplifican mediante un lente amplificador (proyector) y finalmente producen la micrografía deseada (107), (108), la cual aparece en forma de zonas claras y oscuras de acuerdo con el número de electrones absorbidos por las diversas áreas de la muestra. El





microscopio electrónico de transmisión tiene una alta resolución y es extremadamente útil para examinar distintas capas en una muestra <sup>(109)</sup>.

Las nanopartículas de plata obtenidas se caracterizaron mediante esta técnica para determinar su morfología y tamaño, así como detectar la presencia de aglomerados y defectos en ellas.

La muestra que se requiere para la caracterización mediante microscopía electrónica de transmisión, debe ser mínima y con una concentración muy diluida, en este caso se pesaron 0.5 mg de la muestra de nanopartículas de plata en polvo en un tubo eppendorf y se resuspendieron en 1 mL de agua ultrapura a través de ultrasonido. Para determinar si la cantidad de nanopartículas de plata para el análisis era la adecuada, se verificó que la muestra presentara una apariencia traslúcida y una coloración amarilla muy tenue, de lo contrario volvía a diluirse con agua ultrapura hasta que obtuviera esta apariencia.

La muestra se depositó en una rejilla de cobre-Lacey Carbon, sumergiéndola y retirándola inmediatamente de la solución de nanopartículas de plata. Finalmente se dejó secar a temperatura ambiente y se colocó en el microscopio (FEI, modelo TITAN 80-300kV), operado a 300 kV. Las imágenes se colectaron con una cámara CCD (Gatan de 1024 x 1024 pixeles) de resolución digital.

### 3.8 Determinación del contenido de plata en la solución de reacción de nanopartículas de plata

Para determinar el contenido de plata que se encontraba presente en la muestra de nanopartículas en solución se realizó un análisis por Espectroscopia de Absorción Atómica.

### 3.8.1 Espectroscopia de Absorción Atómica

La espectroscopia de absorción atómica es un método para la detección y la determinación de elementos químicos, particularmente de elementos metálicos, donde los compuestos se rompen en los átomos que los constituyen mediante pulverización en una llama a alta temperatura (110).

Antes de iniciar el análisis se llevó acabo un proceso de preparación de la muestra que consistió en lo siguiente. Primeramente se tomó 1 mL de la solución de la reacción previamente dispersa y se colocó en un vaso de precipitado de 100 mL, en el cual fue diluida con 5 mL de agua ultrapura. Posteriormente el vaso con la muestra fue colocado sobre una parrilla de calentamiento para realizar la digestión con 5 mL de ácido nítrico durante un tiempo de 4 horas. El método de





digestión se emplea normalmente para reducir interferencias debido a la presencia de materia orgánica, y convertir los metales a una forma en que puedan analizarse: generalmente metal puro. La digestión con ácido nítrico es adecuada para la extracción de diversos metales, además de que los nitratos proporcionan una buena matriz para las determinaciones mediante espectrofotometría de absorción atómica.

Después de haber realizado la digestión, la muestra se paso a través de un papel filtro no. 41, y se recolectó en un matraz volumétrico de 50 mL. Al terminar de añadir la muestra se enjuagó el papel filtro con agua ultrapura para eliminar cualquier residuo de metal que hubiera quedado adherido en las paredes del embudo. Finalmente el matraz se aforó con agua ultrapura y se llevó la muestra para su análisis en un espectrofotómetro de Absorción Atómica (Varian, modelo Spectra A 250 plus). La muestra se succionó a razón de 8 mL/min debido al vacío generado por el flujo de gases requeridos para la generación de la flama (aire-acetileno).

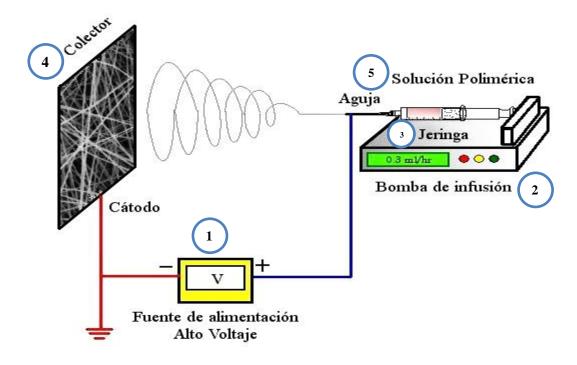
El análisis arroja un valor de absorbancia que es interpolado en una curva de calibración y así obtener una concentración de plata. La concentración obtenida se multiplicó por el factor de dilución para obtener la concentración final de la solución.

### 3.9 Preparación de nanofibras mediante la técnica de electrohilado

La obtención de membranas poliméricas con nanopartículas de plata cargadas se llevó acabo empleando la técnica de electrohilado, en la cual las fibras se formaron debido a la aplicación de un campo electrostático de alto voltaje, donde se requirieron los siguientes aditamentos:

- 1) Fuente de alimentación de alto voltaje (Spellman modelo CZE 1000R).
- 2) Bomba de infusión para suministrar y controlar el flujo de la solución polimérica (Cole Parmer).
- 3) Jeringa hipodérmica de 3 mL para depositar la solución polimérica.
- 4) Hoja de aluminio en la cual se colecten las fibras.
- 5) Solución polimérica.





*Figura 3.7.-* Esquema del proceso de electrohilado utilizado para la formación de las membranas poliméricas de nanofibras.

Para la obtención de las membranas se decidió utilizar como matriz polimérica el poli (vinil alcohol) PVA; ya que como se ha mencionado anteriormente, es un polímero que se caracteriza por ser hidrosoluble, biocompatible, no tóxico, de gran uso a nivel industrial (111) y reciente aplicación en el área biomédica (112).

La generación de una membrana polimérica con propiedades antimicrobianas requirió de la incorporación de nanopartículas de plata en la matriz de PVA, por lo que se emplearon tres métodos para la preparación de la solución polimérica:

- Mezclado de la solución de nanopartículas de plata con la mezcla de PVA.
- 2. Empleo de la solución de la reacción "in situ" de nanopartículas de plata.
- 3. Empleo de la solución de la reacción "in situ" de nanopartículas de plata y adición de quitosán.





### 3.9.1. Preparación de las nanofibras PVA-AgNPs mediante mezclado

Considerando los estudios en los que se reporta la formación de fibras utilizando el PVA como medio de soporte <sup>(113)</sup>, se decidió emplear una solución acuosa con una concentración al 10% w/w, mezclando dos tipos de PVA; uno de bajo peso molecular  $M_w$ = 13,000- 23,000 g/mol (87-89% hidrolizado) y uno de alto peso molecular  $M_w$ = 126,000 g/mol (98-99% hidrolizado), con una relación 50:50, ya que se observó que las membranas obtenidas a partir de esta mezcla presentaron una mejor distribución de tamaño y morfología en las fibras. Para preparar la solución se pesaron por separado cada uno de los diferentes pesos moleculares de PVA y se añadieron a un matraz Erlenmeyer que contenía agua ultrapura para ajustar las solución al 100%. El matraz se colocó en una parrilla de calentamiento a una temperatura aproximada de 80°C con agitación constante hasta disolver completamente el PVA, proceso que se identificó por la perdida de turbidez de la solución y la ausencia de partículas de PVA en forma de gel. El matraz se retiró del calentamiento y se dejó enfriar para almacenar la solución en un frasco de reactivo a temperatura ambiente.

Para evaluar la propiedad antimicrobiana de las nanopartículas de plata incorporadas en las membranas, se decidió preparar membranas con diferente concentración de nanopartículas de plata, por lo que al haber obtenido previamente la cantidad de plata contenida en la solución de nanopartículas de plata mediante espectroscopia de absorción atómica, se realizaron los cálculos pertinentes para determinar la cantidad de volumen que debía añadirse a cada una de las muestras de PVA y proseguir con su mezclado.

La solución de nanopartículas fue sometida a agitación constante durante dos horas y llevada al baño de ultrasonido para asegurar una buena dispersión de las nanopartículas. Posteriormente se tomó un determinado volumen de muestra y se mezcló con la solución de PVA, dejándose en agitación por lo menos una hora, previo a ser sometida la solución al proceso de electrohilado.

# 3.9.2 Síntesis "in situ" de nanopartículas de plata empleando el PVA como agente estabilizante y su posterior electrohilado

Otra manera de preparar la solución polimérica para la formación de membranas fue sintetizando las nanopartículas de plata "in situ", empleando el PVA como agente estabilizante en lugar del SDS. Para preparar un volumen de reacción de 80 mL se pesaron 4 g de PVA M<sub>w</sub> 126,000 g/mol y 4 g de PVA M<sub>w</sub> 13,000-23,000 g/mol, los cuales se añadieron al reactor que contenía 60 mL de



agua ultrapura. En la siguiente etapa se adicionaron 4 mL de hidróxido de amonio (NH<sub>4</sub>OH) bajo agitación constante y se procedió a encender el baño termostático para alcanzar la temperatura de reacción de 80°C, proporcionando un tiempo suficiente para disolver el PVA.

Después de un determinado tiempo se añadió la solución de AgNO<sub>3</sub> 10 mM y a los 5 minutos se adicionó la solución preparada con la fracción del extracto de nopal que contenía el agente reductor para iniciar la reacción "in situ" de nanopartículas de plata. La reacción "in situ" también fue monitoreada a través de espectroscopia UV-visible realizando mediciones de absorbancia cada 30 minutos hasta completar un tiempo de reacción de 5 horas.

Tabla 3.3.- Composición de cada uno de los reactivos empleados en la síntesis "in situ" de nanopartículas de plata.

Reactivo	Reacción	Blanco control	
$AgNO_3$	8 mL	0	
NH₄OH	4 mL	0.5 mL	
Agua Ultrapura	60 mL	7.5 mL	
$PVA M_w = 13-23 \ kg/mol$	4 g	0.5 g	
$PVA M_w = 126 \ kg/mol$	4 g	0.5 g	
Extracto de nopal	0.128 g/ 8 mL	5.4 mg/ 1 mL	
Volumen de reacción	80 mL	10 mL	

Al haber concluido el tiempo de reacción se apagó el baño termostático y se dejo enfriar el reactor a temperatura ambiente, para después vaciar el producto de la reacción en un frasco de reactivo color ámbar y proseguir con su electrohilado.

### 3.9.3 Síntesis "in situ" de nanopartículas de plata empleando el PVA como agente estabilizante y la adición de Quitosán para su posterior electrohilado

En base a una revisión en la literatura se ha reportado el uso del quitosán como un excelente agente antimicrobiano, por lo que después de haber realizado la reacción "in situ" de las nanopartículas de plata, se decidió adicionar una determinada concentración de quitosán dentro las fibras de PVA, con la finalidad de minimizar el contenido de nanopartículas de plata y comprobar que la actividad antimicrobiana del quitosán en presencia y ausencia de nanopartículas de plata.



Las muestras para las membranas fueron preparadas adicionando una cantidad de quitosán de bajo peso molecular equivalente al 1% en peso del total de la solución. Previamente el quitosán fue pasado por una columna de ultrafiltración de 3000 NMWC y secado en el liofilizador. Después de adicionar el quitosán se agitaron perfectamente cada una de las soluciones hasta observar una completa dispersión del quitosán (coloración amarilla) para proceder a su electrohilado.

#### 3.10 Electrohilado de las soluciones poliméricas

El proceso de electrohilado se inició llenando la jeringa con la solución polimérica. Este procedimiento se realizó sumergiendo la aguja en el recipiente donde se encontraba la solución y succionándola lentamente con el émbolo de la jeringa hasta el nivel indicado. El aire atrapado en el interior de la jeringa se eliminó para evitar interrupciones durante el transcurso del flujo del chorro polimérico hacia el colector.

Los métodos para suministrar la solución polimérica pueden ser a un flujo volumétrico constante o presión constante. El más común y empleado para este proceso fue el de flujo volumétrico constante, suministrado por una bomba de infusión (113). La solución polimérica fue bombeada a la punta de la aguja formando una gota semiesférica suspendida en la punta debido a la tensión superficial de la solución. Para que la gota no presentara alguna deformación al salir de la aguja, la punta se desgastó con una lija, minimizando así cualquier posible defecto en las fibras. La aguja se conectó mediante un caimán a la fuente de alimentación de alto voltaje para inducir cargas a la solución polimérica y propiciar la formación del cono de Taylor.

Cómo se mencionó anteriormente, es importante establecer un flujo volumétrico que permita mantener un cono de Taylor estable, ya que si el flujo es muy bajo, puede provocar que el chorro de solución polimérica se interrumpa y ocasione deformaciones en las fibras, y por el contrario, un flujo demasiado alto podría originar un incremento en el diámetro de las fibras o que el chorro gotee <sup>(79)</sup>.

Los electrodos para colectar las fibras se encuentran en muchas formas y tamaños pero generalmente se encuentran en forma de hoja metálica plana  $^{(114)}$ . Este electrodo es conectado a tierra, por lo que lleva la carga opuesta al electrodo de alto voltaje. El colector utilizado fue una hoja de aluminio con área de 6 cm² y un espesor de  $2.54 \times 10^{-3}$  cm.





Para iniciar el flujo de la solución polimérica hacia la punta de la aguja se encendió la bomba de infusión y consecutivamente la fuente de alto voltaje, en la cual se fue incrementando el voltaje paulatinamente hasta alcanzar el voltaje establecido, venciendo de esta forma la tensión superficial de la gota y generando el chorro polimérico cargado eléctricamente, el cual se dirigió hacia la región de menor potencial donde se hallaba el colector de aluminio conectado a tierra a una distancia de 10 cm. El tiempo destinado para la formación de una membrana con un espesor considerable que permitiera su manipulación sin fracturarla fue de 2 horas, con un flujo volumétrico de 0.3 mL/hr y un voltaje de 20 kV. Estos parámetros se definieron en base a estudios que reportaron mejores resultados en el electrohilado de fibras (115), aunque se decidió analizar el comportamiento de las fibras al modificar los siguientes parámetros:

- 1) Distancia entre el colector y la aguja.
- 2) Posición de la aguja.

### 3.11 Preparación de las membranas poliméricas para la evaluación de las propiedades antimicrobianas

Debido a que el PVA es un polímero hidrosoluble, las fibras hiladas a partir de éste polímero tienden a solubilizarse y perder su estructura al entrar en contacto con el agua, por lo que antes de evaluar la propiedad antimicrobiana de las membranas fue necesario someterlas a un proceso de entrecruzamiento.

#### 3.11.1 Entrecruzamiento de las membranas poliméricas

Se realizó un entrecruzamiento físico de las membranas con metanol, mediante el cual las moléculas de metanol desplazaron las moléculas de agua atrapadas entre las fibras, promoviendo la formación de puentes de hidrógeno entre las moléculas del polímero y sustituyendo los existentes entre las moléculas de polímero y las de agua, manteniendo la estructura de la fibra (115).

Las membranas poliméricas electrohiladas se mantuvieron adheridas al aluminio y se cortaron en piezas con dimensiones de 3 x 3 cm. Después de haberlas cortado se sumergieron en un recipiente con metanol durante un tiempo de 24 horas. Al transcurrir el tiempo de entrecruzamiento las membranas se retiraron del metanol y se dejaron secar a temperatura ambiente para posteriormente caracterizarlas y evaluar su propiedad antimicrobiana.





#### 3.12 Caracterización de las nanofibras obtenidas mediante electrohilado

Las membranas poliméricas obtenidas mediante la técnica de electrohilado se caracterizaron mediante la técnica de microscopia electrónica de barrido (SEM), microscopia electrónica de transmisión (TEM) y espectroscopia FTIR para evaluar la morfología y tamaño de las fibras, así como la dispersión de las nanopartículas en las fibras y la interacción de éstas con el polímero.

#### 3.12.1 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

En la microscopia electrónica de barrido un cañón de electrones produce un haz de electrones enfocado con precisión, denominado haz primario. Estos electrones atraviesan lentes electromagnéticas y son dirigidas sobre la superficie de la muestra. El haz primario de electrones elimina electrones de la superficie externa de la muestra; éstos, emitidos en forma secundaria, son transmitidos hasta un colector, luego amplificados y utilizados para formar una imagen sobre una pantalla o sobre una placa fotográfica. Es especialmente útil para estudiar las estructuras superficiales (109).

Para analizar la morfología y distribución de tamaño de las nanofibras mediante SEM, se utilizó un microscopio electrónico de barrido (*SM-510* TOPCON). Para llevar a cabo la caracterización, se realizó un pequeño corte a la membrana y se depositó sobre un portamuestra de cobre. Como la muestra requiere ser conductora, se recubrió con una capa de oro-paladio, la cual debe ser lo suficientemente gruesa para que circule la corriente eléctrica que se deposita en la muestra y suficientemente delgado para que no oculte otras características superficiales de interés.

#### 3.12.2 Microscopia electrónica de transmisión (TEM)

Para la evaluación de las membranas mediante TEM, el proceso de preparación de la muestra fue diferente. En este caso se realizó el proceso de electrohilado a las condiciones establecidas, depositando las fibras directamente en la rejilla de cobre-Lacey Carbon. La rejilla se colocó sobre el colector de aluminio y se dio un tiempo de 2 minutos para colectar las fibras.





#### 3.12.3 Espectroscopia Infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopia infrarroja es una técnica basada en las vibraciones de los átomos de una molécula. Un espectro infrarrojo comúnmente es obtenido haciendo pasar radiación infrarroja a través de una muestra y determinando que fracción de la radiación incidente es absorbida a una energía particular. La energía a la que cualquier pico en el espectro de absorción aparece corresponde a la frecuencia de vibración de una parte de la molécula de la muestra.

La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier se basa en la idea de la interferencia de la radiación entre dos haces para producir un interferograma. Éste último es una señal producida como una función de la variación del paso de luz entre los dos rayos. Los dos dominios de la distancia y la frecuencia son intercorvertibles por el método matemático de la transformada de Fourier. La radiación emergente de la fuente pasa a través de un interferómetro a la muestra antes de llegar al detector. Tras la amplificación de la señal, en el que las contribuciones de alta frecuencia han sido eliminadas mediante un filtro, los datos son convertidos a forma digital por un convertidor analógico-digital y transferidos a la computadora para transformación de Fourier (116).

Las membranas fibrosas se caracterizaron mediante esta técnica para analizar la interacción de las nanopartículas de plata con la matriz polimérica. Se utilizó un espectrómetro infrarrojo (ThermoNicolet, modelo AVATAR 330) utilizando las siguientes condiciones: 25 scans con una resolución de 4 cm<sup>-1</sup> y considerando la región del espectro entre 4000 y 400 cm<sup>-1</sup>. El análisis se realizó mediante la técnica de transmisión utilizando las membranas preparadas por electrohilado.

### 3.13 Evaluación de la propiedad antimicrobiana de las membranas de nanofibras a base de nanopartículas de plata/polímero

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana de las membranas de nanofibras se utilizó el método estándar normalizado conocido como método por contacto. Para ello, bajo condiciones asépticas, se inocularon las membranas de nanofibras con cultivos de las cepas de *Escherichia coli* ATCC-25922, *Staphylococcus aureus* ATCC-29213, *Pseudomona aureoginosa* ATCC- 27853 para enseguida someter a una etapa de incubación las membranas inoculadas durante el periodo de tiempo establecido en la norma Industrial Japonesa Estándar Z 2801. Al concluir el tiempo de



exposición, la actividad antimicrobiana se estableció en base al porcentaje de inhibición del microorganismo al final de la prueba.

La evaluación de la actividad antifúngica a nivel de esporas se probó con *Aspergillus niger* ATCC 9642 y *Candida Albicans*. A continuación se describe a detalle el procedimiento aplicado para esta evaluación.

#### 3.13.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana

#### a) Preparación del inóculo

La propagación de las cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* se realizó mediante el desarrollo de un cultivo líquido en caldo de soya tripticasa por un tiempo de 24 horas a una temperatura de 37°C en un agitador *New Brunswick Scientific*, con una agitación de 200 rpm.

Para cada uno de los cultivos de cada cepa del microorganismo a evaluar, la recuperación de la biomasa se llevó a cabo centrifugando la suspensión contenida en el matraz a 14,000 rpm, durante 15 minutos y a una temperatura de 20°C, realizando 3 lavados de la biomasa con solución fisiológica (0.85% NaCl). La biomasa recuperada de cada microorganismo se resuspendió en 50 mL de solución fisiológica, para posteriormente determinar la cantidad de unidades formadoras de colonia por mililitro de solución (UFC/ mL) mediante un recuento viable de cada suspensión.

#### b) Recuento viable

En condiciones estériles se realizó el recuento viable tomando 1mL de la suspensión celular y adicionándolo a un tubo de ensayo que contenía 9 mL de solución fisiológica. El tubo fue tapado y agitado vigorosamente para tomar 1 mL de éste y diluirlo nuevamente en otro tubo con el mismo volumen de solución fisiológica. Se volvió a tomar otro mililitro de la solución contenida en el tubo y se colocó en una caja Petri estéril con 15 mL de agar soya tripticasa. Este procedimiento se repitió hasta diluir la muestra 10 veces. Las cajas se incubaron a 37°C durante 24 horas en una incubadora *Lab. Line Instruments*. Al finalizar el tiempo de incubación se retiraron las placas de la incubadora y se realizó el recuento de UFC/mL y determinar con ello la concentración de la suspensión celular. Este procedimiento se aplicó tanto en la suspensión celular de la bacteria *E.coli* así como la de *S. aureus*.





*Figura 3.8.*- Desarrollo del recuento viable en una campana de flujo laminar en condiciones estériles.

En base a la concentración de la suspensión celular, se realizaron los cálculos convenientes para ajustar la concentración del inóculo al valor especificado por la norma (50,000 UFC/mL) con caldo de soya tripticasa diluido 1/500.

#### c) Inoculación de las muestras e inicio de la prueba antibacteriana

Las membranas poliméricas previamente entrecruzadas se desprendieron del aluminio y se colocaron en viales estériles con capacidad de 20 mL. Se realizaron 3 repeticiones de cada muestra, utilizando 6 blancos que contenían únicamente PVA, de los cuales se tomaron 3 para realizar el recuento a tiempo cero (T<sub>0</sub>). Las membranas colocadas en los viales se inocularon con 4 mL de la suspensión del microorganismo a evaluar y se cubrieron con tapones de algodón. Todas las muestras, a excepción de los 3 blancos de PVA (T<sub>0</sub>), se colocaron en una incubadora *Precision Scientific* a una temperatura de 37°C y 90% de humedad durante 24 horas. Al finalizar el tiempo de incubación, las muestras fueron retiradas de la incubadora y se procedió a hacer el recuento bacteriano (T<sub>24</sub>) de la misma manera en que se realizó el recuento para la preparación del inóculo. Las cajas Petri se incubaron a 37°C durante 24 horas. Concluido el tiempo de incubación se procedió a realizar el conteo de bacterias a tiempo cero y después del tiempo de exposición de las membranas con el microorganismo durante un periodo de 24 horas.

Después de obtener los resultados de UFC/mL, se determinó la actividad bactericida de cada membrana, empleando la siguiente ecuación (Ec.1):



$$r = \left[log \frac{Blanco_{T24}}{Blanco_{T0}} - log \frac{Muestra_{T24}}{Blanco_{T0}}\right]$$
 Ec.1

Donde:

r: porcentaje de actividad antimicrobiana

Blanco<sub>T24</sub>: resultado del conteo bacterias después de 24 horas de incubación

Blanco TO: resultado del conteo bacterias al inicio de la incubación

Muestra T24: resultado del conteo de la muestra con propiedad bactericida

El valor de la actividad obtenida a través de este procedimiento de esta norma y que determina la eficacia de productos formulados con agente antimicrobiano, no debe ser menor de 2.0.

