



# **UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

## **FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA**

### **TESIS**

**DESARROLLO DE CALZADO INNOVADOR, MODELO  
NANOPLATA PARA PIE DIABÉTICO, PACIENTES CON VIH/SIDA  
Y DIVERSAS PATOGENIAS, QUE REDUCE LA CANTIDAD DE  
AMPUTACIONES DE PIES EN PACIENTES INMUNOSUPRIMIDOS**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

**PRESENTA**

**ELMER PINEDA MARTÍNEZ**

**ASESORA:**

**DRA. NINA BOGDANCHIKOVA**

**MORELIA, MICHOACÁN, MÉXICO. JUNIO DE 2011**



**ESCUELA DE  
QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA**

## **SITIO DONDE SE DESARROLLO LA TESIS**

Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNyN), departamento de Físico-química de Nanomateriales, Ensenada, Baja California Norte, México

Dra. Nina Bogdanchikova

Asesor

Dr. Carlos Cortes Penagos

Coasesor

P. Q. F. B. Elmer Pineda Martínez

Tesista

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a la Dra. Nina Bogdanchikova por su gran apoyo y muy valiosa amistad, es para mí un gran orgullo el ser aceptado para colaborar en su laboratorio de investigación y haber sido asesorado por investigadores de gran talento, sencillez y calidad humana como la Dra. Nina. No solo yo estoy orgulloso de conocerte y colaborar contigo Nina, sino el país entero debe de estar orgulloso de contar con investigadores tan capaces como tú, colaborando para su servicio.

A mi compañera Gloria Alejandra Amaya Corona por su incondicional apoyo y esfuerzo por terminar esta investigación exitosamente, ha sido un placer trabajar a un lado de estudiantes tan brillantes y amistar con excelentes personas tan sinceras como Gloria.

Agradezco también al Programa Universitario Jóvenes a la Investigación del Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la UNAM campus Ensenada Baja California Norte, por la beca otorgada para apoyarme a realizar esta investigación y por la motivación que se le da al estudiante.

Agradezco de la misma forma a las personas que apoyaron para que esta investigación fuera exitosa, que son personas muy finas y serviciales como: Tec. Eric Flores Aquino del Laboratorio de Catálisis, CNyN., Tec. Israel Gradilla Martínez, Laboratorio SEM, CNyN y Tec. Mario Vega Aguilar, Geofísica, CICESE. Por último Ing. Mayra Ramírez, Bio. Jovanni Catalán del CICESE.

Agradezco especialmente a las personas que me apoyaron a mi pronta titulación y por su muy valiosa amistad al Dr. Carlos Cortez Penagos, Rafael Ortiz Alvarado, M. C. María del Rocío Lara Madrigal, Q. F. B. Ma. Rebeca Tinoco Martínez y Q. F. B. Raúl Chávez Garibay.

Finalmente agradezco con el corazón a mis padres, hermanos y a la mujer con quien he compartido un gran amor., por su constante motivación y apoyo durante mi carrera universitaria, les agradezco por confiar siempre y ser la fuerza que gobernaba mi ser, les estaré toda mi vida infinitamente agradecido.

## **DEDICATORIAS**

Con mucho cariño les dedico este trabajo a mis padres y hermanos, este trabajo que he realizado con amor, porque con amor me enseñaron a lograr las cosas, debido a que me gozo por terminar esta etapa de mi formación también les dedico mi gran gozo y alegría. A ti papá te dedico este y todos mi logros ya que me siento muy orgulloso porque la vida me regalo el padre al cual presumo por su inteligencia, sencillez y un sin fin de dones que la vida te ha otorgado para guiar a tus hijos por ese mismo sendero, gracias papá te amo y eres mi más grande orgullo. A ti mamá porque me has enseñado una vida de amor y has demostrado que con amor, ni el camino más tenebroso es lo suficientemente fuerte para derribar al portador de este, gracias mama por ser mi luz y mi fuerza cuando esta ha estado a punto de desvanecer, te amo mama y siempre estaremos unidos en ese amor y esa luz inquebrantable. A ustedes hermanos que fuimos forjados con el mismo amor e inteligencia tan valiosos que nos hacen una sola fuerza, a ustedes les dedico mi trabajo, ya que ustedes trabajaron para dedicarme esta vida. Te dedico también a ti Ivonne mi logro máximo hasta hoy realizado por que eres merecedora de los mejores logros que yo pueda alcanzar, gracias amor por darme la mejor motivación existente a mi vida que es tu amor y compañía. Les dedico a ustedes esta tesis que fue para mí un trabajo que realice con amor y dedicación, porque amor es lo que quiero para ustedes.

## **TABLA DE CONTENIDOS**

|                     |   |
|---------------------|---|
| RESUMEN .....       | 1 |
| JUSTIFICACIÓN ..... | 2 |
| OBJETIVOS .....     | 4 |

### **CAPÍTULO I**

#### **OBTENCIÓN DE CUERO DE GANADO BOVINO Y PORCINO**

##### **METODO DE CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS**

|                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------|----|
| 1.1 Historia y primeras aplicaciones de calzado de cuero ..... | 6  |
| 1.2 Estructura de la piel .....                                | 7  |
| 1.3 Zonas en que se divide y corta la piel .....               | 8  |
| 1.4 Conservación o curado de los cueros .....                  | 10 |
| 1.5 Procesos para lograr el curtido del cuero .....            | 11 |
| 1.6 Industria del calzado .....                                | 15 |
| 1.6.1 Proceso .....                                            | 15 |
| 1.7 Impregnación de nanopartículas de plata al cuero .....     | 16 |

## **CAPÍTULO II**

### **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y**

### **ACTIVIDAD OLIGODINÁMICA DE NANO-PLATA**

|                                                                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1 Síntesis de nanopartículas de plata .....                                                                                       | 20 |
| 2.1.1 Electroquímica de la síntesis de nanopartículas<br>de plata .....                                                             | 21 |
| 2.1.2 Síntesis de nanopartículas de plata con formas<br>de escamas .....                                                            | 25 |
| 2.1.3 Preparación de nanopartículas de plata por el<br>método de pulso sonoelectroquímico y estudio de sus<br>características ..... | 28 |
| 2.2 Actividad oligodinámica de las nanopartículas de plata .....                                                                    | 33 |
| 2.2.1 Efectos antimicrobianos de nanopartículas de<br>plata en levaduras, bacterias Gram-positivas y Gram-<br>negativas .....       | 35 |
| 2.2.2 El efecto bactericida de las nanopartículas de<br>plata .....                                                                 | 38 |
| 2.2.3 Interacción de las nanopartículas de plata con<br>el VIH-1 .....                                                              | 42 |

## **CAPÍTULO III**

### **ESTUDIO DE LAS ESPECIES DE PLATA SOPORTADAS EN CUERO, POR ESPECTROSCOPÍA DE REFLACTANCIA DIFUSA UV-vis Y ESPECTROSCOPÍA DE EMISIÓN ATÓMICA (ICP)**

|                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1 Muestra de cuero impregnado con nanopartículas de plata .....                    | 50 |
| 3.1.1 Resultados obtenidos por espectroscopía de<br>reflectancia difusa UV-vis ..... | 52 |
| 3.2. Proceso de dilución de cuero .....                                              | 54 |
| 3.3 Resultados obtenidos por espectroscopía de emisión<br>atómica ICP .....          | 55 |
| 3.4 Conclusión del capítulo .....                                                    | 56 |

## **CAPÍTULO IV**

### **CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES POR MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMICIÓN (SEM)**

|                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.1 Estudio de la porosidad y estructura del cuero de<br>ganado bovino y porcino por SEM .....            | 59 |
| 4.2 Estudio de la distribución e impregnación de las<br>Nanopartículas de plata en el cuero por SEM ..... | 61 |
| 4.3 Conclusiones del capítulo .....                                                                       | 65 |

## CAPÍTULO V

### VALORACIÓN PRELIMINAR DEL CUERO IMPREGNADO CON IONES, CÚMULOS Y NANOPARTÍCULAS DE PLATA SOBRE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* Y *CÁNDIDA ALBICANS*

|                                                                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.1 Actividad microbici da de las muestras de cuero tratadas<br>previamente con nanopartículas de plata frente a<br><i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....  | 67 |
| 5.2 Actividad microbici da de las muestras de cuero tratadas<br>previamente con nanopartículas de plata frente a <i>Cándida</i><br><i>albicans</i> ..... | 69 |
| 5.3 Conclusión del capítulo .....                                                                                                                        | 71 |

## APÉNDICES

|                    |    |
|--------------------|----|
| Apéndice I .....   | 74 |
| Apéndice II .....  | 77 |
| Apéndice III ..... | 80 |
| BIBLIOGRAFIA ..... | 85 |

# **LISTA DE FIGURAS**

## **CAPÍTULO I**

### **OBTENCIÓN DE CUERO DE GANADO BOVINO Y PORCINO**

#### **METODO DE CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS**

|     |                                                                                                                                                                            |    |
|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.1 | Corte esquemático de la piel .....                                                                                                                                         | 7  |
| 1.2 | Partes en las que se corta y divide la piel .....                                                                                                                          | 8  |
| 1.3 | Cortes del cuero para la producción de rorros a) Media piel u<br>hoja, b) Desfaldado o dosset, c) Hoja desfaldada .....                                                    | 9  |
| 1.4 | Cortes de cuero, los cortes son de 1gr de peso en seco (1), los<br>cuales posteriormente se sumergen en agua para ser pesados<br>y ver su capacidad de absorción (2) ..... | 17 |

## **CAPÍTULO II**

### **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

#### **SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y**

#### **ACTIVIDAD OLIGODINÁMICA DE NANO-PLATA**

|     |                                                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|-----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1 | La voltametría cíclica curvas realizadas en la solución<br>$\text{NaNO}_3\text{-C}_2\text{H}_5\text{OH}$ para los electrodos de Ag y Pt con una tasa<br>de 1V/min (0,01667V/s). Las exploraciones con<br>compensación de la resistencia del sistema están marcadas ..... | 23 |
|-----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |       |
|------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 2.2  | Cronoamperometrica curvas de polarización de la plata en $\text{NaNO}_3 \cdot \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ el potencial 400mV, 600mV y 800mV. Tomada durante dos potenciales más altos en promedio de dos exploraciones .....                                                                                                                                                                                                                                                                                | 23    |
| 2.3  | TEM análisis de las partículas obtenidas por el método de galvanostático .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 24    |
| 2.4  | Patrón típico de difracción de rayos X de una muestra de plata obtenido .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 26    |
| 2.5  | TEM y SEM imágenes de muestras de plata obtenida después de la reacción de: 30 minutos (a), 1 h (b), y 3 h (c, d), y el histograma de distribución de tamaño .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 27-28 |
| 2.6  | Esquema del montaje experimental .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 29    |
| 2.7  | Imágenes de TEM de partículas de plata obtenida por tratamiento sonoelectroquímico pulsado por diferentes duraciones de 1g/L $\text{AgNO}_3$ y 40g/L de solución de $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$ : a) 5 minutos, b) 15 minutos .....                                                                                                                                                                                                                                                       | 31    |
| 2.8  | La distribución de tamaño medido a partir de micrografías TEM en la Figura 2.7 .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 31    |
| 2.9  | En espectroscopía UV-VIS los espectros de absorción de las nanopartículas de plata en solución acuosa con el tiempo de electrosonicación de 15 minutos: a) 1g/L $\text{AgNO}_3$ y 40g/L de $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$ , b) 5g/L $\text{AgNO}_3$ y 40g/L de $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$ , c) 5g/L y $\text{AgNO}_3$ 20g/L y $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$ , d) 5g/L $\text{AgNO}_3$ y $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$ 10g) ..... | 32    |
| 2.10 | A) Una imagen de TEM de las nanopartículas de Ag dispersas en una rejilla de cobre (una variación en la escala de 30 nm). B) Un histograma que muestra la distribución del tamaño de las nanopartículas de Ag .....                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 36    |
| 2.11 | a) Bacterias cultivadas en placas de agar a diferentes concentraciones de nanopartículas de plata. Arriba a la                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |       |

izquierda, la *E. coli*, superior derecha, *S. tifus*; abajo a la izquierda, *P. aeruginosa*, y abajo a la derecha, el *V. cholerae*. 0 g / ml<sup>-1</sup>(superior izquierda), 25 mg ml<sup>-1</sup> (superior derecha), 50 mg ml<sup>-1</sup> (abajo izquierda) y 75 mg ml<sup>-1</sup> (inferior derecha). HAADF-MADRE imágenes que muestran la interacción de las bacterias con las nanopartículas de plata: b) de *E. coli*, c) *S. tifus*, d) *P. aeruginosa* y e) de *V. cholerae*. Las inserciones corresponden a las imágenes de mayor

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| aumento .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 39 |
| 2.12 a) Envío: una presencia considerable de las nanopartículas de plata se encuentra en la membrana y el interior de una muestra de <i>E. coli</i> . Derecha: EDS mapeo elemental. Se puede observar que la plata está bien distribuida a través de la muestra. b) Un primer plano del interior de una muestra de <i>E. coli</i> tratadas con nanopartículas de plata. Una vez más, la presencia de nanopartículas de plata se observa .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 40 |
| 2.13 Nanopartículas de plata de los preparativos. a) una imagen en TEM de nanopartículas de plata la superficie libre de carbono liberado de la espuma de la matriz de dispersión como la recibida en polvo disuelta en agua desionizada por ultrasonificación. b) La distribución de tamaño de la superficie de las nanopartículas sin ser medida por el análisis de TEM. c) El espectro UV-visible de las nanopartículas de plata recubierta de carbono. d) la imagen HAADF de nanopartículas de plata PVP revestido. e) Distribución de tallas de las nanopartículas recubiertas con PVP medidas por el análisis de TEM. f) El espectro UV-visible de las nanopartículas de plata recubiertas con PVP. g) la imagen HAADF de nanopartículas de plata revestidas con BSA. h) Distribución de tallas de las nanopartículas BSA recubierto medido por el análisis de TEM. i) El espectro UV-visible de las nanopartículas de plata BSA-revestido ..... | 43 |
| 2.14 HAADF imágenes de los virus VIH-1. a) Una imagen por HAADF de un virus VIH-1 expuestos a las nanopartículas de plata conjugados con BSA. El recuadro muestra la disposición regular espacial entre grupos de tres nanopartículas. b) la imagen por HAADF del virus VIH-1 sin                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |

tratamiento de nanopartículas de plata. El recuadro de relieve y la disposición espacial regular observada en la superficie de los virus VIH-1 no tratados. c) análisis de EDS de la imagen a) confirman la presencia de Ag. La señal C proviene tanto de la red MET y el virus, O y P son a causa del virus, y Na, Cl y K están presentes en el medio de cultivo. Ni y Si vienen de la red MET, mientras que Cu se atribuye al titular de la muestra. d) la distribución de tamaño compuesta de las nanopartículas de plata unidas al virus VIH-1, se

derivan de todas las preparaciones de la prueba ..... 45

- 2.15 La inhibición del VIH-1 y los datos de toxicidad. a) Evaluación del VIH-1 mediada por la formación de sincitios en células MT-2. b) El porcentaje de transmisión del VIH-1 en células cMAGI. La toxicidad de los preparados de nanopartículas contra células MT-2 se determinó utilizando el ensayo de azul tripán exclusión. Las muestras fueron incubadas a 37 ° C, y las células se evaluó a través de microscopía óptica tras c) 3 h, y d) 24 horas de exposición a las nanopartículas de plata ..... 48

## CAPÍTULO III

### ESTUDIO DE LAS ESPECIES DE PLATA SOPORTADAS EN CUERO, POR ESPECTROSCOPÍA DE REFLACTANCIA DIFUSA UV-vis Y ESPECTROSCOPÍA DE EMISIÓN ATÓMICA (ICP)

- 3.1 La grafica muestra sola mente salida de cationes y cúmulos de plata del líquido analizado posterior al baño en cuero duro llamado de esta forma por el tratamiento de curtido del cuero ..... 52
- 3.2 La grafica muestra solamente salida de cationes, cúmulos y una nula cantidad de nanopartículas de plata del líquido analizado posterior al baño en el cuero suave llamado de esta forma por el tratamiento de curtido del cuero ..... 53

|     |                                                                                                                     |    |
|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.3 | La grafica muestra las diversas zonas de identificación de una muestra con cromo (CR) tomada de la literatura ..... | 54 |
|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## **CAPÍTULO IV**