#### 3.13.2 Evaluación de la actividad antifúngica

#### 3.13.2.1 Pruebas con la cepa del Aspergillus niger

La cepa del hongo *Aspergillus niger* ATCC-6275 se cultivó utilizando el método de estriado en placa de agar. Para ello, utilizando un asa de platino esterilizada con la flama de un mechero, se tomó un poco de esporas de un cultivo de microorganismo conservado en solución de agua/glicerol y se depositaron en cajas Petri conteniendo agar de dextrosa y papa solidificado. Las esporas depositadas se esparcieron utilizando un asa de platino y efectuando un estriado en toda el área de la caja Petri. Las cajas se incubaron a una temperatura de 28°C durante 5 días para permitir un crecimiento abundante de micelio y de esporas.

Concluido el tiempo de incubación se preparó una suspensión del hongo desarrollado. Para ello, se vaciaron 5 mL de caldo de agar papa diluido 1/500 en la cajas que contenían el cultivo y se raspó la capa de agar con una espátula para desprender la mayor cantidad del hongo desarrollado (micelio y esporas). La suspensión se recolectó en un matraz haciendo pasar la suspensión a través de un embudo con algodón como material filtrante. El filtrado con algodón permite retener el micelio del hongo y recuperar en la solución solamente las esporas del hongo, las cuales se utilizaran para el desarrollo de la prueba de actividad antifúngica. La cantidad de esporas presente en la suspensión se determinó empleando una cámara de Neubauer o hematocitómetro. Para ello se tomó una pequeña alícuota de la suspensión y se dejó deslizar en la cámara que previamente



tenía adherido un cubreobjetos. La cámara se visualizó en un microscopio óptico y se realizó el conteo de cada uno de los recuadros cuadriculados marcados en la cámara y de esto modo determinar la cantidad total de esporas por mililitro presentes en la suspensión.

En base a la concentración de la suspensión de esporas, se realizaron los cálculos convenientes para ajustar la concentración del inóculo al valor especificado por la norma (50,000 esporas/mL) realizando una dilución con caldo dextrosa y papa (1/500).

La inoculación se realizó de la misma forma que las pruebas bactericidas, solo que para esta prueba las muestras se incubaron a una temperatura de 28°C durante 48 horas. El porcentaje de inhibición se determinó empleando la misma fórmula utilizada para la actividad bactericida.

#### 3.13.2.2Pruebas con la cepa de Candida Albicans

La cepa de *Candida albicans* utilizada en el estudio fue obtenida y donada por el laboratorio de análisis clínicos del Hospital general de la localidad. Para la propagación de la cepa en su forma levaduriforme, se partió de un cultivo en placa, el cual se resembró en un matraz conteniendo medio líquido YPD (extracto de levadura, peptona y dextrosa). El medio de cultivo inoculado con la cepa de *C. albicans*, se dejó en incubación durante 24 horas a 28°C y con una agitación de 120 rpm. Una vez desarrollado el cultivo, se procedió a recuperar la biomasa por centrifugación y lavando esta dos veces con medio YPD líquido y enseguida efectuar el recuento de células presentes en la suspensión, El recuento de células se efectuó aplicando la metodología descrita en el recuento viable de bacterias y determinando la cantidad de UFC se procedió a preparar la suspensión celular para inocular las membranas.

Las membranas se inocularon de igual forma que las pruebas bactericidas, y se incubaron a una temperatura de 28°C durante 24 horas. El porcentaje de inhibición se determinó empleando la misma fórmula utilizada para la actividad bactericida.



### 4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 Obtención del extracto de nopal (Opuntia sp.)

Este estudio se inicio con la obtención del extracto de los cladodios de nopal, los extractos se procesaron y obtuvieron de acuerdo a la metodología descrita en el capítulo anterior. A partir de 3 kg de cladodios de nopal procesado se obtuvo un rendimiento (peso seco) de 60.9 g. Una vez sometido a filtración y después de haber eliminado todo aquel material que no consiguió pasar a través del filtro de gasa, se determinó que por cada 143 g de cladodios de nopal procesados, se obtenían 2.8 g de extracto seco, que corresponden a un rendimiento del 2%. Estos resultados son similares a los ya reportados en los cuales se indican pérdidas debido a los procesos de ebullición y/o filtrado (117).

#### 4.1.1 Caracterización del extracto de nopal

El contenido de sólidos insolubles, azúcares, fenoles y proteínas encontrados en el extracto de nopal liofilizado se presenta en la tabla 4.1. En dicha tabla se puede observar que el extracto de nopal se compone en un gran porcentaje de fenoles (23.55%), seguido por los azúcares y proteínas (11.62% y 11.16% respectivamente), y 4% de los sólidos insolubles.

De acuerdo a la información reportada en la literatura, el contenido de proteínas del 11.16%, es ligeramente mayor al descrito por Hernández- Urbiola y col. (118), quienes reportan una composición del 8.9% de proteínas en cladodios de nopal (*Opuntia sp.*). Esta diferencia se puede atribuir a diferentes factores entre los que se incluyen variaciones climáticas, estacionales, nutricionales, especie, etc. (117). Sin embargo es importante señalar que la materia prima para el procesamiento y obtención de los extractos de nopal se procuro que siempre fueran de la misma fuente.



Tabla 4.1.-Composición química del extracto de nopal (Opuntia sp.)

Componente	Contenido (%)
Sólidos insolubles	4%
Proteína Total	11.16%
Proteína Soluble	0.53%
Azúcares totales	11.62%
Fenoles totales	23.55%

En relación al contenido de azúcares presentes en el extracto de nopal, Hernández- Urbiola y col. (118), reportan una composición de carbohidratos del 42.0 %, un valor cuatro veces mayor al reportado en este trabajo. Por el contrario, Cantwell y col. (119), reportan un valor que representa alrededor de la mitad (5.42%) del descrito en la tabla anterior. Factores como los arriba mencionados pueden estar interviniendo en estas determinaciones. Bravo (120), menciona que el extracto de nopal se compone de tres tipos de carbohidratos: monosacáridos, disacáridos y polisacáridos, por lo que mediante el método Megazyme se decidió analizar diferentes tipos de azúcares presentes en el extracto tales como: sacarosa, glucosa, fructosa, fructooligosacáridos (FOS) y pectina, de los cuales se muestran las composiciones obtenidas en la tabla 4.2. Como se observa en la tabla, el sacárido que se encuentra en mayor proporción corresponde a la pectina, un polisacárido complejo compuesto por arabinosa y xilosa que le confiere propiedades gelificantes al extracto de nopal. La composición que se obtuvo de pectina fue del 16.54%, valor ligeramente por encima del reportado por Peña-Valdivia y col. (121), quienes mencionan que el contenido de pectina en los cladodios debe encontrarse entre un 5.32% y 14.19%.

**Tabla 4.2.** Composición de sacáridos presentes en el extracto de nopal (*Opuntia sp*).

Sacárido	Composición (%)
Fructooligosacáridos	1.02 %
Glucosa	2.79 %
Fructosa	4.12 %
Sacarosa	7.42 %
Pectina	16.54 %





No se encontró información en la literatura que especifique la composición de glucosa y fructosa en los cladodios de nopal, solamente se encontraron estudios de la caracterización de estos compuestos en los frutos de Opuntia sp. ficus. Villaume y col. (122), reportan una composición de 29% fructosa y 35% glucosa, obviamente estos valores resultan ser muchos más altos, al compararlos con la composición de los cladodios, que en nuestro caso fue de 2.79 % y 4.12 % para glucosa y fructosa respectivamente, esto confirma que la mayor parte de los carbohidratos se concentra en el fruto de la Opuntia. Los otros tipos de azúcares evaluados fueron la sacarosa, con una composición del 7.42% y en composición mínima se encontraron los FOS con 1.02%.

En relación a los fenoles, uno de los compuestos que se encontraron en mayor proporción en el extracto, Lee y col. (123), reportaron una composición del 18% de fenoles para el extracto de nopal, un valor bajo que el obtenido en este trabajo (23.55%). Medina-Torres (124) reportó una composición aún más baja del 6% de fenoles, pertenecientes a un extracto de nopal deshidratado a una temperatura de 45°C. Lo anterior hace suponer que el proceso de extracción mediante la ebullición de los cladodios de nopal, conlleva a mejorar la extracción de fenoles (118).

En base a los resultados anteriores se puede decir que tanto la especie y maduración del cladodio de nopal, el método de extracción utilizado, así como otras condiciones discutidas previamente, son algunos de los factores que influyen en la composición química del extracto de nopal, por lo que los resultados de caracterización difieren de algunos de los trabajos reportados por otros autores.

#### 4.2 Separación del extracto de nopal por el proceso de ultrafiltración

Con el fin de identificar el o los posibles componentes del extracto de nopal que participan en la reducción de los iones de plata para dar lugar a la formación de la plata metálica en las nanopartículas, se decidió fraccionar éste extracto mediante un proceso de micro y ultrafiltración. Como ya se mencionó en el capítulo de la parte experimental, la micro y ultrafiltración permiten separar partículas o moléculas de diferentes tamaños o pesos moleculares.

En la selección de las membranas de fibra hueca se utilizó la información generada en la determinación de la composición del extracto de cladodio de nopal según se discutió en párrafos





previos, y con base en ello se eligieron las membranas, cuyas principales características se detallan en la tabla 4.3.

Aunque la caracterización del extracto indica que los principales componentes presentes en el extracto de nopal son moléculas con pesos moleculares inferiores a 3,000 Kg/mol, se decidió ampliar el abanico de fracciones utilizado con la finalidad de eliminar restos de extracto insoluble y evitar la presencia de geles debido a la presencia de macromoléculas o agregados moleculares insolubles. El análisis de los resultados obtenidos indica que el permeado de la columna UFP-3-C -MM01A fue en donde se obtuvo el mayor porcentaje de todas las fracciones del extracto analizado, la de menor proporción se ubicó en aquella fracción donde las moléculas o partículas están cercanas a 300,000 de peso molecular (0.42%).

*Tabla 4.3.*- Relación de las composiciones de las fracciones del extracto de nopal con diferente peso molecular.

Retenido	Modelo Columna	Tamaño de poro	Peso (g)	%
Fracción 1	CFP-2-C-MM01A	0.2 micrón	0.2192	6.33
Fracción 2	CFP-1-C-MM01A	0.1 micrón	0.0479	1.38
Fracción 3	UFP-500-E-MM01A	500,000 NMWC	0.0774	2.23
Fracción 4	UFP-300-E-MM01A	300,000 NMWC	0.0146	0.42
Fracción 5	UFP-100-C-MM01A	100,000 NMWC	0.0714	2.06
Fracción 6	UFP-50 -E -MM01A	50,000 NMWC	0.121	3.49
Fracción 7	UFP-30 -C -MM01A	30,000 NMWC	0.1786	5.15
Fracción 8	UFP-10 -E -MM01A	10,000 NMWC	0.2014	5.81
Fracción 9	UFP-3 - C -MM01A	3,000 NMWC	0.1679	4.85
Permeado	UFP-3 - C -MM01A	3,000 NMWC	2.2148	63.92
	Sólidos insolubles :		0.1506	4.35
	Peso f	inal del extracto :	3.4648	100.00





Las fracciones obtenidas se almacenaron en refrigeración a una temperatura de 4 °C para posteriormente caracterizarlas y emplearlas en el estudio que permitiera establecer la o las fracciones que muestran una capacidad para actuar como agente reductor en la síntesis de nanopartículas de plata.

#### 4.2.1 Caracterización de la fracción del permeado de 3000 NMWC

De acuerdo a los resultados del proceso de ultrafiltración se procedió a caracterizar la fracción del extracto de nopal que obtuvo el mayor porcentaje de todas las fracciones del extracto, es decir la fracción del permeado con partículas y moléculas con peso molecular menor a 3,000 Kg/mol. Los resultados de la composición química se presentan en la tabla 4.4.

**Tabla 4.4.** Composición química del extracto de nopal sin fraccionar y la fracción del permeado 3000 NMWC.

Componente	Extracto de nopal sin fraccionar	Permeado 3000
Proteína Total	11.16%	6.61%
Proteína Soluble	0.53%	0.15%
Azúcares totales	11.62%	12.11%
Fenoles totales	23.55%	19.94%

La comparación de los resultados de composición química del extracto total sin fraccionar y la fracción de permeado permite señalar que la variación de la composición del permeado fue similar a la determinada del extracto sin fraccionar, tan solo se presentó una disminución del 5% en la composición de proteínas y fenoles, y un ligero aumento de aproximadamente 1% en la composición de azúcares.

Los resultados de caracterización de los tipos de azúcares en el permeado se presentan en la tabla 4.5. Para este caso no hubo variación en la composición de fructosa y FOS, más sin embargo se observó la ausencia de la pectina y un escaso aumento del 1.6 % en la composición de glucosa y sacarosa.





*Tabla 4.5.-* Composición de los azúcares presentes en el extracto de nopal sin fraccionar y en la fracción del *permeado de 3000 NMWC*.

Sacárido	Extracto de nopal sin fraccionar	Permeado 3000
Fructooligosacáridos	1.02 %	0.87%
Glucosa	2.79 %	3.43%
Fructosa	4.12 %	4.79%
Sacarosa	7.42 %	9.12%
Pectina	16.54 %	0 %

Los resultados de caracterización de la fracción del permeado permitieron corroborar la ausencia de la pectina de manera visual. En la figura 4.1 se muestran las fracciones obtenidas del extracto de nopal después de haberlas almacenado en refrigeración para evitar su descomposición. Como se puede observar, a partir de la fracción 9 las muestras conservaron su apariencia de polvo, mientras que en el resto de las fracciones se observa aglutinación de éstas e inclusive alguna de ellas gelificadas y con una coloración un poco más oscura, este hecho confirmó la ausencia de pectina en el permeado y que la presencia de éste en el resto de las fracciones originó su gelificación. Lo anterior se justifica con lo reportado por Aza y Méndez (125), quienes reportan que el enfriamiento de una solución que contiene pectina tiende a gelificar dicha solución, debido a que las energías térmicas de las moléculas disminuyen.



Figura 4.1.- Fracciones del extracto de nopal obtenidas mediante el proceso de ultrafiltración.





## 4.3 Síntesis de nanopartículas de plata con los extractos de cladodios de nopal como agente reductor y SDS como agente estabilizante

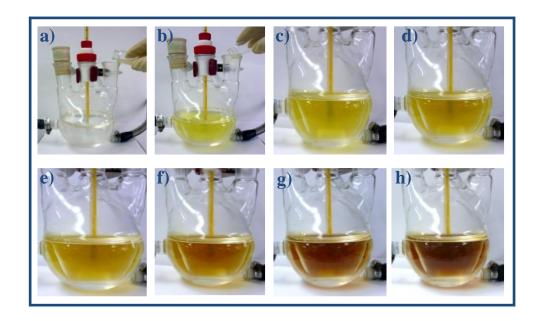
Antes de iniciar el proceso de síntesis de nanopartículas, fue necesario liofilizar nuevamente el extracto de nopal en polvo con la finalidad de eliminar la humedad que el extracto pudiera haber absorbido, ya que como se mencionó con anterioridad, la pectina presente en el extracto tiende a retener un alto porcentaje de agua.

La síntesis de nanopartículas de plata empleando el extracto de nopal como agente reductor se llevó acabo considerando los parámetros reportados en la literatura y que se describen a detalle en la parte experimental <sup>(101)</sup>.

El seguimiento de la formación de nanopartículas fue monitoreada mediante muestreo a diferentes intervalos de tiempo para observar el cambio de color de la mezcla de reacción y al mismo tiempo llevar el análisis de las mismas mediante espectroscopia UV-visible. La figura 4.2 muestra los principales cambios de coloración experimentados a lo largo de la reacción de síntesis de las nanopartículas de plata a partir de AgNO<sub>3</sub>, utilizando extracto de nopal como agente reductor y el SDS como agente estabilizante. Esta reacción se llevó a cabo en un reactor de vidrio conteniendo 80 mL de la mezcla de reacción, de acuerdo al procedimiento descrito en la parte experimental.

Es importante señalar que desde el inicio de la reacción, se observaron cambios de coloración. Pasando de una solución incolora al inicio de la reacción, a una tonalidad amarillo-verdosa con la adición de la solución de extracto de nopal, seguido de un cambio a un color con tonalidad amarilla más intensa y culminar con un color rojizo-marrón al final de la reacción. Estos cambios de color y tonalidad se pueden atribuir a la reducción de los iones plata mediada por los componentes del extracto del nopal (Figura 4.2). Estas observaciones son similares a las observadas por otros autores, pero con extractos de diferentes plantas.





*Figura 4.2.*- Análisis del avance de reacción de nanopartículas de plata en presencia de extracto de nopal como agente reductor. a) Adición del AgNO<sub>3</sub>, b) adición del extracto de nopal t = 0, c) t = 30 min, d) t = 1 h, e) t = 1 h 30 min, f) t = 2 h, g) t = 2 h 30 min, h) t = 3 h.

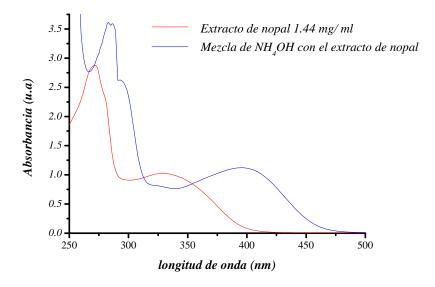
Para corroborar estas observaciones, las muestras obtenidas de la reacción se sometieron a un análisis mediante espectroscopia UV-visible. Previo a ello, se analizó el comportamiento espectrofotométrico del extracto de nopal antes de ser adicionado a la mezcla de reacción para producir las nanopartículas de plata, en ausencia y presencia de hidróxido de amonio (NH<sub>4</sub>OH). La figura 4.3 muestra los espectros UV-visible correspondientes a este análisis, claramente se aprecia la presencia de dos picos de absorción máxima, localizados a 275 nm, con un ligero hombro a 300 nm y un segundo pico a 375 nm. Estos picos muy probablemente estén asociados a la presencia de moléculas conjugadas del tipo fenoles o flavonoides <sup>(126)</sup>. Cuando a esta misma muestra se le adicionó hidróxido de amonio fue posible apreciar un desplazamiento batocrómico en su espectro con absorciones máxima a 285 nm y 390 nm, y también la desaparición del hombro de la primera banda. Este desplazamiento puede estar asociado a las interacciones iónicas de los flavonoides procedentes del extracto al encontrarse en un medio básico <sup>(126)</sup>.

El hidróxido de amonio desempeña un papel importante para la síntesis y estabilización de las nanopartículas de plata metálica con tamaños pequeños. Gorup y colaboradores <sup>(101)</sup> han reportado que la adición de hidróxido de amonio permite estabilizar suspensiones coloidales de nanopartículas de plata cuasi-monodispersas con tamaños promedio más pequeños, ya que los iones de plata libres, los cuales son responsables del crecimiento y la formación de nuevos



núcleos, quedan atrapados por la formación de complejos solubles de diamina-plata (Ec.2), conservando las nanopartículas de plata por períodos largos de almacenamiento sin coalescencia o precipitado.

$$Ag_{(aq)}^{+} + 2NH_{3(aq)} \rightarrow [Ag(NH_{3})_{2}]_{(aq)}^{+}$$
 Ec. 2



*Figura 4.3.*- Espectros de absorción UV-visible de las solución de extracto de nopal antes y después de la adición de NH<sub>4</sub>OH.

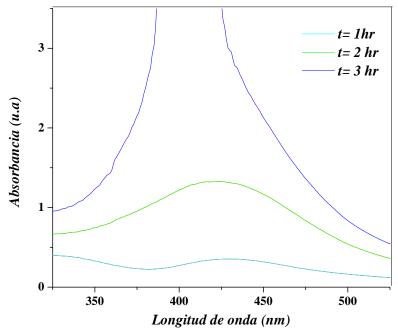
Después de haber caracterizado el espectro UV-visible se procedió a analizar y dar seguimiento a la cinética de la reacción para la síntesis de nanopartículas de plata, en presencia del extracto de nopal como agente reductor y el SDS como agente estabilizante. La reacción se llevó a cabo en un volumen de 80 mL, utilizando como controles la misma mezcla de reacción pero sin nitrato de plata. La intensidad de la absorbancia se incrementó durante el tiempo de incubación (Figura 4.4). En el espectro se puede observar una sola banda con un pico máximo de absorción a aproximadamente 405 nm, el cual se incrementa de forma progresiva en función del tiempo de reacción, sin ninguna desviación aparente. Estos datos concuerdan con las observaciones visuales del cambio de color previamente discutido, y se puede estimar la formación de nanopartículas de plata con tamaños entre 10-14 nm en base a las características espectrales de nanopartículas de plata reportadas por Solomon y colaboradores (Tabla 4.6) (127).



Tabla 4.6.- Tamaño de partícula y características espectrales de las nanopartículas de plata.

Tamaño de las partículas (nm)	$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)	Ancho del pico de plasmón (nm)
10-14	395-405	50-70
35-50	420	100-110
60-80	438	140-150

De acuerdo a lo reportado en la literatura, la apariencia de color café en la reacción es originada debido a la excitación de las vibraciones de los plasmones de superficie en las nanopartículas de plata <sup>(128)</sup>. La excitación de los plasmones de superficie localizados origina una fuerte dispersión de luz mediante un campo eléctrico a una longitud de onda donde ocurre la resonancia, provocando la aparición de una fuerte banda de resonancia de plasmón de superficie <sup>(129)</sup>. Hu y col. <sup>(130)</sup>, reportaron éste comportamiento para la síntesis de nanopartículas de plata obteniendo nanopartículas con morfología esférica.



*Figura 4.4.*- Espectros de absorción UV-visible en función del tiempo, de la síntesis de nanopartículas de plata empleando el extracto de nopal sin fraccionar (volumen de reacción 80 mL).





Como se puede observar en la figura 4.2, al haber transcurrido 30 minutos, la reacción presentó aparentemente la misma coloración adquirida al inicio, pero después de 1 hora, la solución se oscureció ligeramente presentando una coloración amarillo-café, la cual fue aunada a un incremento de 0.3 unidades en la intensidad del pico de máximo de absorbancia y un desplazamiento en la longitud de onda hacia 405 nm, lo que indicaba que las nanopartículas continuaban generándose en el medio. A las 2 horas de reacción el sistema consiguió obtener una alta conversión de nanopartículas de plata registrando una absorbancia de 1.25 unidades, hasta alcanzar un tiempo de 3 horas en el cual ya no fue posible monitorear la reacción debido a la saturación del sistema, originada por la presencia de una alta concentración de nanopartículas.

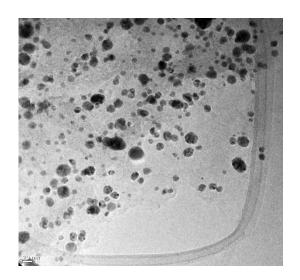
Realizando una revisión de otros estudios de espectroscopia de absorción por UV-visible para la síntesis de nanopartículas de plata empleando extractos de plantas como agentes de reducción, se encontró que Mukherjee y col. (131), reportaron una absorbancia máxima de 0.6 unidades después de 5 horas de reacción empleando el extracto de las hojas de *Azadirachta indica* (Neem), Jha y Prasad (132), obtuvieron una absorbancia máxima de 2.75 unidades después de haber transcurrido 2 horas de reacción empleando las hojas de *Cyca*, y Ahmad y col. (56), emplearon el extracto de la planta de *Aloe vera* y *almidón* obteniendo una absorbancia máxima después de haber transcurrido 24 horas de reacción. Comparando los resultados anteriores con los obtenidos en este estudio, es posible confirmar que el uso del extracto de nopal permite llevar a cabo la reducción de los iones de plata Ag<sup>+</sup> a partículas de plata Ag<sup>0</sup>, obteniendo altas conversiones de nanopartículas de plata en un lapso corto de tiempo, aunque es importante considerar otros factores tales como la concentración de AgNO<sub>3</sub>, la temperatura y el pH de la reacción.

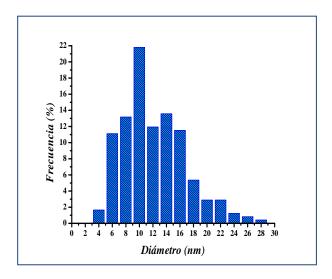
### 4.3.1 Análisis de morfología y tamaño de las nanopartículas de plata sintetizadas por medio de TEM

Las nanopartículas obtenidas de la reacción empleando el extracto de nopal como agente reductor y el SDS como estabilizante, se caracterizaron a través de microscopia electrónica de transmisión TEM para evaluar la morfología y el tamaño de las mismas. En la figura 4.5 se muestra una micrografía de las nanopartículas, donde se puede observar que la mayoría de las nanopartículas presentaron una morfología esférica, aunque ocasionalmente se llegaron a observar algunas partículas asimétricas ligeramente ovoides. Como se muestra en el histograma de distribución de tamaño de la figura 4.5, el tamaño promedio de las nanopartículas fue de 13 nm con un amplio



intervalo de diámetro de partícula de 5 a 28 nm. Aproximando el histograma por una curva de distribución, se puede observar que la curva es asimétrica y tiende a concentrarse en los intervalos de diámetros de 6-16 nm, lo cual indica que la distribución no fue muy homogénea y se generó una mayor concentración de nanopartículas con intervalos menores a los 16 nm.





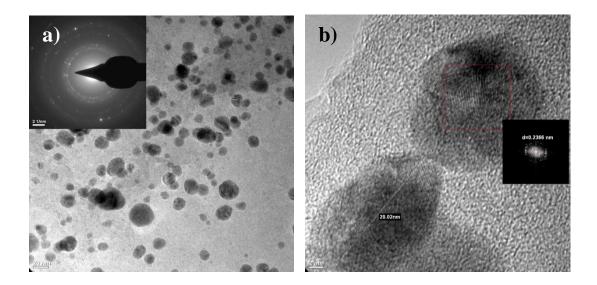
*Figura 4.5.*- Imagen TEM y distribución de tamaño de las nanopartículas de plata obtenidas empleando el extracto de nopal como agente reductor y el SDS como estabilizante.

En la literatura se reporta la obtención de nanopartículas de plata con tamaños desde 2 nm hasta 75 nm <sup>(58), (131), (132), (56)</sup> empleando extractos vegetales como agentes de reducción, pero en algunos casos la morfología que se presenta no es uniforme, es decir generalmente se presentan al final de las reacciones una mezcla de morfologías, es por ello que se puede confirmar que mediante el uso del extracto de nopal como agente reductor durante la síntesis de nanopartículas de plata, es posible obtener partículas de orden nanométrico y con morfología predominantemente esférica.

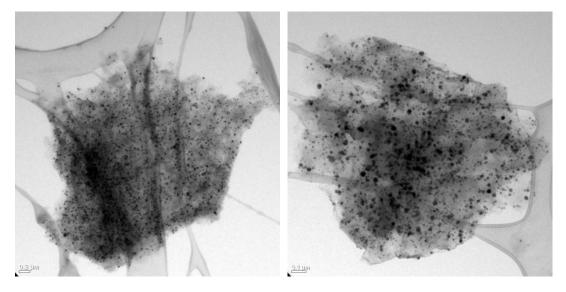
En la imagen a) de la figura 4.6 se observa una micrografía TEM a bajas magnificaciones de las nanopartículas de plata, donde la imagen insertada muestra el patrón de difracción de electrones por transformada de Fourier de esta zona, indicando la formación de nanopartículas policristalinas. La imagen b) muestra una micrografía TEM en modalidad de alta resolución, donde se pueden observar nanopartículas de plata con morfología semiesférica y diámetro aproximado de 20 nm. Además es posible observar el acomodo de los átomos de manera alineada pero en varias direcciones confirmando la formación de estructuras policristalinas. El inserto en la figura permite



determinar que el patrón de difracción corresponde al plano de crecimiento (1 1 1) de la estructura cúbica centrada en las caras (FCC) de la plata.



*Figura 4.6.*- Imagen TEM a bajas magnificaciones **a**) y alta resolución HRTEM **b**) de las nanopartículas de plata obtenidas empleando el extracto de nopal como agente reductor y el SDS como estabilizante.



*Figura 4.7.-* a) Imagen TEM de las nanopartículas de plata embebidas en materia orgánica perteneciente al extracto de nopal.

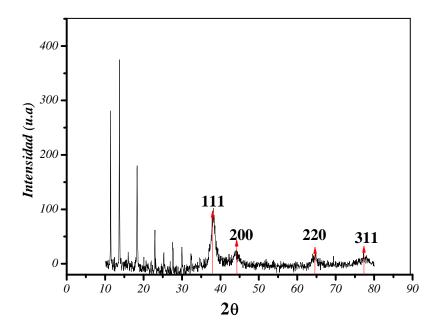
Aunque en la mayor parte de la muestra prevalecieron nanopartículas aisladas, se detectó la presencia de nanopartículas asociadas a una matriz. En la figura 4.7 se pueden observar asociaciones, en las cuales las nanopartículas se hallan embebidas en un tipo de materia orgánica



proveniente del extracto de nopal, que en base al análisis de composición química del extracto, éstas características podrían pertenecer a la pectina, ya que como se mencionó con anterioridad, tiene la propiedad de aglutinar sólidos formando un tipo de gel. Aunque las partículas muestran una cercanía muy próxima en la matriz, no se aprecia la formación de aglomerados definidos. Sin embargo para evitar estas asociaciones, se optó por fraccionar el extracto de nopal, lo cual podría evitar la presencia de este tipo de asociaciones durante la formación de nanopartículas de plata.

#### 4.3.2 Estudio por difracción de rayos X de las nanopartículas de plata obtenidas

Otra técnica que se utilizó para confirmar la naturaleza y estructura cristalina de las nanopartículas de plata, obtenidas con el extracto de nopal y el SDS como agente reductor y estabilizante respectivamente, fue mediante difracción de rayos X. Los datos de las estructuras cristalinas encontradas en la muestra, se compararon con la biblioteca de la base de datos del propio equipo.



*Figura 4.8.*- Patrón de difracción de rayos X de las nanopartículas de plata obtenidas empleando el extracto de nopal como agente reductor.

En el difractograma de rayos X de la figura 4.8, se muestran cuatro picos de difracción en la posición angular a  $2\theta = 38^{\circ}$ ,  $44^{\circ}$ ,  $65^{\circ}$  y  $78^{\circ}$ , los cuales están indexados para los planos 111, 200, 220 y 311 respectivamente, y corresponden a los planos de difracción de la plata de estructura FCC (cúbica centrada en las caras) (133). Las señales que se encuentran a ángulos inferiores a  $40^{\circ}$ C



en 2θ posiblemente correspondan al agente estabilizante de las nanopartículas, en este caso para el SDS.

De acuerdo al difractograma se puede observar que el pico de difracción localizado en la posición angular a 38° presentó una mayor intensidad en comparación con los picos a 44°, 65° y 78°, indicando con ello que las nanopartículas de plata presentan un mayor acomodo de sus átomos en planos 111, y en base a lo reportado por Pal y colaboradores , se espera una mayor reactividad de las nanopartículas de plata, debido a que ésta es favorecida por planos con una alta densidad de átomos tales como el plano 111 (134).

### 4.4 Síntesis de nanopartículas de plata empleando las fracciones del extracto de nopal obtenidas del proceso de ultrafiltrado y SDS como agente estabilizante

La micro y ultrafiltración de los extractos de cladodios de nopal se obtuvo de acuerdo a la metodología descrita en la parte experimental. Una vez obtenidas las fracciones micro y ultrafiltradas se procedió a su evaluación para determinar en cual de ellas se localizaba el posible agente o agentes responsables de la reducción de los iones de plata. Antes de iniciar con el proceso de síntesis, las fracciones se liofilizaron para eliminar la humedad absorbida durante su almacenamiento.

La evaluación de estas fracciones se realizó en un volumen de 10 mL empleando como agente estabilizanteel SDS, y se obtuvo el espectro de absorción de cada una de las fracciones ensayadas, después de transcurrir 5 horas de reacción.

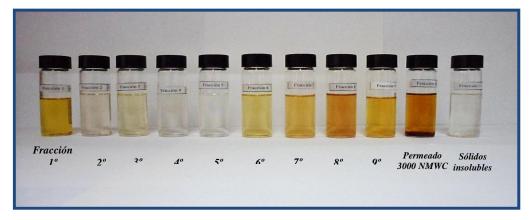
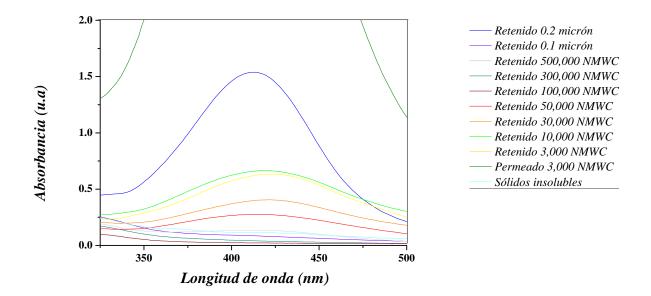


Figura 4.9.- Apariencia y coloración de cada una de las soluciones de las reacciones de nanopartículas de plata empleando cada una de las fracciones obtenidas en el proceso de ultrafiltración.



La figura 4.9 se muestra los resultados de la reducción de los iones plata en medio acuoso, utilizando las diferentes fracciones de las micro y ultrafiltraciones después de haber transcurrido las 5 horas de reacción. Como se puede apreciar, la coloración entre amarillo-marrón observada en las fracciones 1, 6, 7, 8, 9 y en el permeado de 3000 NMWC, es un indicativo de que ocurrió la formación de nanopartículas de plata en concordancia con lo discutido previamente (128). Para corroborar lo anterior, se realizó la caracterización de cada una de las soluciones de reacción por espectroscopia UV-visible (Figura 4.10).



*Figura 4.10.*- Espectros de absorción UV-visible en función del tiempo, de la síntesis de nanopartículas de plata empleando cada una de las fracciones del extracto obtenidas por micro y ultrafiltración.

En estos espectros se puede confirmar la presencia de nanopartículas de plata en las fracciones mencionadas con anterioridad, ya que tanto la fracción 1 como el permeado de 3,000 obtuvieron una absorbancia máxima a una longitud de onda de 420 nm, presentándose una mayor intensidad de absorbancia al usar la fracción del permeado de 3,000 debida a la presencia de una alta concentración de nanopartículas, la cual se puede percibir en la figura 4.9, donde la tonalidad de la solución es la más oscura. Los espectros de absorción de las fracciones 6, 7, 8 y 9 de los retenidos de las membranas de fibra hueca de 50,000, 30,000, 10,000 y 3,000 de peso molecular respectivamente, presentaron una absorción mínima en comparación con la fracción 1 y la





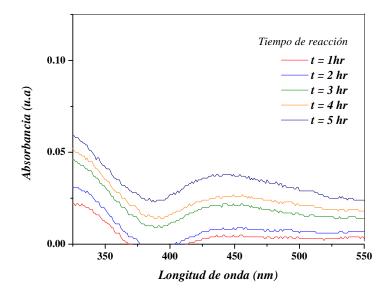
fracción del permeado de 3000, y en algunos casos no se presentó absorción, indicando una escasa o nula reducción de los iones de plata.

Con estos datos se procedió a ensayar la cinética de reacción con la fracción 1 y el permeado de 3000; fracciones que mostraron un mejor desempeño en cuanto a su capacidad de reducir los iones plata para formar nanopartículas de plata. La reacción se realizó en un volumen de reacción de 80 mL, monitoreando el cambio de absorción, por medio de espectroscopia UV-visible.

### 4.4.1 Síntesis de nanopartículas de plata empleando la fracción No. 1 del extracto de nopal como agente reductor y SDS como agente estabilizante

La figura 4.11 muestra el comportamiento de la cinética de la reacción de formación de nanopartículas de plata empleando la fracción No.1 (conteniendo partículas dispersas o moléculas del extracto de nopal con tamaño inferior a 0.2 micras), donde se puede observar la formación de un pico máximo de absorbancia alrededor de 410 nm, donde se pudo apreciar el cambio de la intensidad de absorbancia conforme avanza la reacción. El valor de absorbancia máxima fue de tan solo 0.04 unidades después de haber cumplido las 5 horas de reacción. Este valor de absorbancia es relativamente bajo en comparación con el uso del extracto de nopal completo, lo que permite suponer una escasa conversión de iones de plata en nanopartículas de plata. Estos resultados son indicativos que las partículas o moléculas con tamaños mayores a 0.2 micras dentro del extracto del nopal muestran propiedades reductoras, aunque no en la composición o cantidad adecuada para alcanzar una alta conversión de nanopartículas de plata.





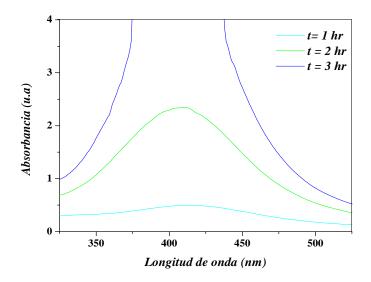
*Figura 4.11.*- Espectros de absorción UV-visible en función del tiempo, de la síntesis de nanopartículas de plata empleando la fracción No. 1 de 0.2 micrón.

### 4.5 Síntesis de nanopartículas de plata empleando la fracción del permeado de 3000 NMWC del extracto de nopal como agente reductor y SDS como agente estabilizante

La otra fracción que decidió evaluarse fue el permeado de la membrana de fibra hueca con límite de 3,000 NMWC, ya que fue la que exhibió una mayor conversión de nanopartículas de plata. La cinética se realizó de la misma forma descrita en la sección anterior.

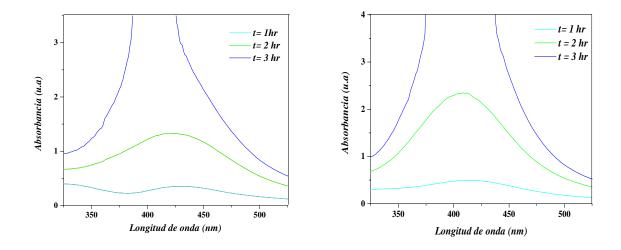
En la figura 4.12 se observa el curso de la cinética de reacción hasta un periodo de 5 horas.





*Figura 4.12.*- Espectros de absorción UV-visible en función del tiempo, de la síntesis de nanopartículas de plata empleando el permeado obtenido de la columna de 3,000 NMWC.

A partir de las 2 horas de reacción, los iones de plata alcanzan una alta conversión dando un valor de absorbancia de 2.5 unidades (Figura 4.12). Posterior a este tiempo de reacción se alcanza la saturación, donde ya no fue posible determinar la absorbancia de la muestra debido a una alta generación de nanopartículas de plata.



*Figura 4.13.*- Espectros de absorción UV-visible que muestran el comportamiento de la síntesis de nanopartículas de plata en función del tiempo empleando el extracto de nopal sin fraccionar a), y el permeado de 3000 NMWC b) como agentes de reducción.





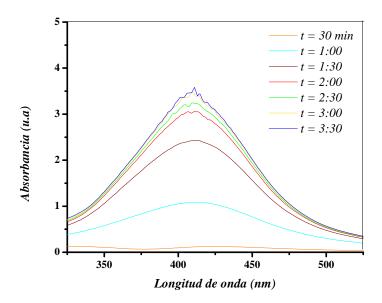
Al comparar la cinética de reacción con el extracto total de los cladodios de nopal y la fracción micro y ultrafiltrada de 3000 NMWC (Figura 4.13), podemos observar que al inicio de la reacción el uso del extracto entero presenta una absorbancia similar a la del uso del permeado de 3000 NMWC, pero después de dos horas de reacción, la reacción con el uso del permeado de 3000 NMWC obtiene una absorción mucho más intensa de 2.5 unidades. A pesar de que ambos sistemas de reacción se saturaron a las 3 horas de reacción, el sistema con el permeado de 3000 NMWC mostró una banda de absorción mucho más ancha. Los datos anteriores son indicativos de que el agente responsable o los agentes responsables de la formación de las nanopartículas de plata corresponden a moléculas con pesos moleculares menores o iguales a 3,000 Kg/mol, y que en base a los resultados por espectroscopia UV-vis, el uso de la fracción del permeado de 3000 NMWC como agente reductor permite obtener una mayor conversión de los iones de plata en menor tiempo que con el uso del extracto completo, aunque con una mayor distribución de tamaños de nanopartículas al final de la reacción.

De acuerdo a lo reportado en la literatura se puede inferir que los azúcares y fenoles presentes tanto en el extracto de nopal sin fraccionar, como en la fracción del permeado de 3000, estén actuando como reductores para la formación de nanopartículas de plata, debido a la presencia de grupos carboxilos e hidroxilo provenientes de ambas moléculas <sup>(56), (135)</sup>.

Para determinar como afecta el volumen de la reacción cuando se utilizó la fracción del permeado de 3000 NMWC en el comportamiento cinético de formación de nanopartículas de plata se decidió escalar la reacción a un volumen de un litro. El monitoreo de la reacción se llevó de la forma ya descrita.

En la figura 4.14 se muestran los espectros de absorción de la síntesis de nanopartículas de plata empleando el permeado de 3000 NMWC como agente reductor. El análisis de estos espectros muestra un comportamiento muy parecido para 80 mL y 1 L, sin embargo, cuando se utilizó un mayor volumen no hubo saturación y el pico de máxima absorbancia se estabilizó después de 3 horas de reacción, indicando la máxima capacidad catalítica de esta fracción, bajo estas condiciones de reacción. Es importante mencionar que en el escalamiento, la cantidad de catalizador utilizada fue proporcional al volumen utilizado.

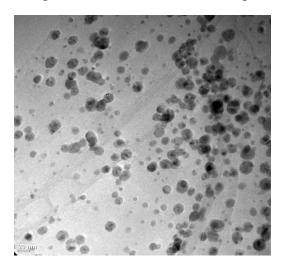


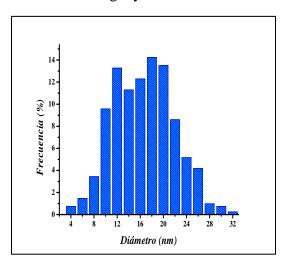


*Figura 4.14.*- Reacción de síntesis de nanopartículas de plata con el permeado 3,000 NMWC con un volumen de reacción de 1 litro.

## 4.5.1 Estudio por microscopia electrónica de transmisión TEM de las nanopartículas de plata obtenidas mediante el empleo del permeado 3000 NMWC como agente reductor

Las nanopartículas de plata empleando la fracción del permeado de 3000 NMWC del extracto de cladodio de nopal como agente reductor y el SDS como estabilizante, se caracterizaron a través de microscopia electrónica de transmisión, para determinar la morfología y tamaño de las mismas.



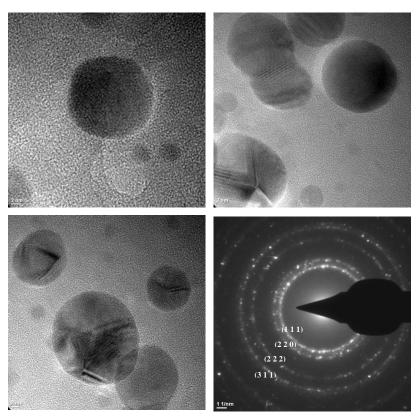


*Figura 4.15.*- Imagen TEM y distribución de tamaño de las nanopartículas de plata obtenidas empleando el permeado de 3000 NMWC y el SDS como estabilizante.



En la figura 4.15 se muestra una micrografía por TEM representativa de las nanopartículas de plata obtenidas con el permeado de 3000 NMWC de cladodios de nopal. Las nanopartículas presentaron una morfología predominantemente esférica con tamaños de partícula entre 4 y 30 nm. Asimismo con base en el análisis del histograma de distribución de tamaño de partícula (Figura 4.15, recuadro derecho) se pudo observar que la distribución de tamaños fue homogénea, predominando tamaños de partícula en el intervalo de 12 a 20 nm, y con un diámetro promedio de 17 nm.

En la figura 4.16 se muestra una micrografía TEM en su modalidad de alta resolución HR TEM, donde se muestran algunas de las nanopartículas de plata obtenidas mediante el empleo del permeado de 3000 NMWC. En estas micrografías se observan nanopartículas completamente aisladas, donde es posible observar los planos de crecimiento cristalinos. El patrón de difracción de las partículas se muestra en la imagen inferior derecha de la figura 4.16. Los patrones de difracción con distancias interplanares de 2.36 A°, 2.06 A°, 1.47 A°, 1.25 A°, son consistentes con las familias de planos (111), (200), (220) y (311) de la estructura cúbica centrada en la caras de la plata metálica (136).



*Figura 4.16.*- Imagen HR-TEM y patrón de difracción de las nanopartículas de plata obtenidas empleando el permeado de 3000 y el SDS como estabilizante.





El análisis comparativo de las nanopartículas de plata obtenidas empleando el extracto de nopal sin fraccionar y con la fracción del permeado de 3000 NMWC, permite apreciar que a pesar de que las nanopartículas obtenidas con el extracto de nopal sin fraccionar presentaron un menor tamaño, el uso del extracto de nopal completo promovió la formación de asociaciones en una matriz debido al gran porcentaje de pectina que contiene, como ya se discutió previamente, por lo que se optó por emplear únicamente la fracción del permeado de 3000 NMWC, para la obtención de las nanopartículas de plata que serían incorporadas en la matriz polimérica.

## 4.5.2 Caracterización por espectroscopia de absorción atómica de las nanopartículas de plata obtenidas empleando el permeado de 3000 NMWC como agente reductor y SDS como agente estabilizante

La solución de nanopartículas de plata obtenidas empleando la fracción del permeado 3000 como agente reductor y SDS como agente estabilizante se caracterizó mediante espectroscopia de absorción atómica para analizar el contenido de plata obtenido.

Se analizó 1 mL de solución de la reacción, registrando un valor de incorporación de 3.23 ppm de plata en las nanopartículas, este valor se multiplicó por el factor de dilución empleado, que para esta prueba fue de 250, dando como resultado una concentración de la solución de 880.3 µg de Ag/mL de solución.

## 4.6 Síntesis "in situ" de nanopartículas de plata empleando la fracción del permeado de 3000 NMWC como agente reductor y el PVA como estabilizante

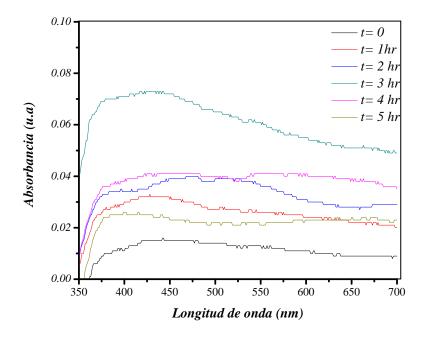
El uso del agente estabilizante además de evitar la aglomeración de las nanopartículas, desempeña un papel importante en el control del tamaño y forma de las nanopartículas. Debido a ello, se analizó la posibilidad de usar otro agente estabilizante que contribuyera en la disminución del tamaño de las nanopartículas y que además funcionara como soporte para la generación de las membranas poliméricas fibrosas preparadas mediante electrohilado.