### **CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES POR MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMICIÓN (TEM)**

|     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |       |
|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 4.1 | La micrografía tomada con SEM muestra la cara posterior o epidermis de la muestra del cuero, donde se observan poros e imperfecciones estructurales propias de la piel al igual que una escala micrométrica para poder apreciar las dimensiones de los poros que pueden ser medidos en micrómetros ( $\mu\text{m}$ ) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 60    |
| 4.2 | La micrografía tomada con SEM muestra la cara anterior o dermis de la muestra del cuero, donde se observan numerosas hebras de material orgánico dando un aspecto de madeja de hilo, al igual que gran cantidad de espacios o intersticios, la medición micrométrica marcada a 200 $\mu\text{m}$ nos permite apreciar las dimensiones de los intersticios que pueden ser medidos a excepción de la profundidad de estos .....                                                                                                                                                                                                                                                     | 60    |
| 4.3 | Las micrografías tomadas con SEM muestran la cara posterior o epidermis del cuero impregnado con nanopartículas de plata, que se muestran de un color blanco o plata y pequeñas formaciones de cristales no identificados. Las porosidades presentes en al cuero no son muy apreciables pero se estima encontrar en esos puntos gran cantidad de nanopartículas de plata. En la imagen a) se muestra una uniformidad de distribución de nanopartículas. En la imagen b) se muestra la misma uniformidad de distribución de nanopartículas y pequeñas zonas más brillantes marcadas con flechas que son acumulaciones masivas de nanopartículas debido a los poros del cuero ..... | 61-62 |

|     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.4 | Las micrografías a y b tomadas con SEM muestran la misma muestra solo que la micrografía A) fue tomada con electrones secundarios mientras que la micrografía B) fue tomada con electrones retro dispersados, para indicar las zonas y datos más significativos                                                                                                   | 63 |
| 4.5 | Las micrografías A Y B tomadas con SEM muestran la misma imagen del cuero tratado con nanopartículas de plata por impregnación con una solución de plata coloidal. La micrografía A tomada microscopio electrónico de transmisión con electrones secundarios y la micrografía B tomada con microscopio electrónico de transmisión con electrones retrodispersados | 64 |

## CAPÍTULO V

### VALORACIÓN PRELIMINAR DEL CUERO IMPREGNADO CON IONES, CÚMULOS Y NANOPARTÍCULAS DE PLATA SOBRE PSEUDOMONAS AERUGINOSA Y CÁNDIDA ALBICANS

|     |                                                                                                                                                                                                                                                                    |    |
|-----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.1 | Cultivos de la bacteria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : a) Muestra de un cuero duro tratado con nano-Ag, b) Muestra de un cuero suave con nano-Ag presentando un halo de inhibición bacterial                                                                      | 68 |
| 5.2 | Cultivo de <i>Cándida albicans</i> . a) Muestra del cuero duro tratado con nanopartículas de plata, sin observar efecto fungicida, b) Muestra de un cuero blando tratado con nanopartículas de plata, obteniendo un ambiente óptimo para el crecimiento de Cándida | 70 |

# APÉNDICES

## Apéndice I

|     |                                                          |    |
|-----|----------------------------------------------------------|----|
| A-1 | Equipo UV-visible Cary 300 Scan .....                    | 74 |
| A-2 | Diagrama de un espectrofotómetro UV-Visible típico ..... | 75 |

## Apéndice II

|     |                                              |    |
|-----|----------------------------------------------|----|
| A-3 | SEM JSM-5300 .....                           | 77 |
| A-4 | Esquema de tipo de electrones emitidos ..... | 79 |

## Apéndice III

|     |                                                                                            |    |
|-----|--------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| A-5 | Excitación electrónica de los átomos para su identificación por ICP .....                  | 81 |
| A-6 | Imagen del plasma mostrando sus temperaturas emitidas .....                                | 82 |
| A-7 | Instrumentación de un Espectrómetro de Emisión con fuente de Plasma de Inducción ICP ..... | 83 |

## LISTA DE TABLAS

|     |                                                                                     |    |
|-----|-------------------------------------------------------------------------------------|----|
| I   | Diferencia de pesos un cantidad de agua absorbida por el cuero .....                | 17 |
| II  | Concentración de plata absorbida por muestra con ICP en un cuero<br>sin lavar ..... | 56 |
| III | Concentración de plata absorbida por muestra con ICP en un cuero<br>Lavado .....    | 56 |
| IV  | Elementos capaces de ser detectados por ICP .....                                   | 81 |

## RESUMEN

Este trabajo corresponde a la descripción de la aplicación de cúmulos y nanopartículas metálicas sobre forros de cuero bovino y porcino, materiales que son utilizados en el desarrollo de calzado especializado para usuarios diabéticos y contribuir con el cuidado del pie diabético.

Se establecieron las condiciones para determinar los tamaños de nanopartículas de plata. Soluciones coloidales de plata fueron empleadas como baños para la impregnación de cuero bovino. Técnicas instrumentales de reflectancia difusa UV-vis (ERD UV-vis), espectroscopia de absorción atómica (ICP), microscopia electrónica de barrido (SEM) fueron empleadas para valorar la cantidad y tipo de partículas de plata, así como la distribución en el cuero bovino. Los estudios de ERD UV-vis corroboran que el cuero bovino quedó impregnado de nanopartículas, cúmulos, y cationes de plata. El análisis por ICP identificó la concentración de 1.87 ppm de plata/1cm cuero. Las micrografías obtenidas por SEM mostraron que los poros del cuero bovino oscilan en 100 nm con impregnación de nanopartículas de plata fueron de 10 nm y se depositaron en una película en la superficie del cuero.

El efecto inhibitorio de las nanopartículas de plata impregnadas en el cuero bovino sobre el crecimiento de bacterias *Pseudomonas aeruginosa* y la levadura *Cándida albicans* fueron valorados encontrando efecto inhibitorio solo sobre *Pseudomonas aeruginosa*.

## JUSTIFICACIÓN

La plata es un metal con diversos usos desde metalúrgicos hasta en médicos. Reducir el tamaño de las partículas de los materiales es eficaz y fiable para mejorar su biocompatibilidad con microorganismos. La nanotecnología es una ciencia promisoría en las posibles aplicaciones de metales y biopartículas en diversos campos científicos. Por otra parte, los nanomateriales pueden ser modificados para una mayor eficacia y aplicación en diferentes campos [1]: como la actividad oligodinámica de la plata respecto a su efectividad como agente bactericida, fungicida y algunas citas de aplicaciones antivirales de las nanopartículas de plata [2]. Es bien sabido que los iones Ag y compuestos tienen fuertes efectos antimicrobianos [3], y muchos investigadores están interesados en el uso de otras nanopartículas inorgánicas como agentes antibacterianos [4-3-5]. Estas nanopartículas inorgánicas tienen una clara ventaja sobre los agentes químicos antimicrobianos convencionales. El problema más importante causado por los agentes químicos antimicrobianos es resistencia a múltiples fármacos. Varios microorganismos han desarrollado resistencia a los medicamentos durante muchas generaciones [1]. Los materiales inorgánicos resultan ser tóxicos para los microorganismos a concentraciones 1000 veces menores que los niveles a los cuales resulta tóxica para los mamíferos. Las condiciones de formación (iones + y -, cúmulos y nanopartículas) y estabilidad de estas especies es un tema de investigación actual en esta era de la nanotecnología.

La piel de ganado bovino y porcino al igual que en la mayoría de los mamíferos corresponde a una estructura biológica, constituidas principalmente por una red continua de células epiteliales, poros y queratina entre otros, con propiedades de adsorción e intercambio iónico no mencionadas en literatura [6]. Los rasgos distintivos de los cueros son: la presencia de vacíos interiores con canales de dimensiones macromoleculares, con irregularidades en la forma y tamaño de estos poros y un orden en la distribución de los poros sobre toda la dermis del animal. El efecto microbicida de los cueros que contienen iones metálicos y nanopartículas de plata con propiedades oligodinámicas no se encuentra reportado en la literatura, ya que la utilización de cuero y nano-Ag como bactericida es un

tema actual. El estudio de los cueros como matrices o soportes en aplicaciones biomédicas es una de las líneas de investigación del laboratorio donde se realizó el proyecto, encaminada a soportar en los cueros diferentes especies activas con el objetivo de lograr la estabilidad y su liberación al medio. La posibilidad de utilizar el cuero de ganado bovino y porcino procedente de León Guanajuato México como materia prima para el desarrollo del nuevo calzado de interés para la industria médico-farmacéutica e incluso médico-ortopédica, que se encuentra bien estudiada por el Centro de Innovación Aplicada en Tecnologías Competitivas (CIATEC) evaluando las propiedades de microbicida como una línea de trabajo que de soporte a la aplicación en el calzado especializado para usuarios con diabetes.