Cómo se mencionó en la sección experimental, se decidió emplear el PVA, ya que además de que caracterizarse por ser un polímero hidrosoluble, biocompatible, no tóxico y de gran uso a nivel industrial, en algunos estudios se reporta su uso como un excelente agente estabilizante y reductor en la síntesis de nanopartículas de plata, obteniendo partículas con tamaños nanométricos  $^{(137)}$ . En la preparación de la solución se utilizó una mezcla de PVA de diferente peso molecular:  $M_w$ = 13,000- 23,000 g/mol (87-89% hidrolizado) y uno de alto peso molecular  $M_w$ = 126,000 g/mol (98-99% hidrolizado), evaluando previamente su efectividad como agente reductor para corroborar lo reportado en la literatura.

#### 4.6.1 Evaluación del PVA como agente reductor en la formación de nanopartículas de plata

Para evaluar la efectividad de la mezcla de PVA como agente reductor se llevó a cabo la síntesis de nanopartículas de plata empleando los mismos reactivos utilizados para la síntesis de nanopartículas con el extracto de nopal, a excepción del SDS y del extracto de nopal, los cuales actuaron como estabilizante y reductor respectivamente. En la figura 4.17 se presentan los espectros de absorción obtenidos durante la evaluación de la mezcla del PVA como agente reductor para la formación de nanopartículas de plata.



*Figura 4.17.-* Cinética de reacción monitoreada por espectroscopia de absorción UV-visible para evaluar el PVA como agente reductor en la síntesis de nanopartículas de plata.





Los espectros de absorbancia obtenidos son un tanto asimétricos y algunos presentan una intensidad muy baja en el intervalo de longitud de onda de 370-420 nm, en el cual absorben los plasmones superficiales de las nanopartículas de plata. En un tiempo de reacción de 3 horas se observa la formación de una banda ancha con una absorción máxima de 0.07 unidades a una longitud de 420 nm. Después de las 3 horas, la intensidad de absorbancia disminuye progresivamente conforme avanza la reacción hasta dejar de presentar un máximo. Pellegri y col. (138), reportaron éste comportamiento indicando que la formación de partículas inestables provoca la disminución en la intensidad de la absorbancia debido a que éstas se desintegran para formar agregados o partículas grandes con mayor estabilidad.

Analizando la intensidad y el ancho de la banda de absorción obtenida a las tres horas de reacción, se puede decir que la baja intensidad fue indicio de la obtención de una mínima concentración de nanopartículas de plata, con una amplia distribución de tamaños y formas de acuerdo al ancho de la banda.

En base a los resultados de espectroscopia UV-visible obtenidos de la evaluación de la mezcla de PVA como agente reductor en la síntesis de nanopartículas de plata, se pudo inferir que la mezcla de PVA mostró un mínimo efecto en la reducción de nanopartículas de plata, lo cual puede atribuirse a los diferentes pesos moleculares y grados de hidrólisis de PVA utilizados para la mezcla, ya que por una parte el grado de hidrólisis define la actividad superficial del PVA debido al porcentaje molar de unidades repetitivas con grupos hidroxilo dentro de la cadena, y por otro lado el peso molecular se relaciona con la viscosidad de la solución, lo que podría ocasionar una mala dispersión de los reactivos dentro de la solución.

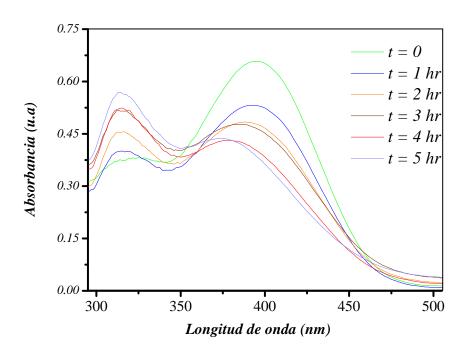
## 4.6.2 Estudio por espectroscopia de absorción UV-visible de las nanopartículas de plata obtenidas de la reacción "in situ" empleando el permeado 3000 NMWC como agente reductor y el PVA como estabilizante

Después de comprobar la efectividad de la mezcla del PVA como reductor, se corroboró que ésta no influiría en la acción reductora del extracto de nopal, por lo que se procedió a sintetizar las nanopartículas de plata empleando la fracción del permeado de 3000 NMWC como agente reductor y la mezcla de PVA como agente estabilizante, esta última preparada de acuerdo a lo indicado más arriba.





La cinética de la reacción fue monitoreada por espectroscopia de absorción UV-visible obteniendo los espectros de absorción que se muestran en la figura 4.18. Como se puede observar en la figura, al inicio de la reacción se observó la formación de un pico máximo de absorción a una longitud de onda de 400 nm, y otro pico a menor longitud de onda (320 nm). Este valor es reportado por Amany y col. (139), como resultado de la resonancia del plasmón superficial de las nanopartículas de plata con tamaños menores a 5 nm. Conforme avanza la reacción, el pico a una longitud de onda de 400 nm se desplaza a menores longitudes de onda y disminuye progresivamente su intensidad mientras que en el pico a 320 nm incrementa su intensidad hasta alcanzar una absorbancia mucho mayor a la del pico que al inicio presentaba mayor absorción. Pellegri y col. (138) atribuyen este comportamiento a una distribución bimodal de tamaños, y dado que al final de la reacción el pico que presenta la máxima absorción se encuentra hacia longitudes de onda menores, se puede esperar la formación de nanopartículas con tamaños de diámetro muy pequeños, así como también en menor concentración, que se deduce de la intensidad que presentaron los cambios de la relación entre los picos.

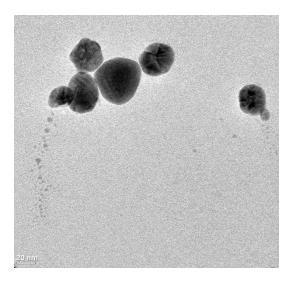


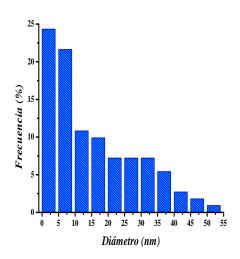
*Figura 4.18.*- Reacción de síntesis de nanopartículas de plata empleando el PVA (13-23 kg/mol y 126 kg/mol) como agente estabilizante y extracto de nopal como reductor.



# 4.6.3 Estudio por microscopia electrónica de transmisión de las nanopartículas de plata obtenidas de la reacción "in situ" empleando el permeado 3000 NMWC como agente reductor y el PVA como estabilizante

Las nanopartículas obtenidas de la reacción "in situ" se caracterizaron mediante microscopia electrónica de transmisión TEM, para analizar los efectos del PVA en el tamaño y morfología de las nanopartículas.

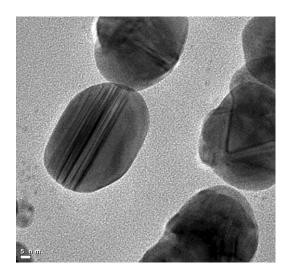


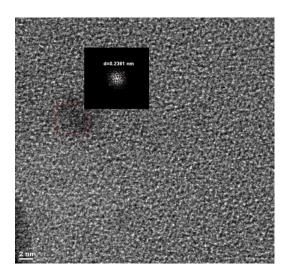


*Figura 4.19.*- Imagen TEM y distribución de tamaños de las nanopartículas obtenidas de la solución de la reacción "in situ" empleando el permeado 3000 NMWC como agente reductor y el PVA como estabilizante.

En la imagen de la figura 4.19 se presenta una micrografía por TEM de las nanopartículas de plata obtenidas mediante la reacción "in situ". En la micrografía se observa la formación de nanopartículas de plata con tamaños de diámetro superiores a los 20 nm y con morfología cuasi-esférica. En tanto que las partículas con tamaños de diámetro menores presentaron morfología predominantemente esférica. En el histograma de la misma figura revela que el diámetro de las nanopartículas de plata se concentra en un intervalo de tamaño de 2-5 nm, con una amplia distribución asimétrica que comprende un intervalo de tamaños desde 2 hasta 55 nm.







*Figura 4.20.-* Imagen HR-TEM y patrón de difracción de las nanopartículas de plata obtenidas de la solución de la reacción "in situ" empleando el permeado 3000 NMWC como agente reductor y el PVA como estabilizante..

En la figura 4.20 se observa una micrografía por TEM a alta resolución. En la imagen se puede apreciar los planos de crecimiento cristalinos de las partículas con morfología cuasi-esférica, así como la presencia de partículas con tamaños inferiores a los 5 nm con morfología esférica. La imagen de la derecha permite apreciar el patrón de difracción del área seleccionada de la nanopartícula, en donde la distancia interplanar corresponde al plano de crecimiento (111) de la estructura FCC de la plata.

En el análisis comparativo de las nanopartículas obtenidas empleando el SDS como agente estabilizante y las que se obtuvieron con el PVA, se puede determinar que mediante el uso del SDS es posible obtener nanopartículas con una distribución de tamaños más homogénea y con morfología esférica, y a pesar de que el uso del PVA genera una amplia distribución de tamaños y nanopartículas con morfología cuasi-esférica, permite la obtención de nanopartículas esféricas con tamaños más pequeños, lo que permite asegurar que un área superficial significativamente grande de las partículas este en contacto con las bacterias e incremente la eliminación de éstas (134).





# 4.6.4 Caracterización por espectroscopia de absorción atómica de las nanopartículas de plata obtenidas "in situ" empleando el permeado 3000 NMWC como agente reductor y el PVA como estabilizante

La solución de nanopartículas de plata obtenidas empleando la fracción del permeado de 3000 NMWC como agente reductor y la mezcla de PVA como agente estabilizante se caracterizó mediante espectroscopia de absorción atómica para analizar el contenido de plata incorporado a las nanopartículas de plata.

Se analizó 1 mL de solución de la reacción, la cual registró un valor de incorporación de 2.37 ppm de plata en las nanopartículas, este valor se multiplicó por un factor de dilución de 50, dando como resultado una concentración de la solución de 118.3 µg de Ag/mL de solución.

### 4.7 Preparación de nanofibras mediante electrohilado

Para la obtención de nanofibras mediante la técnica de electrohilado se realizaron tres diferentes métodos de preparación de la solución polimérica:

- 1.- Mezclado de la solución de nanopartículas de plata con la mezcla de PVA.
- 2.- Empleo de la solución de la reacción "in situ" de nanopartículas de plata.
- 3.- Empleo de la solución de la reacción "in situ" de nanopartículas de plata y adición de quitosán.

El proceso de electrohilado se realizó considerando algunos parámetros reportados en la literatura, con los cuales se obtuvieron nanofibras uniformes y con una buena distribución de tamaños.

#### 4.7.1 Mezclado de la solución de nanopartículas de plata con la mezcla de PVA

Para el primer método de preparación de la solución polimérica se emplearon las nanopartículas de plata obtenidas de la fracción del extracto del permeado de 3000 NMWC usada como agente reductor y el SDS como estabilizante. Se prepararon varias mezclas con diferentes concentraciones de nanopartículas de plata para proceder a su electrohilado y obtener membranas poliméricas fibrosas.

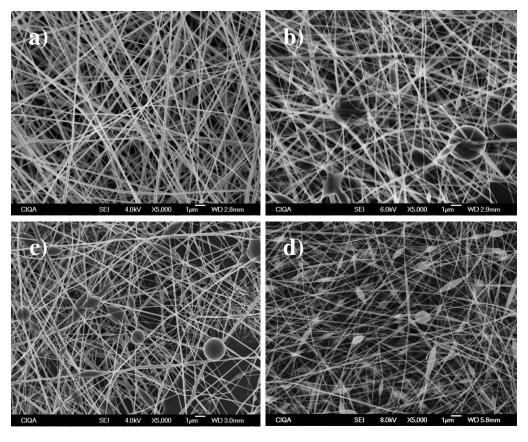




### 4.7.1.1 Caracterización de las nanofibras mediante microscopia electrónica de barrido SEM y microscopia electrónica de transmisión TEM

Las membranas poliméricas fibrosas obtenidas al emplear la mezcla de las nanopartículas de plata con la solución de PVA se caracterizaron mediante SEM para analizar la morfología, tamaño de diámetro y disposición de las nanofibras en el colector, y mediante TEM para analizar la dispersión de las nanopartículas dentro de las nanofibras.

En la figura 4.21 se presenta una serie de micrografías por SEM obtenidas a una resolución de 5,000 X. La primera imagen corresponde a una muestra de nanofibras obtenidas únicamente de la mezcla de PVA, la segunda de una muestra de PVA con una concentración de 20 ppm de nanopartículas de plata, la tercera con 60 ppm y la última con 100 ppm. Analizando cada una de las imágenes se observa la presencia de defectos tipo gotas en las nanofibras, las cuales se incrementaron al aumentar la concentración de nanopartículas de plata.



*Figura 4.21.-* Imagen SEM 5000 X nanofibras de a) PVA, b) PVA + 20 ppm AgNPs, c) PVA + 60 ppm AgNPs, d) PVA + 100 ppm AgNPs. Condiciones electrohilado 20 kV, 0.3 mL/h, d= 10 cm, posición de la aguja: vertical.





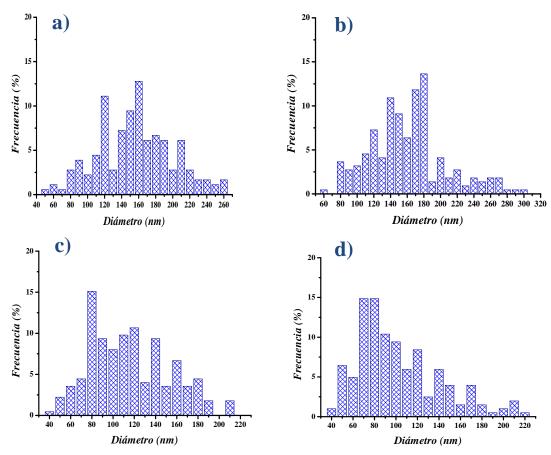
En los histogramas de distribución de tamaño (Figura 4.22) se puede observar que la distribución más homogénea se obtuvo con la mezcla de PVA sin la adición de nanopartículas de plata. El análisis de las distribuciones de tamaño de las fibras indica que el tamaño de diámetro de las fibras disminuye conforme se incrementa la concentración de nanopartículas de plata (Tabla 4.7).

Analizando los resultados anteriores, se puede decir que el tamaño y la presencia de defectos en las fibras dependen considerablemente de la concentración de nanopartículas de plata en la solución polimérica. Kim y colaboradores (140), reportaron que el aumento de concentración de nanopartículas de plata origina un incremento en la conductividad de la solución polimérica debido al aumento de las fuerzas de repulsión entre las cargas positivas que las nanopartículas poseen en su superficie. Este aumento de conductividad genera un mayor estiramiento del chorro de la solución que provoca una disminución en el diámetro de las fibras. Sin embargo, se observó que al llegar a una determinada concentración de nanopartículas de plata, el diámetro de las fibras incrementa nuevamente, debido a que a una alta concentración de nanopartículas se comienzan a formar agregados de nanopartículas durante el proceso de electrohilado, provocando que el chorro se debilite y se obtengan fibras de un mayor tamaño.

*Tabla 4.7.-* Análisis de los tamaños de diámetros obtenidos al incrementar la concentración de nanopartículas en las nanofibras.

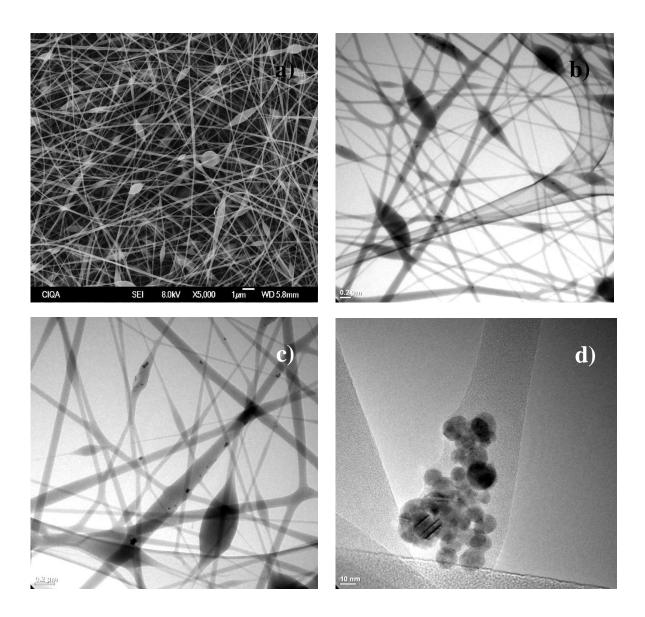
Membrana polimérica	Diámetro promedio	Intervalo de diámetro
PVA	168 nm	que predomina 150-160 nm
PVA + 20 ppm AgNPs	171 nm	170-180 nm
PVA + 60 ppm AgNPs	123 nm	80-90 nm
PVA + 100 ppm AgNPs	109 nm	70-80 nm





*Figura 4.22.*- Histograma de la distribución de tamaños en las nanofibras de a) PVA, b) PVA + 20 ppm AgNPs, c) PVA + 60 ppm AgNPs, d) PVA + 100 ppm AgNPs. Condiciones electrohilado 20 kV, 0.3 mL/h, d= 10 cm, posición de la aguja: vertical.





*Figura 4.23.*- Imagen por a) SEM y b) TEM de las nanofibras de PVA con 100 ppm AgNPs. Condiciones electrohilado 20 kV, 0.3 mL/h, d= 10 cm, posición de la aguja: vertical.

La presencia de defectos en las fibras hizo suponer que las nanopartículas de plata se encontraban aglomeradas dentro de estos defectos, por lo que se decidió realizar un análisis mediante microscopia electrónica de transmisión y determinar si las nanopartículas de plata se encontraban dispersas en la fibra o aglomeradas.

En la figura 4.23 se muestra una micrografía por TEM de las nanofibras obtenidas después de mezclar 100 ppm de nanopartículas de plata con la mezcla de PVA. En esta micrografía es posible



observar que las nanopartículas de plata están distribuidas en las fibras, pero pobremente dispersas. Y aunque se observa la formación de aglomerados de nanopartículas, estos se presentan a lo largo de las fibras, por lo que se descarta que la presencia de defectos sea consecuencia de aglomerados de nanopartículas dentro de estos.

Durante el proceso de electrohilado se observó una coloración café oscuro en el centro de la membrana, la cual se atribuyó a la presencia de una alta concentración de nanopartículas. La suposición que se tenía fue que debido a la posición vertical de la aguja y el colector, durante el transcurso de la solución polimérica desde la jeringa en posición horizontal hasta la punta de la aguja, en la curvatura de la manguera quedaban adheridas nanopartículas, las cuales eran empujadas por el flujo de la solución después de un cierto tiempo depositándose sobre la membrana.

Debido a lo anterior, se decidió cambiar la posición del colector, colocándolo de manera horizontal, y analizar si tenía algún efecto en la morfología y distribución de las nanofibras a lo largo de la membrana. Para evaluar este factor en la preparación de las membranas de nanofibras, se colocó el colector de manera horizontal y suspendido en el aire con la ayuda de un soporte. Después de ello se procedió a realizar las membranas con el mismo procedimiento para posteriormente caracterizarlas.

Al obtener las membranas con el cambio de posición de la aguja y el colector, ya no se presentó un cambio de coloración en la membrana, lo cual comprobaba de alguna forma esta hipótesis. En la figura 4.24 se muestra el aspecto de las membranas después de finalizar su proceso de electrohilado, presentando una coloración blanca y concentrándose en la parte central del colector de aluminio.



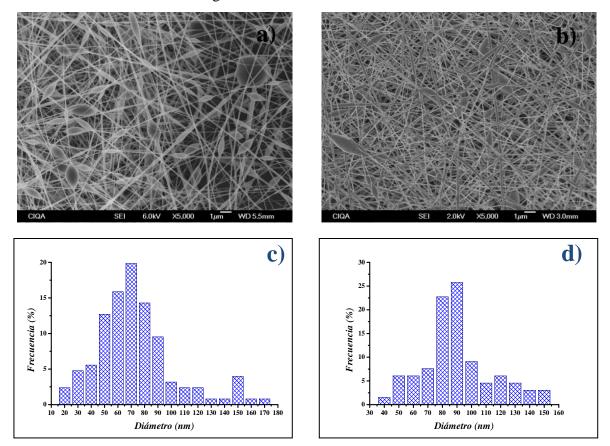


*Figura 4.24.-* Membranas de nanofibras depositadas en el colector de aluminio, a) PVA y b) PVA con nanopartículas de plata incorporadas.



En la figura 4.25 se presenta una muestra de las membranas caracterizada por microscopia electrónica de barrido SEM. Analizando las muestras en posición vertical y horizontal se observó que la muestra en posición vertical presentaba una ligera concentración de nanofibras y mayor cantidad de defectos, mientras que la membrana obtenida en posición horizontal se encontraba saturada de nanofibras pero aparentemente con menor número de defectos. El análisis de los histogramas de distribución de tamaños de las nanofibras indica que no hubo una considerable variación con respecto al diámetro promedio de las nanofibras, ya que en la posición vertical predominaron nanofibras con tamaños de 70 nm, en tanto que para la posición horizontal se obtuvo un diámetro promedio de 90 nm. Sin embargo, en la posición horizontal la distribución de tamaños fue más homogénea y más estrecha que en la posición vertical.

Con base en los resultados anteriores se determinó modificar la posición de la aguja y el colector de manera horizontal, ya que esto permite la obtención de nanofibras más uniformes y con una distribución de tamaño más homogénea.



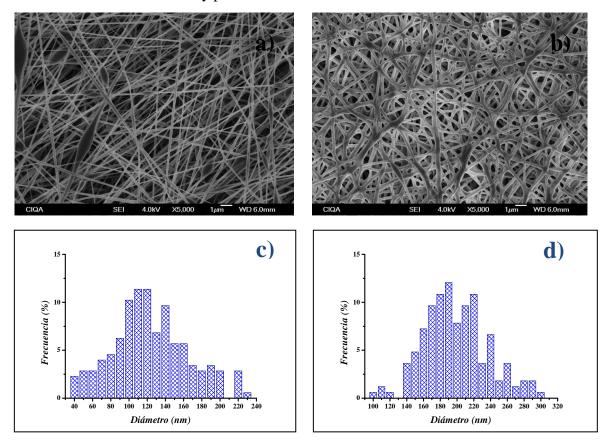
*Figura 4.25.-* Imagen SEM de las nanofibras posición a) vertical y b) horizontal, y distribución de tamaños de las nanofibras en posición vertical c), y posición horizontal d). Condiciones electrohilado 20 kV, 0.3 mL/h, d= 10 cm.



Después de haber analizado el cambio en la posición del colector, se decidió evaluar el comportamiento de las fibras al variar la distancia entre el colector y la aguja, por lo que se prepararon membranas de la mezcla de nanopartículas de plata con PVA, aumentando la distancia entre el colector y la aguja a 15 cm.

Las membranas obtenidas se caracterizaron mediante microscopia electrónica de barrido (SEM), para evaluar el efecto del aumento en la distancia en la morfología y tamaño de las nanofibras.