La hipótesis de que el cuero puede ser utilizado como matriz para soportar cúmulos, y nanopartículas de Ag presentará potencialidades como bactericida, antifúngico y antiviral.

## OBJETIVOS

- Objetivo general.

Definir y Caracterizar la aplicación de nanopartículas de plata sobre cuero bovino y porcino con el propósito de incrementar el valor del calzado especializado para usuarios diabéticos.

- Objetivos específicos.
  - Establecer las condiciones experimentales en la aplicación de cúmulos y nanopartículas de plata sobre cuero bovino y porcino utilizando técnicas instrumentales de UV-vis e ICP plasma respecto a la adhesión en las fibras del cuero.
  - Determinar las particularidades de las diferentes especies de plata soportadas en cuero de ganado bovino y porcino utilizando técnicas de espectroscopia de reflectancia difusa UV-visible (ERD UV-vis).
  - Caracterizar estructuralmente la adhesión de nanopartículas de plata sobre cuero bovino y porcino en cuanto a su distribución y tamaño utilizando microscopia electrónica de transmisión (TEM).
  - Evaluar la actividad Bactericida y antifúngico del material desarrollado frente a microorganismos patógenos oportunistas (*Pseudomonas aeruginosa* y *Cándida albicans*).

# CAPÍTULO I

**OBTENCIÓN DE CUERO DE GANADO BOVINO Y  
PORCINO**

**MÉTODO DE CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS**

El cuero es una estructura biológica fibrosa y elástica con poros de dimensión variable según la especie, hábitos de vida, estación anual, edad, sexo y crianza. Los cueros tienen la capacidad de impregnarse de: tinturas, intercambio gaseoso, agua, micro y nanopartículas. Teniendo en cuenta que muchos procesos biomédicos están estrechamente relacionados con el intercambio iónico y la adsorción; la industria textil y farmacéutica serán campos donde el cuero con nanopartículas puedan ser utilizados, en este capítulo discutimos, en función a su estructura, algunas de las propiedades y aplicación de los cueros; haciendo énfasis el cuero de ganado bovino y porcino que es el material de estudio. Finaliza el capítulo con algunas consideraciones básicas sobre la capacidad absorbente del cuero hacia líquidos y coloides, específicamente la plata coloidal y el estado actual de las investigaciones encaminadas a soportar nanopartículas y cúmulos de plata en diferentes matrices orgánicas dentro de las que se encuentra el forro de bovino y porcino.

## **1.1 HISTORIA Y PRIMERAS APLICACIONES DEL CUERO EN EL CALZADO**

En 2008, en un buen estado de conservación y el zapato completo se recuperó en la base de un pozo Calcolítico en la cueva de Arení-1, Armenia. El zapato de 5.500 años de edad, es el calzado más antiguo de cuero en el mundo y fue descubierto por un equipo de arqueólogos internacionales y sus resultados se publicaron el 9 de junio en la revista científica en línea PLOSONE [7].

Hace milenios los Armenios comprobaron que podían proteger sus pies de heridas y callosidades con pieles de animales y usando paja en el interior de su calzado, con la finalidad de amortiguar la pisada del pie, preferentemente, la paja iba colocada en los mayores puntos de impacto o de apoyo del pie, como son el talón y la parte distal de la planta del pie [7].

El uso principal de las pieles y el cuero fabricados es a partir de pellejos curtidados de animales se utilizan desde hace miles de años para confeccionar prendas de vestir. La industria de la piel y el cuero sigue siendo importante en la actualidad. Con las pieles se fabrican gran variedad de prendas exteriores, como abrigos, chaquetas, sombreros, guantes y botas, así como adornos para otros tipos de prendas. El cuero se utiliza para confeccionar

prendas y puede emplearse en la fabricación de otros productos, como la tapicería para automóviles y muebles, y una amplia gama de artículos de piel, como correas de reloj, bolsos y artículos de viaje. El calzado es otro producto tradicional del cuero [8].

## 1.2 ESTRUCTURA DE LA PIEL

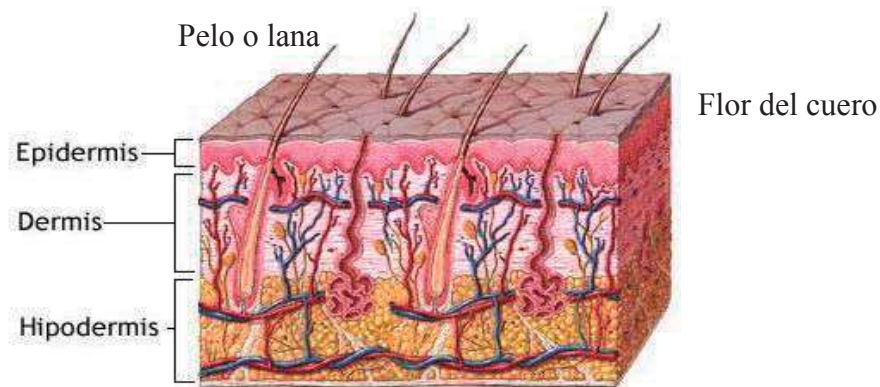
La piel es un órgano constituido por tres capas: epidermis, dermis o corium y tejido subcutáneo o endodermis.

1- Epidermis: en la epidermis se insertan los folículos capilares que dan origen a los pelos, representan el 1% del espesor total de la piel y es eliminada durante el proceso de depilación.

2- Dermis ó corium: es la capa principal desde el punto de vista de la industria del curtido ya que representa el 85% del espesor de la piel. Se encuentra situada inmediatamente por debajo de la dermis y está separada de ella por la membrana hialina. Esta membrana presenta el típico grano, el cual es característico de cada animal. La dermis presenta dos regiones distintas:

- a- Dermis papilar constituida por vasos sanguíneos, terminaciones nerviosas y fibras de colágeno ubicadas en forma perpendicular a la superficie;
- b- Dermis reticular constituida por células conjuntivas y fibras de colágeno oblicuas y más gruesas que las de la capa anterior.

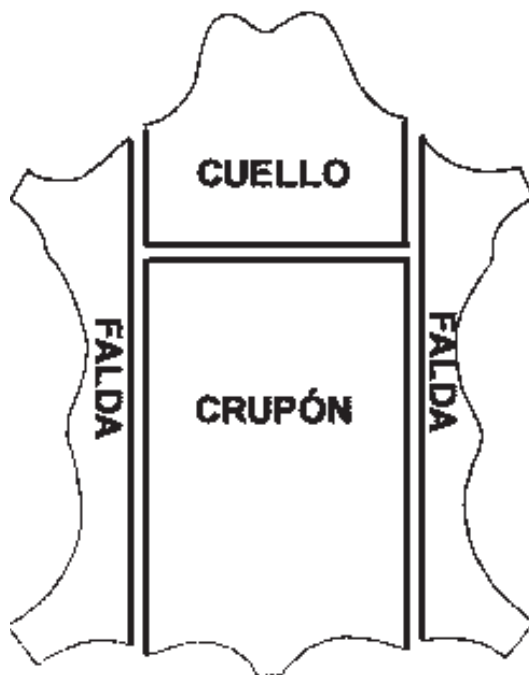
3- Tejido subcutáneo ó endodermis: constituye el 15% del espesor total de la piel y se elimina durante el descarnado. Está constituido por tejido conjuntivo laxo.



**Figura 1.1** Corte esquemático del cuero

### 1.3 ZONAS EN QUE SE DIVIDE Y CORTA LA PIEL

En la piel fresca existen zonas de estructura bastante homogéneas de acuerdo a su espesor y grado de compactación. Se pueden diferenciar tres grandes zonas:



**Figura1.2** Partes en las que se corta y divide el cuero

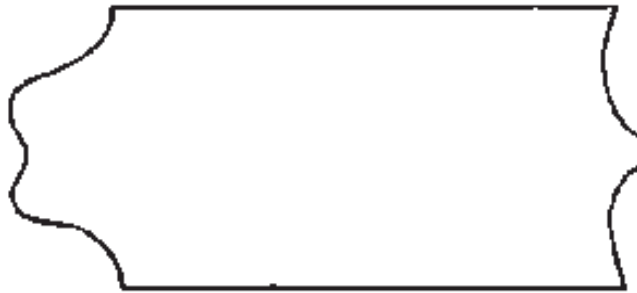
- **Crupón:** es la zona más homogénea tanto en espesor como en su estructura histológica; es la más compacta y valiosa. Se corresponde con la región dorsal y lumbar del animal y equivale al 45% del peso total de la piel fresca.
- **Cuello:** su espesor es irregular. Corresponde a la piel del cuello y cabeza del animal y representa el 25% del peso total de la piel fresca.
- **Falda:** Es la zona más irregular de la piel. Se corresponde con la piel que recubre el vientre y las patas. Esta zona equivale al 30% del peso total de la piel fresca.