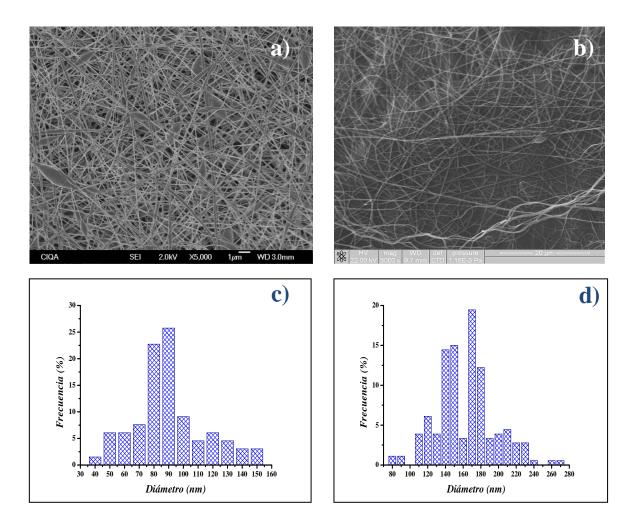
En la imagen 4.26 se presenta una micrografía SEM de una membrana obtenida de una mezcla de PVA con una concentración de 60 ppm de nanopartículas de plata. Se observó que a una distancia de 10 cm, las fibras se acomodaron de una forma lineal a lo largo del colector presentando algunos defectos en las fibras, mientras que al aumentar la distancia, las fibras parecen acomodarse de manera ondulada y presentando ciertos pliegues entre ellas. En relación al tamaño, se observó un incremento del diámetro de aproximadamente el doble, ya que el tamaño promedio para una distancia de 10 cm fue de 130 nm y para 15 cm fue de 204 nm.



*Figura 4.26.*- Imagen SEM de las nanofibras obtenidas de PVA+ 60ppm AgNPs, a diferente distancia entre el colector y la aguja, a) d= 10 cm y b) d= 15 cm. Distribución de tamaños de las nanofibras a c) d= 10 cm y d) d= 15 cm. Condiciones electrohilado 20 kV, 0.3 mL/h, en posición horizontal.



Se analizó una imagen con una concentración mayor de nanopartículas. En la imagen 4.27 se presenta una micrografía SEM de la membrana obtenida de una mezcla de PVA con una concentración de 100 ppm de nanopartículas de plata. A una distancia menor se observó un acomodo lineal de las fibras presentando defecto, pero al aumentar la distancia, las fibras se acomodaron de manera ondulada. En relación al tamaño, se observó un doble incremento del diámetro, ya que el tamaño promedio para una distancia de 10 cm fue de 90 nm y para 15 cm fue de 178 nm. Esto corrobora nuevamente que al aumentar la concentración de nanopartículas de plata resulta en una disminución en el diámetro de las nanofibras.



*Figura 4.27.*- Imagen SEM de las nanofibras obtenidas de PVA+ 100ppm AgNPs, a diferente distancia entre el colector y la aguja, a) d= 10 cm y b) d= 15 cm. Distribución de tamaños de las nanofibras a c) d= 10 cm y d) d= 15 cm. Condiciones electrohilado 20 kV, 0.3 mL/h, en posición horizontal.





De acuerdo a la literatura se ha reportado que el aumento de la distancia entre el colector y la aguja da como resultado una disminución en los diámetros de las fibras debido a que hay un mayor tiempo de vuelo que permite la completa evaporación del solvente. Sin embargo, también se han reportado comportamientos similares a estos, que se atribuyen a la disminución de la intensidad del campo eléctrico, provocando menor estiramiento en las fibras, ya que típicamente la fuerza del campo eléctrico requerido para iniciar el electrohilado es entre 0.5 y 1.5 kV/cm (141), (142)

Con base en los resultados anteriores, se determinó que para que la concentración de la solución polimérica y la distancia entre el colector y la aguja no influyan de manera importante en el tamaño del diámetro, se debe compensar el incremento de la concentración de la solución polimérica con un aumento de la distancia entre el colector y la aguja.

### 4.7.2 Empleo de la solución de la reacción "in situ" de nanopartículas de plata y su posterior electrohilado

Para el segundo método de preparación de la solución polimérica se empleó la solución de la reacción "in situ" de las nanopartículas de plata obtenidas de la fracción del extracto del permeado de 3000 NMWC usada como agente reductor y el PVA como agente estabilizante. El PVA que se encontraba dentro de la solución de nanopartículas, además de funcionar como agente estabilizante, sirvió como medio de soporte para la obtención de las nanofibras. Dado que en este caso la concentración de nanopartículas ya estaba establecida, se decidió diluir la solución de la reacción con PVA y así obtener muestras con diferentes concentraciones de nanopartículas.

El electrohilado de las fibras se realizó con los parámetros modificados durante la preparación de las fibras mediante el mezclado del PVA con la solución de nanopartículas, el colector y la aguja se colocaron de manera horizontal y con una distancia de separación de 15 cm.

### 4.7.2.1 Caracterización de las nanofibras de microscopia electrónica de barrido SEM y microscopia electrónica de transmisión TEM

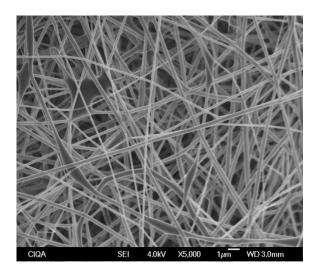
Las nanofibras se caracterizaron por SEM para evaluar la morfología y tamaño de las fibras, y mediante TEM para observar la dispersión de nanopartículas dentro de las fibras.

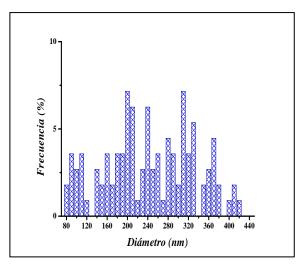




En la figura 4.28 se observa una micrografía por SEM de las nanofibras obtenidas al emplear la solución de la reacción "in situ" con una concentración de 120 ppm de nanopartículas de plata. La disposición de las fibras a lo largo del colector es predominantemente lineal presentando algunas ondulaciones. La morfología de las fibras es aparentemente uniforme, aunque se presentan ciertos defectos donde se despliegan las fibras, tipo ramificaciones, las cuales probablemente se originaron por contaminantes de la reacción.

En relación a la distribución de tamaños, el diámetro de las fibras se localiza en un amplio intervalo, que comprende tamaños desde 80-400 nm, con un diámetro promedio de 250 nm. Este comportamiento podría atribuirse al aspecto altamente viscoso de la solución polimérica.



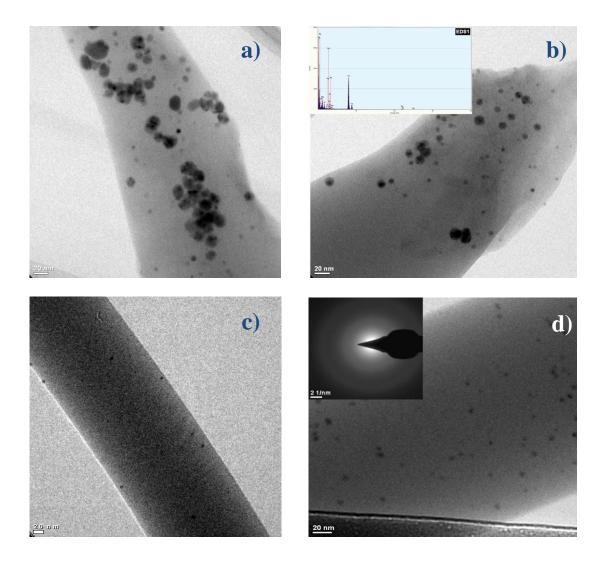


*Figura 4.28.-* Imagen SEM y distribución de tamaño de las nanofibras obtenidas de la reacción "in situ" con 120ppm AgNPs. Condiciones electrohilado 20 kV, 0.3 mL/h, d= 15 cm en posición horizontal.

La dispersión de las nanopartículas en las fibras se analizó mediante TEM (Figura 4.29). En la figura se puede observar una micrografía TEM de las nanopartículas embebidas en la fibra de PVA, se puede apreciar la formación de ciertos aglomerados de nanopartículas de diámetros mayores a 20 nm, así como también nanopartículas de diámetros muy pequeños dispersas en la fibra. En la imagen contigua se realizó un análisis de energía dispersiva de rayos X (EDS) para determinar la presencia de la plata en las nanofibras. Con base a este análisis, se puede determinar una elevada composición de carbono derivado del polímero y materia orgánica del extracto, y una baja composición de plata.



En la figura 4.29 se observan nanopartículas muy pequeñas que se encuentran completamente dispersas a lo largo de la fibra, a partir de esta imagen se obtuvieron los patrones de difracción de esa zona. Los anillos de difracción se observan algo difusos, posiblemente debido a la interferencia del polímero que envuelve a las nanopartículas, pero al realizar un contraste en la imagen es posible apreciar anillos definidos indicando la presencia de un material cristalino, que en si corresponde a la plata cristalina.

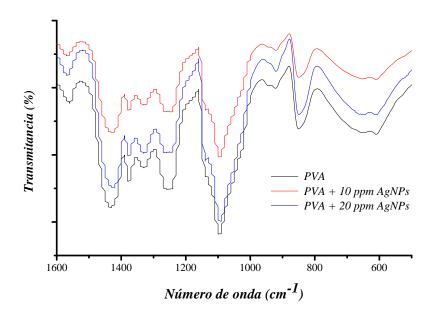


*Figura 4.29.*- Imagen TEM de las nanofibras de la reacción "in situ" con 120 ppm AgNPs, a) nanopartículas embebidas en las nanofibras, b) análisis EDS, c) nanofibra con AgNPs y d) patrón de difracción. Condiciones electrohilado 20 kV, 0.3 mL/h, d= 15 cm, posición de la aguja: horizontal.



### 4.7.2.2 Estudio de las nanofibras obtenidas mediante Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

Para analizar la interacción de las nanopartículas con la matriz polimérica de PVA, se caracterizaron las membranas con diferente concentración mediante espectroscopia infrarroja.

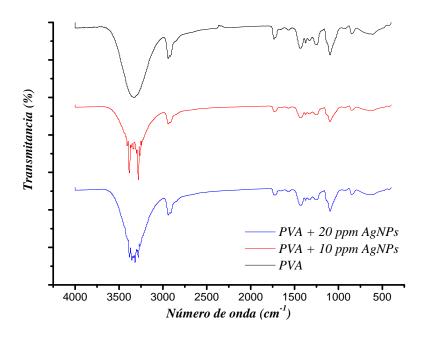


*Figura 4.30.*- Espectro FTIR de las membranas obtenidas empleando la solución de reacción "in situ" de las nanopartículas de plata empleando el PVA como agente estabilizante.

En la figura 4.30 se observa el espectro FTIR de las membranas obtenidas de la reacción "in situ" con diferente concentración de nanopartículas de plata. Se observa que al incrementar la concentración de nanopartículas de plata disminuye la banda a 650 cm<sup>-1</sup> asociada a las flexiones fuera del plano de los grupos O-H, así como la banda a 837 cm<sup>-1</sup>, la cual corresponde a flexiones fuera del plano de los grupos C-H. La disminución de estas bandas podría sugerir la interacción de las nanopartículas de plata con los grupos O-H del PVA (143).

Por otra parte se ha reportado que la banda de 1420 cm<sup>-1</sup> resulta del acoplamiento de las flexiones O-H dentro del plano con las flexiones C-H. La disminución de la intensidad podría indicar el desacoplamiento entre las flexiones O-H y C-H debido a la interacción entre las nanopartículas de plata y los grupos O-H del PVA <sup>(143)</sup>.





*Figura 4.31.*- Espectro FTIR de las membranas obtenidas empleando la solución de reacción "in situ" de las nanopartículas de plata empleando el PVA como agente estabilizante.

En la región del espectro FTIR de 400-3400 cm<sup>-1</sup> (Figura 4.31), se observa la banda de 3400 cm<sup>-1</sup>, la cual corresponde a los estiramientos de los grupos O-H del PVA, la cual disminuye conforme se incrementa la concentración de nanopartículas de plata, esto podría indicar que hay una interacción de las nanopartículas de plata con los grupos O-H del PVA.

# 4.7.3 Empleo de la solución de la reacción "in situ" de nanopartículas de plata y la adición de quitosán

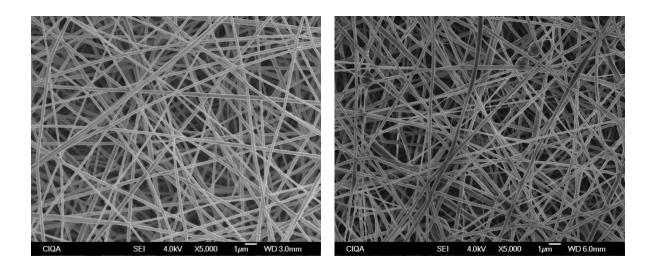
Para el tercer método de preparación de la solución polimérica además de emplear la solución de la reacción "in situ" de las nanopartículas de plata obtenidas de la fracción del extracto del permeado de 3000 NMWC usada como agente reductor y el PVA como agente estabilizante, se adicionó un determinado porcentaje de quitosán de bajo peso molecular 3000 Kg/mol. La razón de ello fue debido a que se ha reportado en la literatura el uso del quitosán como agente antibacteriano, el cual podría incrementar la actividad antimicrobiana de las membranas





poliméricas fibrosas cargadas con nanopartículas de plata <sup>(144)</sup>, así como desempeñaría un papel más importante en el campo biomédico.

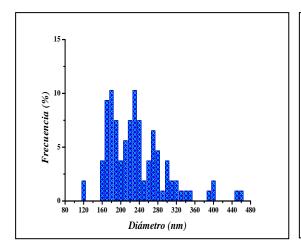
Las muestras preparadas se agitaron y electrohilaron a las mismas condiciones empleadas para la elaboración de las membranas anteriores, y se caracterizaron mediante SEM para evaluar el efecto en la morfología, tamaño y distribución de las fibras.

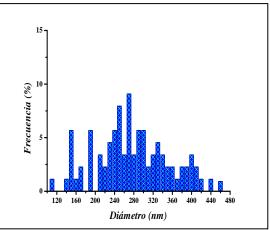


*Figura 4.32.*- Imagen SEM de las nanofibras de PVA con a) 1% Quitosán y b) 1% Quitosán + 20 ppm AgNPs obtenidas de la reacción "in situ" empleando el permeado 3000 NMWC como agente reductor y PVA como estabilizante.

En la figura 4.32 se muestra una micrografía por SEM de las nanofibras con 1% quitosán. En esta micrografía se puede observar una morfología uniforme en las fibras y un acomodo lineal en el cual las fibras parecen acomodarse paralelamente. La imagen contigua corresponde a las nanofibras con 1% quitosán y 20 ppm de nanopartículas de plata. Al fondo de la imagen se observa el mismo comportamiento que presentaron las fibras con 1% quitosán, acomodándose linealmente, pero hacia la parte frontal de la imagen las fibras parecen acomodarse de manera ondulada y presentando algunos defectos.







*Figura 4.33.*- Histograma de distribución de tamaño de las nanofibras de PVA con a) 1% Quitosán y b) 1% Quitosán + 20 ppm AgNPs obtenidas de la reacción "in situ" empleando el permeado 3000 NMWC como agente reductor y PVA como estabilizante.

En la distribución del tamaño de las nanofibras (Figura 4.33), se observa que la adición de nanopartículas en las membranas origina un aumento en el diámetro de las mismas. Por otra parte, la adición de quitosán en las membranas provoca una distribución bimodal presentando dos picos principales en los intervalos de 170-180 nm y 220-230 nm. La distribución en las membranas con quitosán es un poco más homogénea presentando solo un pico principal en el intervalo de 270-280 nm. El tamaño promedio de las fibras únicamente con quitosán fue de 240 nm, en tanto que la adición de quitosán y nanopartículas generó un aumento del tamaño hasta los 280 nm.

Por lo tanto se puede determinar que la adición de quitosán en las membranas influye en el aumento de tamaño de las fibras debido a un incremento en el peso molecular de la solución polimérica, lo que conlleva a un aumento en la viscosidad de la solución. Al aumentar la viscosidad se reduce el estiramiento del chorro de la solución polimérica, provocando un aumento en el tamaño de diámetro de las fibras (77).

#### 4.8 Entrecruzamiento de las membranas de nanofibras

Cómo se sabe el PVA es un polímero altamente soluble en agua, por lo que para evitar que las membranas se disolvieran al estar en contacto con un medio líquido, fue necesario entrecruzarlas. Las membranas se sumergieron en un baño de metanol, adheridas al colector de aluminio. En el



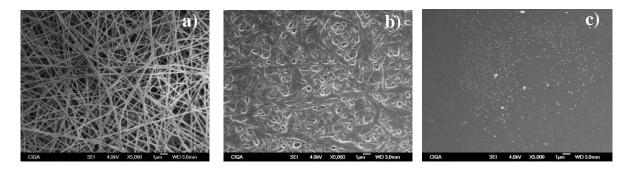


proceso de entrecruzamiento la interacción de los grupos hidroxilo (OH) del metanol desplazan las moléculas del agua ubicadas entre las fibras, dejando espacios vacíos entre las membranas al momento de secarlas, originando un entrecruzamiento físico por acercamiento de las cadenas poliméricas formando puentes inter e intramoleculares entre ellas <sup>(145)</sup>.

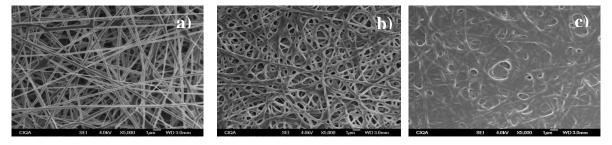
Después de haber entrecruzado las membranas, se sumergieron en agua durante 12 horas para comprobar que no se disolvieran.

Las membranas entrecruzadas se caracterizaron mediante microscopia electrónica de barrido (SEM) para ver el resultado de las fibras antes y después de entrecruzarlas, así como después de sumergirlas en agua. En la imagen 4.34-4.37 se presentan las morfologías de las fibras antes de entrecruzar, después de entrecruzar y después de sumergirlas en agua durante 12 horas.

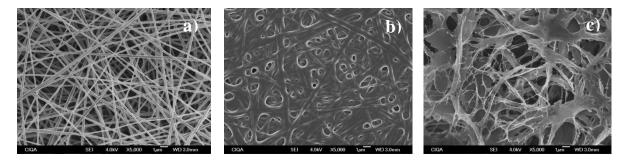




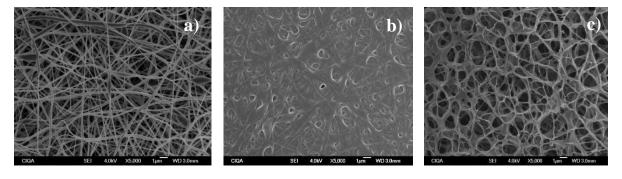
*Figura 4.34.*- Análisis de la membrana de PVA, a) antes de entrecruzar, b) entrecruzada con CH<sub>3</sub>OH y c) después de sumergir en agua por 12 horas.



*Figura 4.35.*- Análisis de la membrana de PVA + 100 ppm AgNPs reacción "in situ", a) antes de entrecruzar, b) entrecruzada con CH<sub>3</sub>OH y c) después de sumergir en agua por 12 horas.



*Figura 4.36.*- Análisis de la membrana de PVA + 1% Quitosán, a) antes de entrecruzar, b) entrecruzada con CH<sub>3</sub>OH y c) después de sumergir en agua por 12 horas.



*Figura 4.37.*- Análisis de la membrana de PVA + 100 ppm AgNPs reacción "in situ" + 1% Quitosán, a) antes de entrecruzar, b) entrecruzada con CH<sub>3</sub>OH y c) después de sumergir en agua por 12 horas.





En las figuras 4.34-4.37 se puede apreciar que el tratamiento de entrecruzamiento de las nanofibras origina que estas sufran hinchamiento y por ende incrementen en su diámetro. Aunque después de sumergirlas en un baño de agua durante 12 horas, las fibras adquieren nuevamente la estructura fibrosa, excepto en la membrana de PVA (Figura 4.34), en la cual desaparecen las fibras quedando una película con defectos. En la literatura se sugiere que el tratamiento con metanol sirve para incrementar el grado de cristalinidad y por lo tanto el número de entrecruzamiento físico en la fibras de PVA. Esto ocurre mediante la eliminación del agua residual entre las fibras por el alcohol permitiendo que los puentes de hidrógeno entre el PVA y el agua sean remplazados por enlaces de hidrógeno intermoleculares entre el PVA (145).

De acuerdo a los resultados anteriores, se puede considerar el uso del metanol como un buen entrecruzante para las membranas que contienen una determinada concentración de nanopartículas de plata y quitosán, ya que permite que las membranas mantengan su estructura fibrosa aún después de sumergirlas por un tiempo prolongado en agua, en tanto que para las membranas que contienen únicamente PVA, no se consideraría adecuado ya que provoca un excesivo hinchamiento de las nanofibras convirtiendo la membrana en una película que pierde completamente su estructura fibrosa.

#### 4.9 Evaluación antimicrobiana de las membranas obtenidas por electrohilado

Se realizó la evaluación antimicrobiana de cada una de las membranas obtenidas mediante la técnica de electrohilado. La evaluación antimicrobiana se realizó siguiendo el procedimiento descrito en la Norma industrial Japonesa Estándar Z2801 y utilizando las cepas de bacterias de *Escherichia coli* ATCC-25922, *Staphylococcus aureus* ATCC-29213, *Pseudomona aureoginosa* ATCC-27853 y los hongos *Aspergillus niger* ATCC 9642 y *Candida Albicans*.

# 4.9.1 Evaluación antimicrobiana de las membranas obtenidas mediante el mezclado de la solución de nanopartículas de plata con la mezcla de PVA

Para llevar a cabo la evaluación de la actividad antimicrobiana, se prepararon membranas a partir de la mezcla de PVA con diferentes concentraciones de nanopartículas de plata obtenidas de la reacción del permeado de 3000 NMWC del extracto de nopal como reductor. Cada uno de los materiales obtenidos se expuso a los microorganismos de prueba.



### 4.9.1.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana durante la exposición con la bacteria Escherichia coli ATCC-25922

La evaluación de la actividad antimicrobiana frente a la *Escherichia coli* ATCC-25922, se llevó a cabo mediante la exposición de membranas de nanofibras obtenidas a partir de una solución polimérica de PVA con una concentración de nanopartículas de plata desde 60 hasta 300 ppm.

*Tabla 4.8.*- Comportamiento de la actividad antimicrobiana de membranas de nanofibras conteniendo nanopartículas de plata expuestas a la bacteria *Escherichia coli* ATCC-25922.

Muestra	T <sub>0</sub> (UFC/mL)	T <sub>24</sub> (UFC/mL)	Actividad antimicrobiana (%)	Inhibición (%)
PVA	29,889	34,133,333	0	0
PVA+ 60 ppm Ag NPs	29,889	2,450,200	1.14	92.82
PVA+ 120 ppm Ag NPs	29,889	307,200	2.05	99.10
PVA+ 180 ppm Ag NPs	29,889	7,287	3.67	99.97
PVA+240 ppm Ag NPs	29,889	105	5.51	99.99
PVA+300 ppm AgNPs	29,889	9	6.56	99.99

En la tabla 4.8 se presentan los resultados obtenidos de la evaluación de la actividad antimicrobiana de las membranas obtenidas mediante mezclado de PVA con nanopartículas de plata. De acuerdo a la norma, se considera aceptable un valor de actividad antimicrobiana mayor del 2%, por lo que se podría establecer que a partir de una concentración de 120 ppm de nanopartículas de plata presentes en la solución de PVA permite la preparación de membranas de nanofibras que muestran una inhibición y reducción significativa del 99% la población de *E.coli* en relación a la población registrada para la membrana de PVA sin nanopartículas de plata, después de un periodo de exposición de 24 horas. En el caso de la membrana de PVA sin nanopartículas la población microbiana se ve incrementada en gran medida al final del periodo de



exposición de 24 horas. También es posible visualizar en la tabla que se presenta una mayor reducción de la población bacteriana a medida que se incrementa la concentración de nanopartículas de plata en la membrana de nanofibras en el intervalo de 120 a 300 ppm. En el sentido estricto de evaluación de la actividad antimicrobiana se puede considerar una completa inhibición de bacterias, con las membranas preparadas con una concentración de 300 ppm de nanopartículas de plata, ya que la reducción de la población microbiana de este material con respecto a lo registrado con el material ausente de nanopartículas, representa un material con actividad antimicrobiana con un 99.9 % de inhibición de la bacteria *Escherichia coli*.

El mecanismo de acción de las nanopartículas de plata ha sido recientemente estudiado, reportando que las nanopartículas unidas a la membrana celular de las bacterias provocan modificaciones en la permeabilidad y en la respiración de la bacteria, así también es posible que estas penetren en el interior de la bacteria y dañen compuestos como el ADN <sup>(130)</sup>, lo cual conlleva a la inhibición de la bacteria.

### 4.9.1.2 Evaluación contra Staphylococcus aureus ATCC-29213

Los resultados de actividad antimicrobiana con la bacteria *E.coli* sirvieron de muestra para evaluar membranas con las mismas concentraciones de nanopartículas de plata y su exposición frente a la cepa de *Staphylococcus aureus*.

*Tabla 4.9.-* Comportamiento de la actividad antimicrobiana de membranas de nanofibras conteniendo nanopartículas de plata expuestas a la bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC-29213.

Muestra	$T_0$ (UFC/mL)	T <sub>24</sub> (UFC/mL)	Actividad antimicrobiana (%)	Inhibición (%)
PVA	33,839	116,877,778	0	0
PVA+ 60 ppm Ag NPs	33,839	140,400,000	-0.08	0
PVA+ 120 ppm Ag NPs	33,839	41,733,604	0.45	64.29
PVA+ 180 ppm Ag NPs	33,839	112,985	3.01	99.90



PVA+240 ppm Ag NPs	33,839	43,458,486	0.43	62.82
PVA+300 ppm AgNPs	33,839	6,919,573	1.23	94.08

En la tabla 4.9 se muestran los resultados de evaluación de actividad antimicrobiana de las membranas obtenidas mediante mezclado de PVA con nanopartículas de plata expuestas a la bacteria de Staphylococcus aureus. En este caso se observó que únicamente la membrana con una concentración de 180 ppm de nanopartículas de plata en la solución de PVA presentó un valor de actividad antimicrobiana mayor al 2%, mostrando una inhibición y reducción significativa del 99% de la población de la bacteria de Staphylococcus aureus respecto a población registrada para las membranas de PVA sin nanopartículas después de una exposición de 24 horas. Sin embargo, se observó que en las membranas con una concentración mayor a 180 ppm, continuó presentándose un elevado crecimiento de la población bacteriana, logrando una inhibición tan solo del 94%, lo que indica que las nanopartículas de plata presentan un mayor efecto antimicrobiano de al estar expuestas con la bacteria de E.coli que con la bacteria de Staphylococcus aureus. Este mismo comportamiento se ha reportado por Shrivastava y col. (146), quienes asumen que las diferencias entre las bacterias gram-positiva y gram-negativa reside en la estructura de sus paredes celulares, en donde interactúan las nanopartículas de plata. Las bacterias del tipo gram-negativa como la E.coli, poseen una capa exterior de lipopolisacáridos que carece de resistencia y rigidez, en donde las cargas negativas de los lipopolisacáridos son atraídas hacia las cargas débiles disponibles sobre las nanopartículas de plata. Por otro lado la pared celular de las bacterias del tipo gram-positiva como el Staphylococcus aureus, están compuestas de una capa de peptidoglicano de mayor espesor 20-80 nm, la cual consta de cadenas de polisacáridos lineales que están entrecruzadas con péptidos cortos, proporcionando una mayor rigidez que disminuye el sitio de anclaje de las nanopartículas de plata, lo que dificulta que éstas penetren sobre la pared celular (147). Por esta razón se puede decir que las nanopartículas de plata presentaron un menor efecto bactericida contra el Staphylococcus aureus en comparación con la bacteria de E. coli.



### 4.9.2 Evaluación antimicrobiana de las membranas obtenidas mediante el empleo de la solución de la reacción "in situ" de nanopartículas de plata

Se prepararon membranas de la solución de la reacción "in situ", utilizando el permeado de 3000 NMWC del extracto de nopal y el PVA como reductor y estabilizante respectivamente. Dado que la concentración de esta solución ya estaba definida, se realizaron diluciones de la misma obteniendo membranas con diferente concentración de nanopartículas de plata.

#### 4.9.2.1 Evaluación contra Escherichia Coli ATCC-25922

Las membranas se evaluaron contra *Escherichia coli* ATCC-25922, evaluando concentraciones de nanopartículas de plata desde 20 hasta 100 ppm.

*Tabla 4.10.*- Comportamiento de la actividad antimicrobiana de membranas de nanofibras conteniendo nanopartículas de plata obtenidas de la reacción "in situ", expuestas a la bacteria *Escherichia coli* ATCC-25922.

Muestra	T <sub>0</sub> (UFC/mL)	$T_{24}$ $(UFC/mL)$	Actividad antimicrobiana (%)	Inhibición (%)
PVA	23,478	46,977,778	0	0
PVA + 25 ppm Ag NP's (in situ)	23,478	39	6.08	99.99
PVA + 50 ppm Ag NP's (in situ)	23,478	0	8.72	100
PVA + 100 ppm Ag NP's (in situ)	23,478	59	5.90	99.99

Cómo se puede observar en la tabla 4.10, se obtuvieron valores de actividad antimicrobiana mayores al 2% en membranas obtenidas de la reacción "in situ" de las nanopartículas de plata con PVA con una concentración mayor de 25 ppm de nanopartículas, indicando una inhibición del 99.9% de la bacteria de *E. Coli*, así como una inhibición total de la bacteria en las membranas con





una concentración de 50 ppm de nanopartículas de plata. En base a lo anterior se puede confirmar que las membranas obtenidas de la reacción "in situ" de las nanopartículas de plata con el PVA presentan un mejor efecto bactericida en comparación con las membranas obtenidas mediante el mezclado de las nanopartículas de plata con el PVA, debido a que se obtiene una mejor dispersión de las nanopartículas en las nanofibras, así como la obtención de nanopartículas de menor tamaño, lo que provoca que un mayor número de nanopartículas interaccionen con la superficie de las bacterias.

#### 4.9.2.2 Evaluación contra Staphylococcus aureus ATCC-29213

Para la evaluación de las membranas contra *Staphylococcus aureus*, se consideró la mínima concentración que mostró un efecto positivo en la inhibición de la bacteria de *E. Coli*. y se evaluó una concentración menor.

*Tabla 4.11.-* Comportamiento de la actividad antimicrobiana de membranas de nanofibras conteniendo nanopartículas de plata de la reacción "in situ", expuestas a la bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC-29213.

Muestra	T <sub>0</sub> (UFC/mL)	T <sub>24</sub> (UFC/mL)	Actividad antimicrobiana (%)	Inhibición (%)
PVA	36,167	120,900,000	0	0
PVA + 10 ppm Ag NP's (in situ)	36,167	88,525,656	0.14	26.77
PVA + 20 ppm Ag NP's (in situ)	36,167	0	8.56	100

Los resultados de actividad antimicrobiana mostrados en la tabla 4.11, indican que las membranas obtenidas a partir de la solución de la reacción "in situ" de nanopartículas de plata con el PVA, y con una concentración mayor o igual a 20 ppm de nanopartículas de plata, pueden considerarse como un material con actividad antimicrobiana con un 99.9 % de inhibición de la bacteria *Staphylococcus aureus*.





### 4.9.2.3 Evaluación contra Pseudomona aureoginosa ATCC- 27853

Para esta evaluación se emplearon las mismas concentraciones de bacterias que se probaron contra el *S. Aureus*.

*Tabla 4.12.*- Comportamiento de la actividad antimicrobiana de membranas de nanofibras conteniendo nanopartículas de plata de la reacción "in situ", expuestas a la bacteria *Pseudomona aureoginosa* ATCC-27853.

Muestra	T <sub>0</sub> (UFC/mL)	T <sub>24</sub> (UFC/mL)	Actividad antimicrobiana (%)	Inhibición (%)
PVA	15,200	18,583,333	0	0
PVA + 10 ppm Ag NP's (in situ)	15,200	7,842,944	0.37	57.79
PVA + 20 ppm Ag NP's (in situ)	15,200	0	8.31	100

En los resultados de actividad antimicrobiana e inhibición presentados en la tabla 4.12 se puede inferir que para obtener material con una inhibición total de la bacteria *Pseudomona aureoginosa*, se debe preparar una membrana a partir de una muestra de la reacción "in situ" con una concentración de nanopartículas de plata mayor a 20 ppm.

### 4.9.2.4 Evaluación contra Aspergillus niger ATCC 9642

La evaluación de la actividad antifúngica con el *Aspergillus niger* se realizó a nivel de esporas, realizando el conteo de esporas por placa y determinando el porcentaje de inhibición.





*Tabla 4.13.-* Comportamiento de la actividad antimicrobiana de membranas de nanofibras conteniendo nanopartículas de plata de la reacción "in situ", expuestas al hongo *Aspergillus niger* ATCC-9642.

Muestra	T <sub>0</sub> (UFC/mL)	T <sub>24</sub> (UFC/mL)	Actividad antimicrobiana (%)	Inhibición (%)
PVA	22,022	19,989	0	9.23
PVA + 10 ppm Ag NP's (in situ)	22,022	9,489	0.32	52.53
PVA + 20 ppm Ag NP's (in situ)	22,022	0	5.35	100

En la tabla 4.13 podemos ver los resultados de la evaluación del *Aspergillus niger*, donde se obtuvo una inhibición total de las esporas del hongo con una concentración de 20 ppm de nanopartículas de la reacción "in situ". Debido a que se trabajó a nivel de esporas, no se observa un crecimiento de esporas mayor al valor inicial después de las 24 horas, únicamente se presenta la eliminación de las esporas por acción de las nanopartículas de plata.

#### 4.9.2.5 Evaluación contra Candida Albicans

Candida Albicans es un hongo levaduriforme que se uso para evaluar la actividad antifúngica de las membranas poliméricas con nanopartículas de plata y determinar así el porcentaje de inhibición.

*Tabla 4.14.*- Comportamiento de la actividad antimicrobiana de membranas de nanofibras conteniendo nanopartículas de plata de la reacción "in situ", expuestas al hongo de *Candida Albicans*.

Muestra	$T_0$ (UFC/mL)	T <sub>24</sub> (UFC/mL)	Actividad antimicrobiana (%)	Inhibición (%)
PVA	25,333	2,016,667	0	0
PVA + 10 ppm Ag NP's (in situ)	25,333	70	4.46	99.99



PVA + 20 ppm Ag NP's (in situ) 25,333 0 7.35
--

Analizando los resultados de la tabla 4.14, se obtuvieron valores de actividad antimicrobiana mayores al 2% en membranas obtenidas de la reacción "in situ" de las nanopartículas de plata con PVA con una concentración de 10 ppm de nanopartículas, indicando una inhibición del 99.9% de la Candida albicans, así como una inhibición total del hongo en las membranas con una concentración a 20 ppm de nanopartículas de plata. Analizando estos resultados se puede confirmar un mejor efecto antimicrobiano de las nanopartículas de plata al estar expuestas al hongo de *Candida albicans*, en comparación con las otras cepas de microorganismos probadas, ya que para este caso se requirió de una menor concentración de nanopartículas para obtener una membrana con actividad antimicrobiana con un 99.9 % de inhibición del hongo de la *Candida albicans*.

# 4.9.3 Evaluación antimicrobiana de las membranas obtenidas mediante el empleo de la solución de la reacción "in situ" de nanopartículas de plata y adición de quitosán

Para comprobar la efectividad del quitosán como agente bactericida, se evaluaron las membranas obtenidas de la solución de reacción "in situ" de las nanopartículas de plata y la adición de quitosán, contra cada una de las bacterias y hongos utilizados con las otras membranas.

**Tabla 4.15.-** Comportamiento de la actividad antimicrobiana de membranas de nanofibras conteniendo nanopartículas de plata obtenidas de la reacción "in situ" y quitosán, expuestas a la bacteria *Escherichia coli* ATCC-25922.

Muestra	T <sub>0</sub> (UFC/mL)	T <sub>24</sub> (UFC/mL)	Actividad antimicrobiana (%)	Inhibición (%)
PVA	32,822	95,600,000	0	0
PVA + Quitosán	32,822	0	9.03	100
PVA + 10 ppm Ag NP's (in situ)+ Quitosán	32,822	0	9.03	100





PVA + 20 ppm Ag NP's (in situ)+	32,822	0	9.03	100
Quitosán	32,022	V	7.03	100

*Tabla 4.16.-* Comportamiento de la actividad antimicrobiana de membranas de nanofibras conteniendo nanopartículas de plata obtenidas de la reacción "in situ" y quitosán, expuestas a la bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC-29213

Muestra	$T_0$ $(UFC/mL)$	T <sub>24</sub> (UFC/mL)	Actividad antimicrobiana (%)	Inhibición (%)
PVA	36,167	120,900,000	0	0
PVA + Quitosán	36,167	0	9.13	100
PVA + 10 ppm Ag NP's (in situ)+ Quitosán	36,167	0	9.13	100
PVA + 20 ppm Ag NP's (in situ)+ Quitosán	36,167	0	9.13	100

*Tabla 4.17.-* Comportamiento de la actividad antimicrobiana de membranas de nanofibras conteniendo nanopartículas de plata obtenidas de la reacción "in situ" y quitosán, expuestas a la bacteria *Pseudomona aureoginosa* ATCC-27853.

Muestra	$T_{0}$ $(UFC/mL)$	T <sub>24</sub> (UFC/mL)	Actividad antimicrobiana (%)	Inhibición (%)
PVA	15,200	18,583,333	0	0
PVA + Quitosán	15,200	0	8.31	100
PVA + 10 ppm Ag NP's (in situ)+ Quitosán	15,200	0	8.31	100
PVA + 20 ppm Ag NP's (in situ)+ Quitosán	15,200	0	8.31	100





*Tabla 4.18.-* Comportamiento de la actividad antimicrobiana de membranas de nanofibras conteniendo nanopartículas de plata obtenidas de la reacción "in situ" y quitosán, expuestas al hongo *Aspergillus niger* ATCC-9642.

Muestra	T <sub>0</sub> (UFC/mL)	T <sub>24</sub> (UFC/mL)	Actividad antimicrobiana (%)	Inhibición (%)
PVA	22,022	19,989	0	9.23
PVA + Quitosán	22,022	1,008	1.30	94.96
PVA + 10 ppm Ag NP's (in situ)+ Quitosán	22,022	40	2.70	99.80
PVA + 20 ppm Ag NP's (in situ)+ Quitosán	22,022	45	2.65	99.77

**Tabla 4.19.-** Comportamiento de la actividad antimicrobiana de membranas de nanofibras conteniendo nanopartículas de plata obtenidas de la reacción "in situ" y quitosán, expuestas al hongo *Candida Albicans*.

Muestra	$T_{ heta}$ (UFC/mL)	T <sub>24</sub> (UFC/mL)	Actividad antimicrobiana (%)	Inhibición (%)
PVA	25,333	2,016,667	0	0
PVA + Quitosán	25,333	0	7.35	100
PVA + 10 ppm Ag NP's (in situ)+ Quitosán	25,333	0	7.35	100
PVA + 20 ppm Ag NP's (in situ)+ Quitosán	25,333	0	7.35	100

En un análisis rápido de los resultados de la evaluación antimicrobiana de las membranas preparadas con la solución de nanopartículas de la reacción "in situ" y la adición de quitosán, con cada una de las bacterias y hongos (Tabla 4.15- 4.17), se puede observar que la membrana





obtenida de la mezcla de PVA y quitosán presentó por sí sola, una inhibición total en los microorganismos: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus y Pseudomona aureoginosa*, indicando con ello una alta eficacia del quitosán como agente bactericida. Sin embargo, para la actividad antifúngica solo se presentó este comportamiento para la *Candida albicans* (Tabla 4.18), ya que para las esporas de *Aspergillus niger* solo se obtuvo una inhibición del 94.96 % en las membranas de PVA y quitosán, dado que el micelio del Aspergillus niger es una fuente alternativa de obtención de quitosán, por lo que se ve reducido su efecto antimicrobiano. En este caso es importante hacer notar que la adición de las nanopartículas de plata resultó positiva en la promoción de su inhibición, aunque el incremento en la concentración de nanopartículas de plata para las membranas con quitosán, no mostró un efecto significativo en el porcentaje de inhibición del *A. niger*, lo que puede atribuirse a que el quitosán actúa también como agente quelante, uniéndose a las nanopartículas de plata y reduciendo su poder antimicrobiano.

Rabea y col. <sup>(148)</sup>, proponen un mecanismo de acción antimicrobiana del quitosán, en el cual el quitosán interactúa con la membrana de la célula para alterar su permeabilidad. La interacción entre las moléculas cargadas positivamente del quitosán, con la membrana de la célula microbiana cargada negativamente aumenta la permeabilidad de la membrana celular lipídica provocando la fuga de componentes intracelulares y materiales esenciales para el metabolismo celular.

Hasta la fecha no se ha propuesto ningún mecanismo de acción de las nanopartículas de plata sobre los hongos. Por lo que en este trabajo sugerimos la hipótesis de que las nanopartículas de plata presentan un efecto durante la etapa de formación del micelio. El crecimiento del hongo surge mediante la germinación de la espora, provocando la formación de un tubo germinal que crece linealmente convirtiéndose eventualmente en una hifa. La hifa puede estar dividida, según su composición citoplasmática de organelos, en tres regiones principales: apical, subapical y distal. Al exceder una cierta longitud se forma una nueva extremidad o rama a lo largo de la hifa. El incremento en las ramificaciones de las hifas origina la formación del micelio (149). Durante la formación del tubo germinal, la pared de la hifa es más delgada y frágil en la parte apical, proponiendo que éste sea el momento que permita la interacción de las nanopartículas de plata en la pared celular, provocando un efecto similar al que ocurre con las células de bacterias, en las cuales se incrementa la permeabilidad de la membrana y con ello la liberación de componentes esenciales para el metabolismo de la célula.



# CONCLUSIONES

- 1. El extracto de cladodios de nopal (*Opuntia sp.*) cataliza la reducción de iones de plata a Ag<sup>0</sup>, formando nanopartículas de plata con morfología predominantemente esférica y tamaños que oscilan entre 5-28 nm, con un tamaño promedio de 13 nm. Estos datos se confirmaron por espectroscopia Uv-visible, microscopia HR-TEM y difracción de rayos X.
- 2. El contenido alto de fenoles y azúcares reductores en el extracto de los cladodios de nopal sugiere que estos compuestos son los responsables de la actividad reductora en la síntesis de nanopartículas de plata. El rendimiento en la formación de estas nanoestructuras es comparativamente más alto que otros extractos vegetales reportados en la literatura.
- 3. Con el procedimiento utilizado en este trabajo de tesis, el rendimiento de extracto de nopal seco fue del 2% y los principales componentes que participan en la reducción de los iones plata son moléculas de peso molecular igual o inferior a 3000 Kg/mol, según lo revela los datos de micro y ultrafiltración a través de membranas de fibra hueca. Las nanopartículas de plata sintetizadas con esta fracción, mostraron la misma morfología que con el extracto completo. El diámetro de las nanopartículas fue de 4-30 nm, con un promedio de 17 nm.
- 4. Mediante el uso del SDS como agente estabilizante se obtuvieron nanopartículas con morfología esférica y con una distribución de tamaños homogénea, sin embargo, el uso del PVA como agente estabilizante y medio de soporte para la fabricación de membranas permitió obtener una mayor concentración de nanopartículas esféricas con diámetros menores.
- 5. Haciendo un análisis de las nanofibras obtenidas por electrohilado, se puede concluir que la manera más adecuada y eficaz para incorporar las nanopartículas de plata en la solución polimérica es mediante la reacción "in situ" de las nanopartículas de plata empleando el PVA como agente estabilizante, ya que mediante esta forma se obtiene una mejor dispersión de las nanopartículas con un menor tamaño de diámetro.
- 6. Las nanofibras obtenidas al mezclar la solución de PVA con las nanopartículas de plata presentaron una distribución de tamaños homogénea con un tamaño promedio de diámetro de 200 nm, no obstante, mostraron un mayor número de defectos en comparación con las



nanofibras obtenidas mediante los otros métodos de preparación de la solución polimérica, las cuales presentaron fibras más uniformes con tamaños promedio de diámetro de 250 nm para la solución de reacción "in situ" de las nanopartículas de plata, y de 280 nm para la solución de reacción "in situ" de nanopartículas de plata con quitosán.

- 7. Mediante la estrategia de la reacción "in situ" se consiguieron membranas fibrosas con alta actividad antimicrobiana debido a la buena dispersión de las nanopartículas en el interior de las nanofibras.
- 8. Se comprobó la inhibición antibacteriana de las membranas de nanofibras cargadas con nanopartículas de plata, donde las membranas obtenidas mediante el mezclado de la solución de PVA con las nanopartículas de plata fue de 99.9% para Escherichia coli y 94.1% para el Staphylococcus aureus, utilizando en ambos casos una concentración de 300 ppm de nanopartículas de plata.
- 9. Se logró una inhibición antimicrobiana con las membranas obtenidas a partir de la solución de la reacción "in situ" de nanopartículas de plata con PVA para los casos probados (*E.coli, S. aureus, Pseudomona aureoginosa, Candida albicans y esporas de A. niger*), con una concentración de 20 ppm de nanopartículas de plata.
- 10. Se obtuvo una inhibición total de las cepas de bacterias y hongos con las membranas de PVA y quitosán, excepto para las esporas de *Aspergillus niger*, donde con el quitosán (incorporado en las nanofibras) por si solo permitió una inhibición del 95%, en tanto que el quitosán con una concentración de 10 ppm de nanopartículas de plata la inhibición fue del 99.8%.