Las pieles se pueden trabajar enteras ó cortadas en diferentes formas. Según sea la forma en que se corte tendremos las siguientes denominaciones:

a- Media piel u hoja si la piel es cortada por el espinazo.



b- Desfaldado o dosset cuando se separan las faldas.



c- Hoja desfaldada cuando primero se corta por el espinazo y a esa mitad se la desfalda [9].



**Figura 1.3** Cortes del cuero. Corte para la producción de cueros a) Media piel u hoja, b) Desfaldado o dosset, c) Hoja desfaldada.

## 1.4 CONSERVACIÓN O CURADO DE LOS CUEROS

El curado de los cueros sirve para mantener los cueros hasta el momento del curtido. En el sacrificio del animal comienza el proceso de descomposición debido a factores externos e internos. Existen tres sistemas principales de conservación que son el secado, el salado y el salmuerado.

Secado: Es el método más común de conservación de la mayor parte de pieles de reptiles, caprinos y de peletería. El secado al aire tiene la ventaja de constituir la forma más sencilla de conservación y es muy útil en zonas de clima tropical seco y zonas rurales de lugares poco desarrollados.

La velocidad de secado es importante: si es muy lento puede descomponerse el cuero; si es demasiado rápido, las superficies exteriores del pueden endurecerse y secarse mientras que las partes interiores conservan la humedad de modo que al remojar los cueros para su procesamiento presentarán un ampollado, pudiendo también aparecer orificios.

El método más sencillo de secar cueros es extenderlos sobre el suelo apoyando en listones o piedras para evitar que se ensucien o bien colgar los cueros en sogas y secarlos al sol. Sin embargo, la piel suele quedar dañada por las marcas.

La práctica más utilizada es secarla en bastidores estirando el cuero sobre un marco y dejándolo secar a la sombra o al sol. A medida que el cuero se va secando se contrae, endurece quedando siempre plano lo que permite una mejor circulación del aire y facilidad en el enfardado.

Salado: Se utiliza en climas templados. El cuero fresco es llevado a bodegas donde se lo coloca en una estiba de sal. Los cueros se colocan en una pila. El tiempo de un salado correcto requiere de 21 días de estiba. Los cueros curados correctamente por salado se conservan hasta un año en lugares frescos. Para un correcto proceso de salado se requiere el uso de sal limpia y de buena calidad.

Salmuerado: Existen varios sistemas de salmuerado pero el más importante es el utilizado en EE UU. Los cueros descarnados se remojan en salmuera en tachos durante

48hs. o más en un medio de salmuera saturado y se los considera curados cuando la salmuera los ha impregnado por completo. A continuación se retiran los cueros y se escurren y después se agrega una pequeña cantidad de sal para protegerlos. El salmuerado permite la conservación por 6 meses aproximadamente [9].

## 1.5 PROCESOS PARA LOGRAR EL CURTIDO DEL CUERO

Se los puede dividir en dos etapas. La primera se realiza en Etapa denominada de ribera o proceso húmedo y tiene como finalidad preparar el cuero para el curtido.

### 1ra ETAPA: PREPARACIÓN DEL CUERO

Incluye los siguientes pasos:

- Reverdecimiento
- Encalado
- Depilado
- Desencalado, Purgado y Piclado:

*1 Reverdecimiento o remojo:* Los cueros que se reciben llegan deshidratados ya sea por secado, salado o salmuerado por lo que resulta necesario remojarlos de nuevo para ablandarlas, quitar sangre, tierra, estiércol, la sal y facilitar la penetración de sustancias que provocan el esponjado de los cueros.

Antes de dar comienzo al proceso de elaboración se recorta el cuero para sacar canillas, patas, colas y otras partes pequeñas. Por lo general el reverdecimiento se logra sumergiendo las pieles y cueros en agua que puede contener un aditivo hasta que la piel se re hidrate.

a) *Remojado de cueros y pieles verdes:* se utiliza en cueros de animales recién sacrificados los cuales deben llegar a la curtiembre en unas pocas horas. Este material solo necesita un remojo breve que puede ser un simple lavado profundo antes de pasar al encalado.

b) *Reverdecimiento de cueros secos*: Primero se debe desprender toda la sal suelta sacudiendo los cueros. En este momento debe evitarse la acción mecánica porque produciría la rotura por flexión de las fibras.

2 *Encalado*: La sustancia que se utiliza en este paso es la lechada de cal. El encalado se realiza a pH 12,5y sirve para ablandar la epidermis mediante su accionar químico sobre las grasas, músculos, venas, nervios y glándulas produciendo el desprendimiento del pelo o lana. Al actuar sobre las fibras de colágeno, se produce el hinchamiento de las mismas y facilita la penetración de las materias curtientes.

Los cueros sometidos a este proceso son sumergidos en bateas que contienen la lechada de cal por el término de 7 a 14 días hasta que el pelo o lana se desprenda sin esfuerzo. Cuando se completa el encalado se observa una piel blanca, azulada, hinchada, gomosa y semi translúcida.

La proporción utilizada para realizar la lechada es de 1kg. de cal apagada cada 10 litros de agua.

3 *Depilado*: Se realiza en forma manual ó pasando una espátula teniendo la precaución de evitar la ruptura del cuero.

Como el proceso de depilado se realiza en un medio alcalino y el curtido en un medio ácido, debemos llevar adelante una serie de procesos que lleven al cuero a un pH 7. Estos procesos son el desencalado, purgado y piclado.

4 *Desencalado y Piclado*: En el desencalado se enjuaga varias veces los cueros en agua limpia y se los deja en remojo durante 1 día con el fin de eliminar la mayor cantidad de cal posible. Luego, los cueros son introducidos en el tambor donde se realizara el proceso de purgado y piclado. Este proceso sirve para neutralizar la cal acomodando el pH para el curtido propiamente dicho, eliminar por acción enzimática elementos indeseables y para que la piel quede con un grano más fino y suave.

Posteriormente se lleva a una etapa de acidificación o piclado, donde el uso de sales orgánicas como el ácido láctico y el fórmico suelen emplearse hasta llegar a un pH donde las sales de cromo actuaran en el curtido de las fibras de colágeno para evitar su descomposición. [9].

## 2da. ETAPA: CURTIDO PROPIAMENTE DICHO

### SISTEMA DE CURTIDO AL ALUMBRE:

*También llamado curtido blanco.* Se utiliza principalmente para curtir pieles donde se quiere conservar el pelo. Se usa como solución curtiente al preparado constituido por 100 gramos de alumbre y 50 gramos de sal (cloruro de sodio) por cada litro de agua. Esta mezcla debe tener una densidad de 11° Baume. El tiempo requerido para la conclusión del proceso es de 10 días para pieles pequeñas y hasta 40 días en pieles de mayor tamaño.

El alumbre se puede reutilizar ajustando nuevamente la concentración a 11° Baume mediante el agregado de alumbre y sal.

### CURTIDO EN TANINO:

*1 inmersión en tanino:* Se sumergen los cueros en un licor curtiente vegetal compuesto por agua, tanino alumbre y sal durante el tiempo necesario para que se impregne los cueros totalmente. Siempre debe iniciarse este proceso con la menor concentración posible de tanino (0,7° Baume) e ir agregando tanino en forma diaria para favorecer de este modo la impregnación uniforme del cuero e todo su espesor. La concentración final varía de acuerdo al tipo de cuero siendo en el caso de la cabritilla de 1 a 1,3° Baume y en el caso de los becerros puede llegar a 3° Baume.

Como el proceso de curtido propiamente dicho se lleva a cabo en un medio ácido es importante controlar el pH de la solución. Este debe mantenerse en un valor aproximado de pH5. Para corregir las desviaciones de pH que puedan ocurrir contamos con el alumbre que es una sal ácida y el cloruro de sodio (sal común) que es una sal básica; si el pH se torna alcalino deberá agregarse una sal ácida (alumbre), en el caso contrario, si el pH se desvía hacia la acidez, se agregará una sal básica (cloruro de sodio).

Para la preparación de la solución inicial, se usan 2 litros de agua por cada Kg. De cuero encalado, 20 gramos de tanino, 2 gramos de alumbre y 6 gramos de sal. Por las características químicas de los insumos utilizados se debe disolver el tanino en agua hirviendo y el alumbre y la sal en agua fría; una vez preparadas se mezclan ambas en el mismo recipiente. La mezcla obtenida tendrá una densidad medida con el aerómetro de 0.7 grados Baume.

Los cueros se sumergirán en la solución controlándose en forma diaria y se revuelven para que el proceso sea uniforme. Se agrega la misma cantidad de tanino todos los días hasta finalizar el proceso. Los cueros están listos una vez que el tanino ha penetrado en la totalidad de su espesor. Luego hay que enjuagar con abundante agua limpia y se ponen a orear los cueros extendidos en una habitación cerrada sobre una soga de nylon hasta que no chorreen más agua, este es el punto de oreo necesario para el siguiente paso.

*2 Nutrido:* Es el agregado de un aceite sulfonado (mezclado con agua) para nutrir los cueros curtidos. Sirve para restituir las grasas eliminadas durante el proceso de curtido brindándole flexibilidad. La cantidad de aceite necesaria es de un 15% de aceite en agua pero depende mucho de la calidad del aceite utilizado. Los aceites puros se emulsionan con un detergente neutro y agua tibia; la proporción utilizada es de 100cc de aceite de Ricino, 50cc. de detergente neutro y agua tibia hasta completar un litro y medio de solución. El nutrido se hace masajeando con la mezcla de aceite el cuero del lado de la flor y del descarnado hasta que la misma sea absorbida totalmente.

*3 Estaqueado:* Se realiza en bastidores acondicionados al tamaño de los cueros hasta su secado. Este se debe hacer en un lugar cerrado y con poca aireación ya que este proceso debe ser lo suficientemente lento para evitar que la piel se endurezca por fuera impidiendo la eliminación de la humedad interna.

*4 Terminación:* Como parte final de la fabricación del cuero debe realizarse el acabado donde se obtendrá las características finales influyendo en forma esencial sobre el aspecto, tacto y solidez de la piel. Tiene como objetivo brindarle al cuero flexibilidad y estética.

Se inicia el trabajo humedeciendo el cuero utilizando un paño húmedo del lado de la flor. Luego se procede mediante el uso de la espátula al estirado del mismo y la eliminación de los restos de tejido subcutáneo que persistieron durante el proceso de descarnado; se termina la superficie del descarnado con el lijado suave de la misma usando una lija de grano intermedio (grano 80 ó 100). Con el fin de darle la máxima elasticidad posible, se soba el

cuero y se completa la terminación dándole brillo mediante el uso de un taco de madera pulido [9].

## **1.6 INDUSTRIA DEL CALZADO**

El término calzado abarca la fabricación de botas, zapatos, sandalias, zapatillas, zuecos, etc., se fabrican entera o parcialmente de cuero, goma, materiales sintéticos y plásticos, lona, cuerda y madera.

Las fábricas de botas y zapatos se sitúan generalmente cerca de las áreas de producción de cuero o en las regiones ganaderas. Aunque el cuero repesnet el material base del calzado, también los textiles han representado un material empleado para calzado ligero. En los años recientes el cuero compite por materiales sintéticos y plásticos. Los forros pueden hacerse de lana, poliamida (nailon), oveja y cerdo. Los cordones se fabrican con pelo de caballo o fibras sintéticas; el papel, la cartulina y los termoplásticos se usan para refuerzos. En el acabado se utilizan cera natural y coloreada, tintes de anilina y agentes colorantes.

Factores económicos y regulación medioambiental han transformado la industria del calzado en los últimos años. La fabricación de zapatillas de tenis es uno de los sectores en alza de la industria y ha pasado de la producción en un solo país a la producción a escala mundial, especialmente en países en vías de desarrollo en Asia y América del Sur, con el fin de aumentar la producción y reducir los costes. Esta migración de la producción a los países en desarrollo también se ha producido en otros sectores de la industria del calzado [8].

### **1.6.1 PROCESO**

Pueden intervenir más de cien operaciones en la fabricación de un zapato, y aquí sólo es posible hacer un breve resumen. La mecanización se ha aplicado a todas las etapas,

pero se sigue estrechamente el modelo del proceso manual. La introducción de nuevos materiales ha modificado el proceso sin variar el procedimiento general.

En la fabricación de los empeines, la piel u otros materiales se escogen y preparan y luego se recortan en máquinas de coser (o de conformar) con herramientas de forma con cuchillas sueltas. Las piezas, incluyendo los forros, se “unen” posteriormente, o sea, se cosen o pegan. También pueden realizarse operaciones de perforado, apertura de ojales, etc.

Para fabricar la parte inferior, las suelas, plantillas, tacones y viras se cortan en máquinas giratorias que utilizan cuchillas sueltas, o en prensas de moldeado de suelas; los tacones se fabrican por compresión de tiras de cuero o madera. El material se recorta, se le da forma y se estampa.

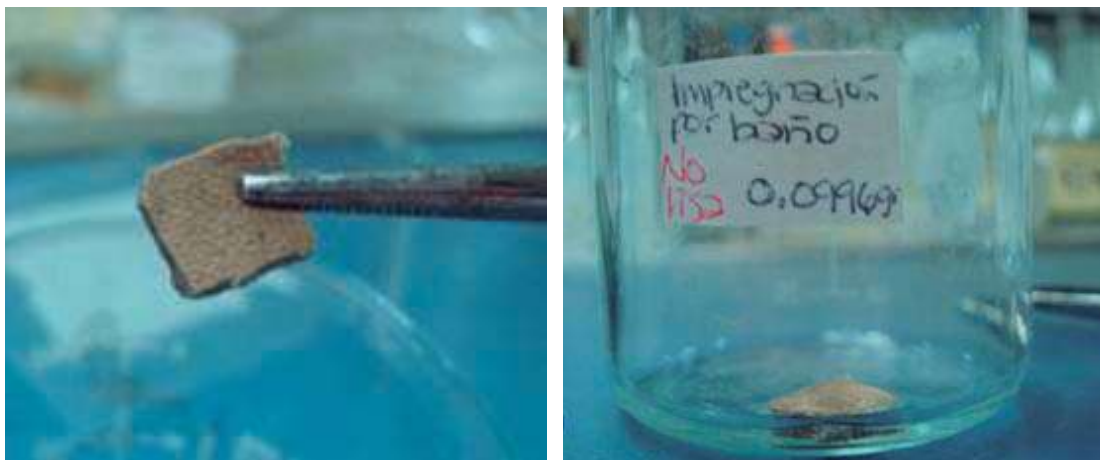
Seguidamente se unen las partes superior e inferior y luego se cosen, pegan, clavan o atornillan. Después de estas operaciones, se les da forma y se nivelan entre rodillos. El acabado final del zapato incluye la aplicación de cera, la tintura, el rociado, pulido y embalaje.

Entre las materias primas utilizadas en el proceso de fabricación, las más importantes desde el punto de vista de los riesgos profesionales son los adhesivos, que comprenden adhesivos naturales, sólidos o líquidos, y soluciones adhesivas a base de disolventes orgánicos [8].

## **1.7 IMPREGNACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA AL CUERO**

### **Impregnación por baño:**

Debido a la estructura de cuero, éste representa un material absorbente de líquidos y coloides, siendo la absorción de agua una característica física que se evalúa en la calidad del cuero terminado. En este trabajo se desarrolló un método para valorar la impregnación de nanopartículas de plata en el cuero por diferencia de peso entre cueros secos y cueros hidratados con una solución de plata coloidal a una concentración del 2%. El baño preparado (1 ml) de plata coloidal se utilizó para introducir cortes de 1gr del cuero durante 5 minutos. Posteriormente secado a temperatura ambiente para la toma de peso. Al bañar el calzado y secarlo se observó un ligero cambio en la suavidad del forro.



**Figura 1.4** Cortes de cuero, los cortes son de 1gr de peso en seco (1), los cuales posteriormente se sumergen en agua para ser pesados y ver su capacidad de absorción (2).

Se realizaron 2 muestras para ver la capacidad de absorción del cuero, una fue por la parte exterior de la piel (epidermis) y la segunda fue por la parte interior (flor) para determinar las posibles diferencias en absorción. Los resultados fueron similares (Tabla I) sin encontrar diferencias en el grado de absorción del lado de la epidermis y lado flor.