- 1. **Mozafari, M.R.** Nanomaterials and Nanosystems for Biomedical Applications. 2007, Vols. 1-26, p. 2.
- 2. Chen, H., Yang, W., Zhang, Q., Wang, Y. "Controlled release of dual drugs from emulsion electrospun nanofibrous mats". 2009, Vol. 73, p. 75.
- 3. **Pomogailo, A.D., KEstelman, V.N.** "Metallopolymer nanocomposites". 2005, p. 131.
- 4. **Hosokam, M., Noyi, K., Naito, M., Yokoyama, T.** Nanoparticle Technology Handbook. 2007, p. 5.
- 5. **Jay L. Nadeau, John Priester, Galen Stucky, Patricia Holden.** "Bacterial Interactions with CdSe Quantum Dots and Environmental Implications". 2008, p. 197.
- 6. **Xia, Y., Xiong, Y., Lim, B., Skrabalak, S.** "Shape-controlled synthesis of metal nanocrystals: simple chemistry meets complex physics?". 2009, Vol. 48, 1, pp. 60-103.
- 7. **Pattabi, M., Pattabi, R.** "Studies on the growth and stability of silver nanoparticles synthesized by electron beam irradiation". 2009, Vol. 20, pp. 1233-1238.
- 8. **Feng, H.** "Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing". *Food Engineering Series*. 2010, p. 405.
- 9. Lewis, L. N. Chem. Rev. 1993, Vol. 93, p. 2693.
- 10. Richards, R. Eur. J. Inorg. Chem. 2001, Vol. 10, p. 2455.
- 11. **Vollath, D.** "Nanomaterials: an introduction to synthesis, properties and applications". *Wyley Vch.* 2008, p. 145.
- 12. **Endo, T., Kerman, K., Nagatani, N., Takamura, Y. and Tamiya, E.** "Label-free detection of peptide nucleic acid-DNA hybridization using localized surface Plasmon resonance based optical biosensor". *Analytical Chemistry.* 2005, Vol. 77, pp. 6976-6984.
- 13. Kim, D.K., Kerman, K., Saito, M., Sathuluri, R., Endo, T., Yamamura, S., Kwon, Y., Tamiya, E. "Label-free DNA biosensor based on localized surface Plasmon resonance coupled with interferometry". *Analytical Chemistry*. 2007, Vol. 79, pp. 1855-1864.
- 14. **Kurokawa, Y., Hosoya, Y.** *Surface*. 1996, Vol. 34, 2, pp. 100-106.
- 15. **Kobayashi, K.** J. Soc. Powder Technol. 2004, Vol. 41, pp. 473–478.
- 16. Sato, S., Asai, N., Yonese, M. Colloid Polym. Sci. 1996, Vol. 274, pp. 889–893.
- 17. **Brust, M., Bethell, D., Shiffrin, D. J., Kiely, C.** "Novel gold-dithiol nano-networks with non-metallic electronic properties". *Advanced materials.* 1995, Vol. 795, p. 7.
- 18. **Suslick, K, S., Fang, M., Hyeon, T.** "Sonochemical synthesis of iron colloids". *Journal of the American Chemical Society.* 1996, Vol. 118, 47, pp. 1960-1961.
- 19. Rakhimov, R., Jackson, E., Hwang, J., Prokofiev, I., Alexandrov, I., Kamilov, A. "Mechanochemical synthesis of Co, Ni, Fe nanoparticles in polymer matrices". *J. Appl. Phys.* 2004, Vol. 95, p. 7133.
- 20. **Zhou, W., Wang, Z.** "Scanning microscopy for nanotechnology: techniques and applications". *Springer*. 2007, p. 307.
- 21. **Ming, T.** "Regenerative Medicine, Artificial Cells and Nanomedicine". *World Scientific*. 2007, Vol. 1, 15.
- 22. **Fabbrizzi, L., Poggi, A.** "Chemistry at the beginning of the third millennium: molecular design". 2000, p. 4.
- 23. **Kumar, Challa S.S.R.** "Nanomateriales for the life sciences". *WILEY-VCH*. 2009, Vol. 1, p. 225.



- 24. **Fievet, J., Lagier, B., Beaudoin, B., Figlarz, M.** "Homogeneous and heterogeneous nucleations in the polyol process for the preparation of micron and submicron size metal particles". *Solid State Ionics*. 1989, Vols. 32-33, pp. 198-205.
- 25. **Suslick, K., Hyeon, T., Fang, M., Cichowlas, A.** "Sonochemical synthesis of nanostructured catalysts.". *Materials Science and Engineering A.* 1995, Vol. 204, pp. 186-192.
- 26. Lev, O., Tsionsky, M., Rabinovich, L., Glezer, V., Sampath, S., Pankratov, I., Gun, J. "Organically modified sol-gel sensors". *Analytical Chemistry*. 1995, Vol. 67, pp. 22A-30A.
- 27. **Masala, O., Seshadri, R.** "Synthesis Routes for Large Volumes of Nanoparticles". *Annu. Rev. Mater. Res.* 2004, Vol. 34, pp. 41-81.
- 28. **Nersisyan, H. H., Lee, J., Son, H., Won, C., Maeng, D.** "A New and Effective Chemical Reduction Method for Preparation of Nanosized Silver Powder and Colloid Dispersion". *Mater. Res bull.* 2003, Vol. 38, pp. 949-956.
- 29. Caswell, K. K., Bender, C. M., Murphy, C. J. "Seedless, Surfactantless Wet Chemical Synthesis of Silver Nanowires". *Nano Letters*. 2003, Vol. 3, pp. 667-669.
- 30. **Monge, m.** "Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas". *An. Quím.* 2009, Vol. 105, 1, p. 33–41.
- 31. Lin, Z., Wu, J., Xue, R., Yong, Y. "Spectroscopic characterization of Au3+ biosorption by waste biomass of Saccharomyces cerevisiae". *Spectrochim. Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.* 2005, Vol. 61, pp. 761-765.
- 32. **Duran, N., Marcato,P., Alves, O., Souza, G., Esposito, E.** "Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several Fusarium oxysporum strains Nanobiotechnology". *Journal of Nanobiotechnology*. 2005, Vol. 3, pp. 1-7.
- 33. Cha, J., Shimizu, K., Zhou, Y., Christiansen, S., Chmelka, B., Stucky, B., Morse, D. "Silicatein filaments and subunits from a marine sponge direct the polymerization of silica and silicones in vitro". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96. 1999, pp. 361-336.
- 34. **Klaus, T., Joerger, R., Olsson, E., Granqvist, C.** "Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96. 1999, pp. 13611–13614.
- 35. **Fendler, J.** *Chem.Rev.* . 1987, Vol. 87, p. 877.
- 36. **Ashok, K., Varma, A.** "A textbook of molecular biotechnology". *I.K. International.* 2009, p. 649.
- 37. **Xie, J., Lee, J., Wang, D., Ting, Y.** "High yield synthesis of complex gold nanostructures in a fungal system". *Journal of Physical Chemistry C.* 2007, Vol. 111, pp. 16858 16865.
- 38. Vigneshwaran, N., Kathe, A., Varadarajan, P., Nachane, R., Balasubramanya, R. "Biomimetics of silver nanoparticles by white rot fungus, Phanerochaete chrysosporium". *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces.* 2006, Vol. 53, 1, pp. 55-59.
- 39. Mukherjee, P., Senapati, S., Mandal, D., Ahmad, A., Khan, M.I., Kumar, R., Sastry, M. "Extracellular synthesis of gold nanoparticles by the fungus Fusarium oxysporum". *ChemBioChem.* 2002, Vol. 3, 5, pp. 461-463.
- 40. **McCormick, M., Bouwer, E., Adriaens, P.** "Carbon tetrachloride transformation in a model iron-reducing culture: relative kinetics of biotic and abiotic reactions". *Environmental Science and Technology*. 2002, Vol. 36, 3, pp. 403-410.
- 41. **Basavaraja**, S., Balaji, S., Lagashetty. A., Rajasab, A., Venkataraman, A. "Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus Fusarium semitectum". *Materials Research Bulletin.* 2008, Vol. 43, 5, pp. 1164-1170.
- 42. Vigneshwaran, N., Ashtaputre, N., Varadarajan, P., Nachane, R., Paralikar, K., Balasubramanya, R. "Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus Aspergillus flavus". *Materials Letters*. 2007, Vol. 61, 6, pp. 1413 1418.
- 43. **Das, S., Das, A., Guha, A.** "Gold Nanoparticles: Microbial Synthesis and Application in Water Hygiene". *Langmuir*. 2009, Vol. 25, 14, pp. 8192–8199.



- 44. **Chen, J.C., Lin, Z.H. and Ma, X.X.** "Evidence of the production of silver nanoparticles via pretreatment of Phoma Sp .3.2883 with silver nitrate". *Letters in Applied Microbiology*. 2003, Vol. 37, pp. 105-108.
- 45. **Southam, G., Beveridge, T.J.** "The occurrence of sulfur and phosphorus within bacterially derived crystalline and pseudocrystalline octahedral gold formed in vitro". *Geochimica et Cosmochimica Acta.* 1996, Vol. 60, pp. 4369-4376.
- 46. **Fortin, D., Beveridge, T.J.** "Biomineralization, in: From Biology to Biotechnology and Medical Applications". *John Wiley & Sons, Ltd*, *Weinheim*. 2000, pp. 7-22.
- 47. **Shahverdi, A., Minaelan, S., Shahverdi, H., Jamalifar, H., Nohi, A.** "Rapid synthesis of silver nanoparticles using culture supernatants of Enterobacteria: a novel biological approach". *Process Biochemistry (Amsterdam, Netherlands)*. 2007, Vol. 42, 5, pp. 919-923.
- 48. **He, S., Guo, Z., Zhang, Y., Zhang, S., Wang, J., Gu, N.** "Biosynthesis of gold nanoparticles using the bacteria Rhodopseudomonas capsulata". *Materials Letters*. 2007, Vol. 61, 18, p. 3984.
- 49. **Lengke, M., Southam, G.** "The effect of thiosulfate-oxidizing bacteria on the stability of the gold-thiosulfate complex". *Geochimica Cosmochimica Acta*. 2005, Vol. 69, 15, pp. 3759-3772.
- 50. **Husseiny, M., Abd El-Aziz, M., Badr, Y., Mahmoud, M.** "Biosynthesis of gold nanoparticles using Pseudomonas aeruginosa". *Spectrochimica Acta, Part A: molecular and Biomolecular Spectroscopy.* 2007, Vol. 67, pp. 1003-1006.
- 51. Gardea-Torresdey, J., Parsons, J., Gomez, E., Peralta-Videa, J., Troiania, H., Santiago, P., Yacaman, M. "Formation and growth of Au nanoparticles inside live alfalfa plants". *Nano Letters*. 2002, Vol. 2, pp. 397-401.
- 52. **Nair, B., Pradeep, T.** "Coalescence of nanoclusters and the formation of sub micron crystallites assisted by lactobacillus strains". *Crystal Growth and Design.* 2002, Vol. 2, pp. 293-298.
- 53. Gardea-Torresdey, J., Tiemann, K., Gamez, G., Dokken, K., Cano-Aguilera, I., Furenlid, L., Renner, M. "Reduction and accumulation of gold (III) by Medicago sativa alfalfa biomass: X ray absorption spectroscopy, pH, and temperature dependence". *Environmental Science and Technology*. 2000, Vol. 34, 20, pp. 4392–4396.
- 54. Gardea-Torresdey, J., Gomez., E., Peralta-Videa, J., Parsons, J., Troiani, H., Jose-Yacaman, M. "Alfalfa sprouts: a natural source for the synthesis of silver nanoparticles". *Langumir*. 2003, Vol. 19, 4, pp. 1357-1361.
- 55. Yates, B., Myre, E., Breetz, D., Dionysiou, D. "Biotemplating of nanoparticles for environmental applications using phytomining techniques". *Abstracts of Papers*, 230 th ACS National Meeting, United States. 2005.
- 56. Huang, J., Li, Q., Sun, D., Lu, Y., Su, Y., Yang, X., Wang, H., Wang, Y., Shao, W., He, N.H., Chen, J. "Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried Cinnamomum camphora leaf". *Nanotechnology* . 2007, Vol. 18, pp. 105104/1 10510.
- 57. **Shankar, S.S., Ahmad, A., Sastry, M.** "Geranium leaf assisted biosynthesis of silver nanoparticles". *Biotechnology Progres 1*. 2003, Vol. 19, 6, pp. 1627 1631.
- 58. Chandran, S.P., Chaudhary, M., Pasricha, R., Ahmad, A., Sastry, M. "Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using Aloe vera plant extract". *Biotechnology Progress*. 2006, Vol. 22, 2, pp. 577-583.
- 59. **Ankamwar, B., Damle, C., Ahmad, A., Sastry, M.** "Biosynthesis of gold and silver nanoparticles using Emblica offi cinalis fruit extract, their phase transfer and transmetallation in an organic solution". *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2005, Vol. 5, 10, pp. 1665–1671.
- 60. Li, S., Shen, Y., Xie, A., Yu, X., Qiu, L., Zhang, L., Zhang, Q. "Green synthesis of silver nanoparticles using Capsicum annuum L. extract". *Green Chemistry*. 2007, Vol. 9, 8, pp. 852–858.



- 61. **Shankar, S.S., Rai, A., Ahmad, A., Sastry, M.** "Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Au core Ag shell nanoparticles using Neem (Azadirachta indica) leaf broth". *Journal of Colloid and Interface Science*. 2004, Vol. 275, 2, pp. 496 502.
- 62. **Chen, X., Schluesener, H.** "Nanosilver: A nanoproduct in medical application". *Toxicology Letters*. 2008, Vol. 176, pp. 1-12.
- 63. **Khaydarov, R., Gapurova, O., Estrin, Y.** "Antimicrobial effects of silver nanoparticles synthesized by an electrochemical method". *Nanostructured materials for Advanced Technological Applications, Springer Science*. 2009, pp. 215-216.
- 64. **Necula, B., Fratila-Apachitei, L., Zaat, S., Apachitei I., Duszczyk, J.** "In vitro antibacterial activity of porous TiO2–Ag composite layers against methicillin-resistant Staphylococcus aureus". *Acta Biomater.* 2009, Vol. 5, pp. 3573-3580.
- 65. Madhumathi, K., Kumar, P., Abhilash, S., Sreeja, V., Tamura, H., Manzoor, K., Nair, S., Jayakumar, R. "Development of novel chitin/ nanosilver composite scaffolds for wound dressing applications". *J Mater Sci Mater Med.* 2010, Vol. 21, pp. 807-813.
- 66. **Sondi, I., Salopek-Sondi, B.** "Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria". *Journal of Colloid and Interface Science*. 2004, Vol. 275, pp. 177–182.
- 67. Kim, J., Kuk, E., Yu, K., Kim, J., Park, S., Lee, H., Kim, S., Park, K., Park, J., D.H.Hwang, C., Cho, M. "Antimicrobial effects of silver nanoparticles. Nanomedicine". 2007, Vol. 1, pp. 95-101.
- 68. **Jiang, Z., Liu, Ch., Sun, L.** "Catalytic Properties of Silver Nanoparticles Supported on Silica Spheres". *J. Phys. Chem. B.* 2005, Vol. 109, 5, pp. 1730–1735.
- 69. **McFarland, A., Duyne, R.** "Single Silver Nanoparticles as Real-Time Optical Sensors with Zeptomole Sensitivity". *Nano Letters*. 2003, Vol. 3, 8, pp. 1057–1062.
- 70. **Jain, P., Praddep, T.** "Potential of Silver Nanoparticle-Coated Polyurethane Foam As an Antibacterial Water Filter". *Biotechnology and Bioengineering*. 2005, Vol. 90, 1, pp. 59-63.
- 71. **Zhang, F., Wu, X., Chen, Y., Lin, H.** "Application of Silver Nanoparticles to Cotton Fabric as an Antibacterial Textile Finish". *Fibers and Polymers*. 2009, Vol. 10, 4, pp. 496-501.
- 72. Wong, Y., Yuen, C., Leung, M., Ku, S., Lam, H. "Selected applications of nanotechnology in textiles". *AUTEX Research Journal*. 2006, Vol. 6, pp. 1-8.
- 73. **Lee, H., Jeong, E., Baek, C., Youk, J.** "One-step preparation of ultrafine poly(acrylonitrile) fibers containing silver nanoparticles". *Materials Letters*. 2005, Vol. 59, pp. 2977–2980.
- 74. **Shenhar, R., Norsten, T., Rotello, V.** "Polymer Mediated Nanoparticle Assembly: Structural Control and Applications". *Adv. Mater.* 2005, Vol. 17, p. 657.
- 75. **Jason Lyons, J., K. Ko, F.** "Nanofibers". *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*. 2004, Vol. 6, pp. 727–738.
- 76. Ramakrishna, S., Fujihara, K., Teo, W.E., Yong, T., Ma, Z., Ramaseshan, R. "Electrospun nanofibers: solving global issues". *Materials today, Elsevier Ltd.* . 2006, Vol. 9, pp. 40-50.
- 77. **He, J.H., Liu, Y., Mo, L.F., Wan, Y.Q., Xu, L.** "Electrospun Nanofibres and Their Applications". *iSmithers*. 2008, pp. 6-10.
- 78. **Khan, S., Kordesch, M.E.** "Electrospinning Polymer Nanofibers Electrical and Optical Characterization". *Physics and Astronomy*. 2007.
- 79. Ramakrishna, S., Fujihara K.F., Teo, W.E., Lim, T.Ch., Ma, Z. "An introduction to electrospinning and nanofibers". *World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.* 2005.
- 80. **Formhals, A.** "Process and apparatus for preparing artificial threads". *US Patent.1 975,504*. 1934.



- 81. **Gamboa, W., Mantilla, O., Castillo, V.** "Producción de Micro y Nanofibras a partir de la Técnica "Electrospinnig" para Aplicaciones Farmacológicas" . *Sociedad Cubana de Bioingeniería, artículo T053*. 2007.
- 82. **Taylor, G.** "Disintegration of water drops in an electric field". *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences.* 1964, Vol. 280, 1382, pp. 383-397.
- 83. **Fong, H., Chun, I., Reneker, D.** "Beaded nanofibers formed during electrospinning". *Polymer.* 1999, Vol. 40, pp. 4585–4592.
- 84. **Huang, Z. M., Zhang, Y. Z., Ramakrishna, S.** "Electrospinning and mechanical characterization of gelatin nanofibers". 2004, Vol. 45, pp. 5361-5368.
- 85. **Li, D., Xia, Y.** "Nanofibers of Conjugated Polymers Prepared by Electrospinning with a Two-Capillary Spinneret". *Adv. Mater.* 2004, Vol. 16, p. 1151.
- 86. **Burger, C., S. Hsiao, B., Chul, B.** "Nanofibrousmaterials and their Applications" . *Annu. Rev. Mater. Res.* . 2006, Vol. 36, pp. 333-368.
- 87. **Fong, H., Reneker, DH.** "Elastomeric nanofibers of styrene-butadiene-styrene triblock copolymer". *J. Polym. Sci.* 1999, Vol. 37, pp. 3488–3493.
- 88. Yong-Tang, J., Jian, G., Xiao-Hua,G., Hark-Yong, K., Jiong, D., Xin-Yuan, S. "Fabrication and characterization of poly (vinyl alcohol)/chitosan blend nanofibers produced by electrospinning method". *Carbohydrate Polymers* 67. 2007, pp. 403–409.
- 89. **Sun, K., Li, Z.** "Preparations, properties and applications of chitosan based nanofibers fabricated by electrospinning". *Express Polymer Letters*. 2011, Vol. 5, 4, pp. 342-361.
- 90. **Frenot, A., Chronakis, I.S.** "Polymer nanofibers assembled by electrospinning". *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 8. 2003, pp. 64–75.
- 91. **Bognitzki, M., Czado, W., Frese, T., Schaper, A., Hellwig, M., Steinhart, M., Greiner, A., Wendorff, J.H.** "Nanostructured fibers via electrospinning". *Adv Mater.* 2001, Vol. 13, pp. 70–72.
- 92. **Koski, A., Yim, K., Shivkumar, S.** "Effect of molecular weight on fibrous PVA produced by electrospinning". *Materials Letters*. 2004, Vol. 58, pp. 493-497.
- 93. **Koombhongse, S., Liu, W., Reneker, D.** "Flat polymer ribbons and other shapes by electrospinning". *J. Polym. Sci., Polym. Phys.* 2001, Vol. 39, pp. 2598-2606.
- 94. **Kessick, R., Tepper, G.** "Microscale polymeric helical structures produced by electrospinning". *Appl Phys Lett.* 2004, Vol. 84, pp. 4807-4809.
- 95. Bognitzki, M., Hou, H., Ishaque, M., Frese, T., Hellwig, M., Schwarte, C, Schaper, A., Wendorff, J., Greiner, A. "Polymer, metal, and hybrid nano- and mesotubes by coating degradable polymer template fibers (TUFT Process)". *Adv. Mater.* 2000, Vol. 12.
- 96. **Jin, W.-J., Lee, H. K., Jeong, E. H., Park, W., Youk, J.** "Preparation of Polymer Nanofibers Containing Silver Nanoparticles by Using Poly(N-vinylpyrrolidone)". *Macromolecular Rapid Communications*. 2005, Vol. 26, pp. 1903–1907.
- 97. **Hong, K., Park, J., Sul, I., Youk, J., Kang, T.** "Preparation of antimicrobial poly(vinyl alcohol) nanofibers containing silver nanoparticles". *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* 2006, Vol. 44, p. 2468.
- 98. **Dan Min, K., Youk, J.H., Kwark, Y., Park, W.** "Preparation of Inorganic Silica Nanofibers Containing Silver Nanoparticles" . *Fibers and Polymers*. 2007, Vol. 8, 6, pp. 591-600.
- 99. **Son, W.K., Youk, J.H., Park, W.** "Antimicrobial cellulose acetate nanofibers containing silver nanoparticles". *Carbohydrate Polymers*. 2006, Vol. 65, pp. 430–434.
- 100. **Wul Y., Jial, W., An, Q., Liu, Y., Chen, J., Li, G.** "Multiaction antibacterial nanofibrous membranes fabricated by electrospinning: an excellent system for antibacterial applications". *Nanotechnology.* 2009, Vol. 20, pp. 1-8.



- 101. **Gorup, L.F., Longo, E., Leite, E.R., Camargo, E.R.** "Moderating effect of ammonia on particle growth and stability of quasi-monodisperse silver nanoparticles synthesized by the Turkevich method". *Journal of Colloid and Interface Science*. 2011, Vol. 360.
- 102. [Online] www.gelman.com Gelman sciences.
- 103. **Baker, R. W.,.** "Membrane Technology and Applications". *John Wiley & Sons, Ltd.* 2, 2004, pp. 237-272.
- 104. **Moldoveanu, S.C.** "Sample preparation in chromatography". *Journal of Chromatography Library*. 2002, Vol. 65, p. 425.
- 105. [Online] http://hnncbiol.blogspot.mx/.
- 106. Callister, W. Ingeniería de los materiales. 1995, pp. 55-58.
- 107. **Ludwig Reimer, Helmut Kohl.** "Transmission Electron Microscopy". *Springer.* 5, 2008, pp. 1-3.
- 108. Charles P.Poole Jr., Frank J.Owens, "Introducción a la nanotecnología". 2003, pp. 51-52.
- 109. **Tortora, G., Funke, B., Case, C.** "Introducción a la microbiología". *Medica Panamericana*. 9, 2007, pp. 66-72.
- 110. Walton, H., Reyes, J. "Análisis Químico e Instrumental moderno". 2005, p. 243.
- 111. **Dian He, Bo Hu, Qiao-Feng Yao, Kan Wang, Shu-Hong Yu.** "Large-Scale Synthesis of Flexible Free-Standing SERS Substrates with High Sensitivity: Electrospun PVA Nanofibers Embedded with Controlled Alignment of Silver Nanoparticle". *ACS Nano.* 2009, Vol. 3, 12, pp. 3993-4002.
- 112. **Hong., K. H.** "Preparation and properties of electrospun poly(vinil alcohol)/ silver fiber web as wound dressings". *Polymer engineering and science*. 2007, pp. 43-49.
- 113. **Gupta**, **P.**, **Wilkes**, **G.** "Some investigations on the fiber formation by utilizing a side-byside bicomponent electrospinning approach". *Polymer 44*. 2003, 20, p. 6353.
- 114. 14. Mit-uppatham, C., Nithitanakul, M., Supaphol, P. "Effects of solution concentration, emitting electrode polarity, solvent type, and salt addition on electrospun polyamide-6 fibers: a preliminary report". *Macromolecular Symposia*. 2004, 216, p. 293.
- 115. **Moreno, I.** "Inmovilización de enzimas en nanofibras poliméricas mediante la técnica de electrohilado para su aplicación en biosensores y sistemas de liberación de proteínas". *Tesis de Doctorado*. 2010.
- 116. **Stuart, B.** "Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications". *John Wiley & Sons*. 2004, pp. 18-20.
- 117. **Abraján Villaseñor, M.A.** "Efecto del método de extracción en las características químicas y físicas del mucílago del nopal (opuntia ficus-indica) y estudio de su aplicación como recubrimiento comestible.". *Tesis doctorado. Valencia*, (2008). 2008.
- 118. **Hernández-Urbiola, M., Pérez-Torrero, E., Rodríguez-García, M.** "Chemical Analysis of Nutritional Content of Prickly Pads (Opuntia ficus indica) at Varied Ages in an Organic Harvest.". *Int. J. Environ. Res. Public Health* 8. 2011. Vol. 5, pp. 1287-1295.
- 119. **Cantwell, M., Rodríguez-Felix, A.** "Developmental changes in composition and quality of prickly pear cactus cladodes (nopalitos)". *Plant Foods for Human Nutrition*. 1988, Vol. 38, pp. 83-93.
- 120. Bravo, H.H. "Las cactáceas de México". 1978, Vol. 1.
- 121. **Peña-Valdivia, G., Becerril, A., Beatriz, C.** "Alteraciones fisiológicas provocadas por sequía en nopal (Opuntia ficus-indica).". *Revista Fitotecnia Mexicana*. 2006, Vol. 29, pp. 231-237.
- 122. Villaume, C., Lamghari Kossori, R., El Boustani, E., Sauvaire, Y., Méjean, L. "Composition of pulp, skin and seeds of prickly pears fruit (Opuntia ficus indica sp.)". *Plant Foods for Human Nutrition.* 1998, Vol. 52, pp. 263–270.