**Tabla I** Diferencia de pesos un cantidad de agua absorbida por el cuero.

| Muestra                                         | Peso inicial (gr) | Peso final (gr) | H <sub>2</sub> O en el cuero (ml) | Ml de H <sub>2</sub> O/gr de cuero |
|-------------------------------------------------|-------------------|-----------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| Cuero con la cara epidermis hacia el fondo      | 0.0988            | 0.2400          | 0.1412                            | 1.4291                             |
| Cuero con las cara rugosa o flor hacia el fondo | 0.0996            | 0.2464          | 0.1468                            | 1.4739                             |

**Tiempo del baño 5 minutos**

## IMPREGNACIÓN POR ROCÍO:

En el calzado se realizaron las pruebas de impregnación de nanoplatea coloidal empleando un atomizador de líquidos. La impregnación de nanoplatea fue de 5 a 8 ml de solución preparada a diferentes concentraciones.

# CAPÍTULO II

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y ACTIVIDAD OLIGODINÁMICA DE NANO-PLATA

La síntesis de las nanopartículas metálicas representa una física para incrementar el área superficial del material y valorar en sus propiedades micro y bactericidas.

A continuación se presentan publicaciones y citas científicas de investigaciones basadas en la síntesis de nanopartículas, así como estudios biológicos y moleculares donde se hace mención de la acción oligodinámica de las nanopartículas de plata, con finalidad de analizar el mejor método de obtención de especies de plata con las dimensiones manométricas específicas. Este material se evaluó en la impregnación de los cueros de ganado bovino y porcino con el objetivo de valorar su propiedad microbica.

## **2.1 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA**

Existen diversos métodos para la síntesis de nanopartículas metálicas siendo los más empleados los procedimientos químicos. Inician con la reducción de los iones metálicos a átomos metálicos, seguido por la agregación controlada de átomos. El método químico es el más conveniente para la obtención de nanopartículas uniformes además que depende del agente reductor empleado.

Las aplicaciones nanopartículas incluyen: comunicación ultrarrápida de la información, almacenamiento óptico de la información y semiconductores [10]. La catálisis es la aplicación química más importante de las nanopartículas metálicas. Los metales de transición, especialmente los metales preciosos, muestran actividad catalítica para muchas reacciones orgánicas del tipo heterogénea y homogénea. La catálisis heterogénea toma lugar en los sitios activos de los núcleos metálicos, mientras que en la catálisis homogénea las nanopartículas se fusionan perfectamente en el medio de reacción [11].

### 2.1.1 ELECTROQUÍMICA DE LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA

Las nanopartículas de plata han sido elaboradas mediante diferentes métodos electroquímicos, la descomposición térmica, la ablación por láser, la irradiación de microondas y la síntesis sonoquímica.

La polarización de plata en solución no acuosa de  $\text{NaNO}_3$  en etanol fue investigado por medio de voltamperometría cíclica y cronoamperometría. Un depósito formado por nanopartículas de plata metálica se ha obtenido por ambos métodos. El mecanismo propuesto supone que tanto la disolución anódica de plata y su reducción al estado metálico procede durante la polarización en etanol. El proceso descrito es un método nuevo y muy sencillo de producir las nanopartículas de plata [12].

Recientemente, la preparación de nanopartículas metálicas ha ganado mucha atención debido a múltiples aplicaciones en diversas áreas científicas y aplicación. Se caracterizan por inusuales propiedades físicas y químicas en optoelectrónica, almacenamiento de información, catálisis, microbiciida, fotónica, fotografía y la producción de baterías entre otras.

Los estudios electroquímicos sobre la polarización de plata en disolventes orgánicos se llevaron a cabo para investigar la estabilidad de  $[\text{Ag} + \text{Ln}]$  complejos y electrodeposición de plata [13-14].

Los productos químicos utilizados en el experimento fueron: nitrato de plata ( $\text{NaNO}_3$ ) producido por la compañía Poch, etanol (99,8%) de EUROCHEM CDG y 99,99% de plata metálica. Todos los reactivos fueron utilizados como recibido, sin purificación adicional.

La polarización de plata en una solución saturada de  $\text{NaNO}_3$  y etanol bajo una atmósfera de argón. La presencia de iones  $\text{NO}_3$  tenía que mejorar la conductividad eléctrica de la solución. En primer lugar, la propiedad anódica de la plata se investigó mediante la PGZ301 potenciostato Volta Lab por medio de potenciodinámico (voltametría cíclica) y la técnica potencioestática (cronoamperometría) a temperatura ambiente. Aplicada a un sistema de tres electrodos, que consistía en una barra de plata como electrodo de trabajo, una placa de platino como contra-electrodo y  $\text{Ag}/\text{AgCl}$  como un electrodo de referencia. Los valores

posibles que figuran en este documento se refieren a la Ag/AgCl, si no el electrodo indicara lo contrario.

La reducción electroquímica de plata también se realizó por un método galvanostático (electrólisis) usando un sistema simple de tres ánodos de plata en forma de  $50 \cdot 10 \cdot 0.2\text{mm}^3$  de la placa y dos alambres de plata (0.8mm de diámetro) como cátodos situado en una mitad de la distancia entre los ánodos. Los ánodos son orientados perpendicularmente a la dirección a lo largo de la cual los electrodos se encontraban. La distancia entre los electrodos vecinos fue de 15mm, la electrólisis se llevó a cabo a la temperatura de 323°K con la densidad de corriente de  $0.5\text{mA cm}^{-2}$ .

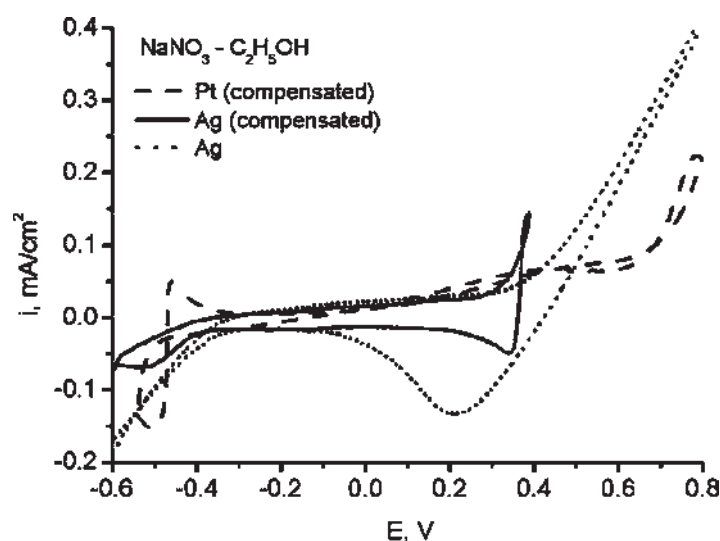
Los estudios de tamaño, morfología y composición de las nanopartículas obtenidas fueron realizados por medio de microscopía electrónica de transmisión (TEM), análisis de energía dispersiva de Rayos X (EDX) y difracción de electrones.

Los estudios de voltametría cíclica se realizaron para la plata en la solución de  $\text{NaNO}_3 - \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  (Fig. 4.2). Para obtener más información sobre los procesos que ocurren en la solución de Ag fue sustituido por electrodo de Pt, la oxidación de plata es visible por encima de aproximadamente 0.4 V como un aumento de la densidad de corriente en la curva anódica. Este proceso de disolución anódica plata producto de acuerdo a la reacción de un electrón en una superficie:

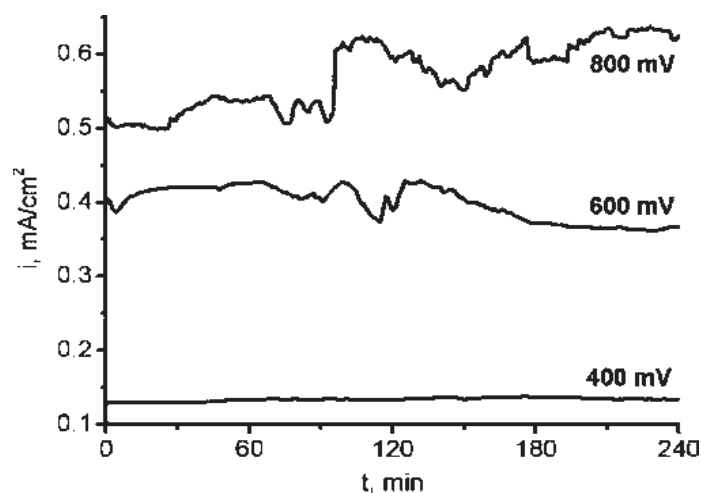


La reducción se revela por un pico catódico. Electrodo de Ag mayor potencial sólo se alcanzó sin compensación de la resistencia del sistema. La voltametría cíclica para el electrodo de Pt reveló un fuerte aumento de la densidad de corriente por encima de 0.6V, lo que puede atribuirse a la oxidación de etanol.