- 123. **Lee, JC. Kim, HR., Kim J., Jang, YS.** "Antioxidant Property of an Ethanol Extract of the Stem of Opuntia ficus-indica var. Saboten". *J. Agric. Food Chem.* 2002, Vol. 50, pp. 6490-6496.
- 124. **Medina, L., Vernon, E., Gallegos, J., Rocha, N., Herrera, E., Calderas, F., Jiménez, R.** "Study of the antioxidant properties of extracts obtained from nopal cactus (Opuntia ficus-indica) cladodes after convective drying." *J. Sci. Food Agric.* 2011, Vol. 91, pp. 1001–1005.
- 125. **Aza, M., Méndez, M.** "Extracción de pectina de nopal (Opuntia ficus indica) por medio ácido aplicando dos niveles de temperatura, tiempo y estados de madurez". *Universidad Técnica del Norte Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales*. 2010. Tesis de licenciatura.
- 126. Markham, K. R. Techniques of flavonoid identification. 1982, p. 113.
- 127. **Solomon, S., Bahadory, M., Jeyarajasingam, A., Rutkowsky, S., Bortiz, C.** "Synthesis and study of silver nanoparticles". *JCE 2007 84*. pp. 322-325.
- 128. Ahmad, A., Mukherjee, P., Senapati, S., Mandal, D., Khan, M., Kumar, R., Sastry, M. "Extracellularbiosynthesis of silvernanoparticles using the fungus Fusarium oxysporum". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2003, Vol. 28, 4, pp. 313–318.
- 129. **Cruz, D., Rodríguez, M., López, J., Herrera, V., Orive, A., Creus, A.** "Metallic Nanoparticles and Surface Plasmons: a deep relationship". *Av. Cien. Ing.* 2012, Vol. 3, 2, pp. 67-78.
- 130. **Hu, B., Wang, S., Wang, K., Zhang, M, Yu, S.** "Microwave-assisted rapid facile "green" synthesis of uniform silver nanoparticles: self-assembly into multilayered films and their optical properties". *J. Phys. Chem. C.* 2008, Vol. 112, pp. 11169-11174.
- 131. **Mukherjee, A., Tripathy, A., Raichur, A., Chandrasekaran, N., Prathna, T.** "Process variables in biomimetic synthesis of silver nanoparticles by aqueous extract of Azadirachta indica (Neem) leaves.". *J. Nanopart. Res.* . 2009.
- 132. **Jha, A., Prasad, K.** "Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Cycas Leaf". *International Journal of Green Nanotechnology: Physics and Chemistry.* 2010, pp. 110-117.
- 133. **He, D., Hu, B., Yao, Q., Wang, K., Yu, S.** "Large-Scale Synthesis of Flexible Free Standing SERS Substrates with High Sensitivity: Electrospun PVA Nanofibers Embedded with Controlled Alignment of Silver Nanoparticles". *American Chemical Society.* 2009, Vol. 3, 12, pp. 3993-4002.
- 134. **Pal, S., Tak, Y., Song, J.** "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, Vol. 73.
- 135. **Rico, A., Vilchis, A., Sánchez, V.** "Biosíntesis de nanopartículas de oro mediante el extracto de Opuntia ficus-indica". *Superficies y Vacío 23(S)*. 2010, pp. 94-97.
- 136. **Guzmán, M., Dille, J., Godet, S.** "Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and their antibacterial activity". *International Journal of Chemical and Biological Engineering*. Vol. 2, 3, pp. 104-110.
- 137. **Radhakrishnan, T., Porel, S., Singh, S., Harsha, S., Rao, D.** "Nanoparticle-Embedded Polymer: In Situ Synthesis, Free-Standing Films with Highly Monodisperse Silver Nanoparticles and Optical Limiting". *Chem. Mater.* 2005, Vol. 17, 1.
- 138. **Pellegri, N., Sanctis, O., Frattini, A., Roldán, M.** "Nanoparticles with Different Shapes". *Anales Afa.* Vol. 17, pp. 212-217.
- 139. **Amany A. El-Kheshen, Sanaa F. Gad El-Rab,.** "Effect of reducing and protecting agents on size of silver nanoparticles and their anti-bacterial activity". *Der Pharma Chemica*. 2012, Vol. 4, 1, pp. 53-65.
- 140. **Kim, E., Kim, S., Lee, C.** "Electrospinning of Polylactide Fibers Containing Silver Nanoparticles". *Macromolecular Research.* 2010, Vol. 18, 3, pp. 215-221.
- 141. **Zong, X., Kim, K., Fang, D., Ran, S., Hsiao B., Chu, B.** "Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes". *Polymer.* 2002, Vol. 43, 16, p. 4403.



- 142. Lee, J.S., Choi, K.H., Ghim, H.D., Kim, S.S., Chun, D.H., Kim, H., Lyoo, W. "Role of molecular weight of atactic poly (vinyl alcohol) (PVA) in the structure and properties of PVA nanofabric prepared by electrospinning". *J. Appl. Polym. Sci.* 2004, Vol. 93, pp. 1638-1646.
- 143. **Mbhele, Z., Salemane, M., Sittert, C., Nedeljkovic, J., Djokovic, V., Luyt, A.** "Fabrication and Characterization of Silver-Polyvinyl Alcohol Nanocomposites". *Chem. Mater.* 2003, Vol. 15, pp. 5019-5024.
- 144. **Son, B., Yeom, B., Song, S., Lee, C., Hwang T.** "Antibacterial Electrospun Chitosan/Poly (vinyl alcohol) Nanofibers Containing Silver Nitrate and Titanium Dioxide". *Journal of Applied Polymer Science*. 2008, pp. 2892-2899.
- 145. Yao, L., Haas, T., Guiseppi-Elie, A., Bowlin, G., Simpson, D., E. Wnek, G. "Electrospinning and Stabilization of Fully Hydrolyzed Poly(Vinyl Alcohol) Fibers". *Chem. Mater.* 2003, Vol. 15, 9, pp. 1860-1864.
- 146. **Shrivastava, S., Bera, T.,Roy, A., Singh, G., Ramachandrarao, P., Dash, D.** "Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles.". *Nanotechnology*. 2007, Vol. 18, pp. 1-9.
- 147. **Jeremy Mark Berg, Lubert Stryer, John L. Tymoczko.** "*Bioquímica*". 6. s.l. : REVERTÉ, 2008. p. 233.
- 148. **Rabea, E., Badawy, M., Stevens, C., Smagghe, G., Steurbaut, W.** "Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action". *Biomacromolecules*. 2003, Vol. 4, 6, pp. 1457-1465.
- 149. Carpenter, Philip. "Microbiología". 2. s.l.: INTERAMERICANA, 1969. pp. 139-145.
- 150. **Duran, N., Marcato, P., Alves, O., De Souza, G., Esposito, E.** "Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several Fusarium oxysporum strains". *Journal of Nanobiotechnology*. 2005, Vol. 3, pp. 8-14.
- 151. Rodriguez, E., Parsons, J.G., Peralta Videa, J.R., Cruz-Jimenez., G., Romero, J., Sanchez-Salcido, B., Saupe, G., Duarte-Gardea, M., Gardea –Torresdey, J. "Potential of Chilopsis linearis for gold phytomining: using XAS to determine gold reduction and nanoparticle formation within plant tissues". 2007, Vol. 9, 2, pp. 133-147.
- 152. **Jurate V., Varma R.** "Green synthesis of metal nanoparticles: biodegradable polymers and enzymes in stabilization and surface functionalization". *Chemical Science*. 2010, pp. 1-10.
- 153. Huang, J., Li, Q., Sun, D., Lu, Y., Su, Y., Yang, X., Wang, H., Wang, Y., Shao, W., He, N., Chen, J. "Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried Cinnamomum camphora leaf". *Nanotechnology*. 2007, Vol. 18, pp. 105104/1 105104/1.
- 154. **Parsons, J.G., Peralta Videa, J.R. and Gardea Torresdey, J.L.** "Use of plants in biotechnology: synthesis of metal nanoparticles by inactivated plant tissues, plant extracts, and living plants". *Developments in Environmental Science*. 2007, Vol. 5, p. 4.







# 6.1 Determinación de Azúcares Totales por el Método de Antrona

## **Fundamento**

R. Dreywood en 1946 estableció que la Antrona (9,10-dihidro-9-oxoantraceno) en solución con ácido sulfúrico concentrado (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), reacciona específicamente con muchos carbohidratos generando o produciendo una coloración característica azul-verde. Esta coloración ha sido atribuida a los productos de reacción de hidroximetilfurfural o furfural y la antrona. Esta técnica se basa en el uso de una solución del reactivo de antrona en ácido sulfúrico concentrado el cual se aplica a la muestra disuelta en agua, la cual al ser sometida a ebullición en baño María genera una reacción de color característica cuando existe la presencia de carbohidratos.

## Reactivos

- Glucosa grado reactivo
- Ácido Sulfúrico concentrado (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
- Reactivo de Antrona

#### Preparación de los Reactivos

Solución estándar de Glucosa. Se prepara una solución stock conteniendo 100 microgramos de glucosa/mL. Se preparan de ahí las diluciones correspondientes para preparar la curva de calibración y los estándares en cada uno de los análisis.

Stock de Ácido Sulfúrico. Este se prepara utilizando 750 mL de ácido y 250 mL de agua destilada. Como nota adicional, también se puede utilizar ácido sulfúrico concentrado en la preparación del reactivo.

*Reactivo de Antrona*. El reactivo se prepara adicionando 5 mL de etanol absoluto en un matraz de aforación de 100 ml, agregar 200 mg del reactivo de Antrona y aforar a 100 mL con el ácido al 75



% o con el ácido sulfúrico concentrado. Agitar hasta que se disuelva (es importante evitar la presencia de partículas flotantes de antrona sin disolver).

NOTA: El reactivo de Antrona se debe preparar unas horas antes de efectuar la prueba para que se active, se debe mantener en hielo hasta su uso y protegido de la luz. La incorporación de etanol en el reactivo se debe a que se estabiliza el color del reactivo que de otra manera tiende a debilitarse. *Observaciones: el reactivo de antrona presenta un color amarillo traslucido*.

## Curva de calibración

Para obtener la curva de calibración se prepara una solución stock de glucosa conteniendo 1000 μg/mL. Esto se obtiene pesando 0.1 g de glucosa en 100 mL de agua destilada. A partir de esta solución stock se preparan los estándares siguientes:

Solución stock (mL)	Agua destilada (mL)	Concentración estándar (µg/mL)
0.1	10	10
0.3	10	30
0.6	10	60
0.9	10	90
1.2	10	120

Nota: Se tomó de la solución stock el volumen correspondiente y se aforó a 10 mL en cada estándar.

Tomar 1 mL de la muestra preparada con 5 mg de material vegetal en 10 mL de agua destilada. Al mismo tiempo preparar un blanco de reactivo conteniendo 1 mL de agua destilada.

## Procedimiento

- 1.- Pipetear 1 mL de la muestra o de una solución estándar de glucosa. En el caso de las muestras menores a 1 mL, aforar a este volumen. Al mismo tiempo se prepara un blanco de reactivo conteniendo 1 mL de agua destilada.
- 2.- Los tubos conteniendo 1 mL de muestra se enfrían en una gradilla sumergida en agua y hielo, al igual que el reactivo de antrona. Cuando este la muestra se encuentre fría, añadir a los tubos 5 mL del reactivo de antrona manteniéndolos en agua fría y rotando el tubo durante la adición.





Observaciones: Al añadir el reactivo de antrona a los tubos que contienen la muestra de extracto, estos tornan una coloración amarillenta, formándose en la superficie una capa blanca, después de poco tiempo la tonalidad blanca cambia a un color azul que al mezclarse con la coloración amarilla produce un color verde claro.

- 3.- Después de mezclar, dejar en reposo durante 10 minutos.
- 4.- Pasar los tubos a un baño de agua hirviendo y calentar durante 10 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, enfriar en baño de agua y hielo.
  Observaciones: Las muestras cambian de color verde claro a un color entre verde y azul (oscuro)
- 5.- Tomar las lecturas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 625 nm, utilizando celdillas de 1 cm y tomando como referencia el blanco de reactivos.

## Cálculos

La concentración de azúcares presentes en la muestra se obtendrá extrapolando las lecturas de absorbancia obtenidas en la curva de calibración preparada.

## Referencias

1.-Herbert, D., Philips P. J. and Strange R.E. "Chemical analysis of microbial cells. Methods in Microbiology". Academic Press, London, (1971), Vol. 5B.

# 6.2 Determinación de Sólidos Insolubles y Totales

El análisis de sólidos totales se efectúa pesando 0.5 g de extracto seco en un vaso de precipitado de 80 mL y disolviéndolo en 10 mL de agua desionizada. La solución preparada es agitada de 30 minutos a 1 hora para posteriormente centrifugarla a 14,000 rpm durante 15 minutos.

Al finalizar el proceso de centrifugación, se observa la formación de dos fases en la muestra: sobrenadante (fase líquida) e insoluble (fase sólida).





El sobrenadante es retirado de la muestra y se vacía en otro recipiente, mientras que la parte insoluble situada en el fondo del tubo se diluye en 10 mL de agua y se dispersa para centrifugarla nuevamente.

Este procedimiento se realiza dos veces, y el sobrenadante e insoluble recolectado en cada etapa se congela para posteriormente secarlos en el liofilizador y después determinar el peso de sólidos solubles e insolubles respectivamente.

## 6.3 Determinación de Fenoles Totales

Los fenoles son grupos heterogéneos de sustancias naturales caracterizados por anillos aromáticos junto con uno o más grupos hidroxilo. El número de fenoles identificados hasta la fecha excede los 100,000 (Waterman & Mole 1994). Los fenoles pueden contener monómeros como grupos hidroxilo. El método de Folin- Ciocalteu se basa la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin- Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolíbdico-fosfotúngstico. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolíbdico-fosfotúngstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno y molibdeno, siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula.

#### Curva de calibración

1.- Preparar una solución stock de 25 mg de ácido tánico en 100 mL de acetona (30% de agua, 70% acetona).

Solución Stock (mL)	Agua (mL)
0.2	0.8
0.4	0.6
0.6	0.4
0.7	0.3
0.8	0.2
0.9	0.1
1.0	0





- 2.- Añadir 5 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 2 % w/V en 0.1 N de NaOH y mezclar.
- 3.- Después de 5 minutos, añadir 0.5 mL de reactivo de Folin- Ciocalteu y mezclar.
- 4.- Después de 120 minutos leer a 760 nm de absorbancia.
- 5.- Graficar concentración de ácido tánico vs absorbancia.

#### Medición

- 1.- Pesar aproximadamente 100 mg de material vegetal y transferir a tubos eppendorf.
- 2.- Extraer fenoles con 5 mL de acetona al 70% durante 1 hora a 4°C.
- 3.- Centrifugar a 15,000 rpm a 10°C durante 15 minutos.
- 4.- Tomar 0.1 mL del sobrenadante y completar a 1 ml con agua destilada.
- 5.- Después de 10 minutos, agregar 5 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y 0.5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu.
- 6.- Después de 120 minutos, leer a 760 nm la absorbancia de la muestra.
- 7.- Los cálculos se realizan utilizando los valores de absorbancia correspondientes a la muestra y utilizando la ecuación lineal de la curva de calibración.

## Referencias

2.- M.A.S Graca, F. Bärlocher, M.O. Gessner "Methods to Study Litter Decomposition: a practical Guide" Springer, (2005), pp 97-100

## 6.4 Determinación de proteína total (método de microkjeldahl)

La muestra se oxida por calentamiento en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, de tal manera que los compuestos que contienen N<sub>2</sub> se convierten en sulfato ácido de amonio (NH<sub>4</sub>)HSO<sub>4</sub>, del cual se desprende el amoniaco, alcalinizando y destilando la solución. El amoniaco liberado y absorbido en ácido bórico, se titula con una solución valorada de ácido mineral.

## Procedimiento

Pesar 0.2 g de la muestra homogeneizada y colocarla en el matraz microkjeldahl de 100 mL. Añadir 1.3 g de mezcla reactiva de selenio. Agregar 5mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Colocar los matraces en el digestor (Labconco). Poner la mezcla a ebullición suave hasta total digestión, la cual se reconoce cuando la muestra adquiere una coloración verde claro sin tintes amarillos, generalmente se completa en una hora.





Enfriar el producto y diluir con 10 mL de agua destilada. Posteriormente se transfiere al matraz de destilación enjuagando con 2 o 3 porciones de agua destilada.

Colocar el refrigerante de manera que el extremo del condensador quede sumergido en la solución fijadora (20 mL de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> con 2-3 gotas de indicador). Por el embudo muestreador se añaden 15 mL de NaOH al 67% al matraz destilación enjuagando con 5 mL de agua destilada. Bajar el matraz receptor hasta que el extremo del condensador quede sobre la solución fijadora y continuar destilando durante un minuto más, lavar el extremo del condensador con agua destilada. Enjuagar el microkjeldahl con dos porciones de 5 mL de agua destilada.

Titular con solución valorada de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1N, la solución cambia de color verde a violeta. Titular un blanco que haya sido sometido a todo el procedimiento, utilizando los mismos reactivos con la muestra.

% 
$$N = (V_1 - V_2)N (0.0114)(100)/W$$
  
% Proteína = (%N)(6.25)

 $V_1$ : mL de  $H_2SO_4$  gastados en la titulación del producto.

V<sub>2</sub>: mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gastados en el blanco

N: normalidad del  $H_2SO_4$ 

W: peso en gramos de la muestra

## 6.5 Determinación de Proteína Soluble

El ensayo de proteína de Bio-rad es un ensayo obligatorio de coloración basado en el cambio diferencial de color en respuesta a varias concentraciones de proteína. En usos de investigación recomiendan a este ensayo como un remplazo para otros ensayos de proteína, sobre todo el método de Lowry extensamente usado, para varios motivos:

- 1.- El ensayo Bio-rad es mucho más fácil de usar. Esto requiere un reactivo y de 5 minutos para funcionar, comparado con otros reactivos de 30 y 40 minutos típicos como el ensayo de Lowry.
- 2.- Porque el complejo de proteína es relativamente estable, el ensayo de bio-rad no requiere el engranaje de distribución crítico para Lowry.





3.- El ensayo de Bio-rad es libre de la mayor parte de las interferencias que limitan el uso de Lowry.

El método de Biorad se basa en la observación de la absorbancia máxima por la solución ácida azul brillante de Comassie, los cambios de 465 a 595 nm ocurren capturando la proteína.

#### Muestra

Pesar 2 mg de BSA (Albúmina Sérica Bovina) y disolver en 10 mL de agua, de esa solución tomar 1 mL y disolver en 10 mL de agua, para obtener una concentración de 2 μg/mL de proteína.

En todos los casos se agregan 0.2 mL de concentrado de Biorad para la obtención de la concentración de proteína. Los datos son llevados a gráfica y la ecuación obtenida es utilizada para el cálculo de la misma.

La medición de la absorción se lleva a cabo a una longitud de onda de 595 nm.

## 6.6 Determinación de Pectina

Se prepara una muestra de 50 g de extracto de nopal parcialmente seco y pulverizado, a la cual se le adiciona agua destilada hasta completar un litro de solución. La mezcla se agita constantemente y se añade HCl hasta ajustar el pH a 2-3.

Posteriormente la mezcla se somete a calentamiento durante 60 minutos a 85 °C con agitación constante para evitar que los materiales sólidos precipiten. Enseguida la mezcla se filtra usando un papel filtro, presionando suavemente para separar el material sólido del líquido. La fracción líquida se enfría rápidamente por debajo de 25°C para minimizar la degradación térmica de la pectina y se centrifugó en tubos cubiertos durante 10 minutos a 3000 rpm. Se adiciona etanol 95% al sobrenadante mediante agitación lenta y constante. La mezcla permanece en reposo durante 1 hora.

La pectina es separada de la solución mediante filtración con papel filtro. El papel filtro se lava en un recipiente con etanol y se coloca en una caja de Petri. La caja Petri se dispone en una estufa de secado a una temperatura de 40°C. Se monitorea el peso del papel filtro hasta obtener un peso constante.





El porcentaje de pectina se obtiene de la diferencia del peso del papel filtro vacío con el peso del papel filtro seco con la muestra.

# 6.7 Proceso de Ultrafiltración

En el proceso de ultrafiltración, la solución que contiene los componentes a separar se hace fluir con una presión tangencial a las paredes de la membrana de fibra hueca. Las moléculas con un tamaño promedio igual o menor al poro de la membrana, consiguen atravesarla permitiendo su separación del resto de las moléculas de mayor tamaño que permanecen en la solución madre. La solución de la fracción con moléculas de menor tamaño se conoce como "permeado", y la solución con las moléculas que no atraviesan el poro de la membrana de fibra hueca se le llama "retenido" (Figura 6.1).

En general el proceso de ultrafiltración precisa de una fuerza impulsora que ayude a las partículas o moléculas a fluir a través de los poros de la membrana. En este proceso se utilizó como fuerza impulsora el gradiente de presión, originado entre la presión ejercida por la bomba peristáltica ubicada en la línea de entrada; la cual permitió el desplazamiento de la muestra de extracto hacia la membrana, y la presión realizada por la válvula localizada en la línea de salida hacia el retenido; con la que fue posible regular el flujo de permeado y retenido.

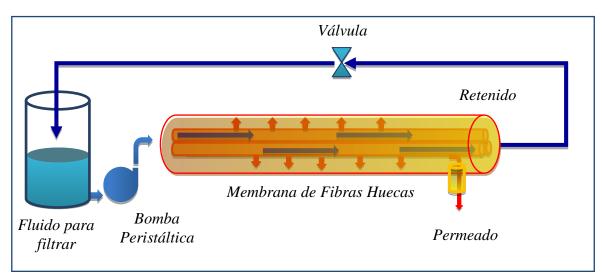


Figura 6.1.- Esquema del sistema de ultrafiltración empleando membranas de fibra hueca.