Para llevar a cabo nuevas investigaciones de la disolución de Ag, estudios se llevaron a cabo de una serie de valores posibles (0.4, 0.6, 0.8V) y los resultados se muestran en la Figura. 2.1, por el potencial de 0,4 V una curva suave con una menor corriente se obtuvo. En un rango de mayor potencial, EP 0.6V los procesos electroquímicos son más complejos, lo que se refleja en las grandes fluctuaciones u oscilaciones.



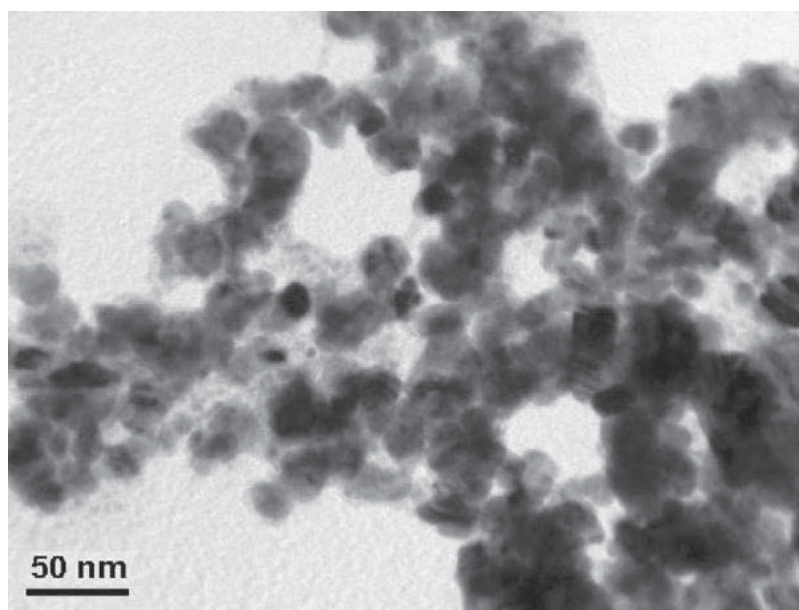
**Figura 2.1** La voltametría cíclica curvas realizadas en la solución  $\text{NaNO}_3\text{-C}_2\text{H}_5\text{OH}$  para los electrodos de Ag y Pt con una tasa de  $1\text{V/min}$  ( $0,01667\text{V/s}$ ). Las exploraciones con compensación de la resistencia del sistema están marcadas.



**Figura 2.2** Cronoamperometrica curvas de polarización de la plata en  $\text{NaNO}_3\text{-C}_2\text{H}_5\text{OH}$  el potencial  $400\text{mV}$ ,  $600\text{mV}$  y  $800\text{mV}$ . Tomada durante dos potenciales más altos en promedio de dos exploraciones.

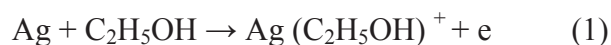
Se describe en la experimentación con el fin de encontrar un método más eficiente para la producción de nanopartículas el sistema que fue utilizado; el de electrólisis simple (galvanostático). La densidad de corriente aplicada fue de  $0,5\text{mA cm}^{-2}$  a la aproximación de las condiciones de la polarización cronoamperometrica. Después de unos 40 minutos, cuando una suspensión coloidal oscura se formó la electrólisis se detuvo.

Los precipitados obtenidos con ambos métodos, potencioestático y galvanostático fueron investigados por medio de microscopio electrónico de transmisión con microanalyser EDX, así como por la difracción de electrones. Los resultados se presentan en las Figuras. 2.3. Donde un precipitado en forma de nanopartículas es visible. Su tamaño es del orden de aproximadamente 20 nm.



**Figura 2.3** TEM análisis de las partículas obtenidas por el método galvanostático.

El análisis de los hechos experimentales, así como evidencia de la literatura permite proponer un mecanismo que conduce a la síntesis de nanopartículas de plata. La oxidación de Ag debe proceder de las reacciones anódicas siguientes:



De acuerdo con los datos de la literatura de iones  $\text{Ag}^+$  se puede disolver por las partículas del disolvente orgánico. Por lo tanto, proponemos la reacción (2) en el que un  $\text{Ag}(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH})^+$  catión pseudomolecular se forma.

El método presentado es sencillo, ecológico, no requiere de equipos costosos y tensoactivos ni agentes reductores adicionales son necesarios [12].

### 2.1.2 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA CON FORMAS DE ESCAMAS

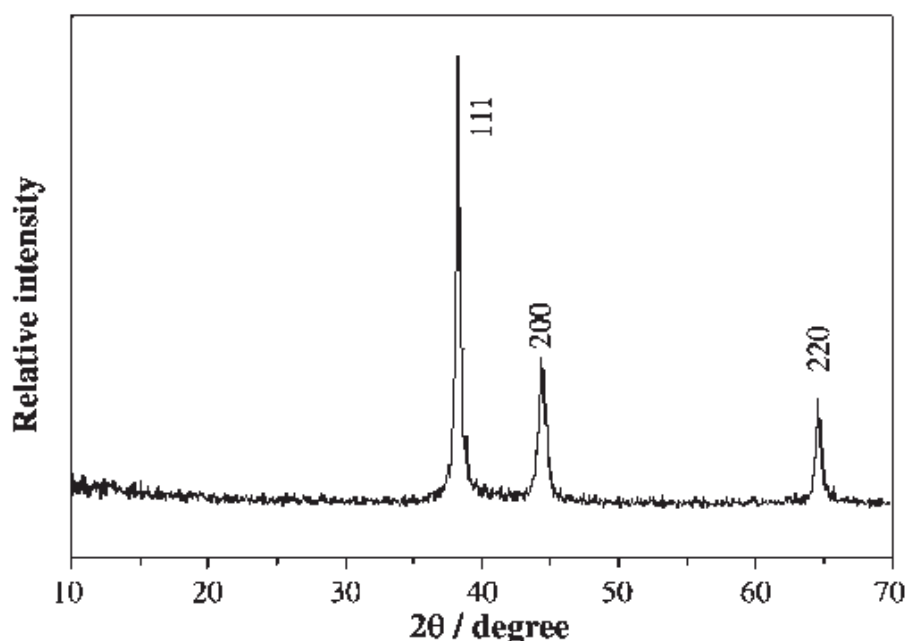
Las nanopartículas de plata en forma de escamas, se han sintetizado en grandes cantidades, simplemente por el envejecimiento de la solución acuosa de plata y urotropina en presencia de polivinil pirrolidona (PVP). Nano escamas de plata de diferentes formas de circular a poligonal puede ser obtenida en las etapas de reacción diferentes. Moléculas de PVP desempeñan un papel importante en el crecimiento anisotrópico de las nano escamas de plata. La síntesis de plata como solución coloidal se mantuvo estable durante al menos 1 mes. El análisis de difracción de electrones muestra que las nano escamas están bien cristalizadas [15].

A pesar de que las nanopartículas de plata de diferentes formas y tamaños han sido obtenidas a través de diversos métodos, las concentraciones de nanoplatea recabadas fueron extremadamente bajas y / o la solución de reacción siempre fue de los volúmenes de micro litro en la mayoría de los procedimientos. Recientemente, dispersiones concentradas de las nanopartículas de plata fueron preparadas por la reducción de las soluciones de nitrato de plata con el ácido ascórbico en presencia de Daxad 19 como agente estabilizador [16]. Sin embargo, la síntesis de nanopartículas de plata y dispersiones de alto rendimiento sigue siendo un reto. Aquí, se reporta una ruta de una solución suave para sintetizar nanopartículas de plata en forma de escamas en alta concentración, simplemente el envejecimiento de una solución acuosa que contiene nitrato de plata, urotropina, y polivinilpirrolidona (PVP). Al variar el tiempo de envejecimiento que podría fácilmente controlar el tamaño y forma de la nanoplatea en condiciones suaves.

El procedimiento experimental para la producción de nanopartículas de plata en forma de escama depende de los siguientes factores y reactivos:

Es un procedimiento típico, en el cual se utilizan, 30ml de solución acuosa que contiene 0.025mol/l de  $\text{AgNO}_3$ , 5.0g/l de poli (vinilpirrolidona) (PVP), y 0.125mol/l de urotropina que fue envejecido durante 30 min. a 3h en un tubo de ensayo con una temperatura de con tope de 80 °C. La suspensión coloidal se enfrió a temperatura ambiente, se centrifuga y se lava con agua antes de la caracterización.

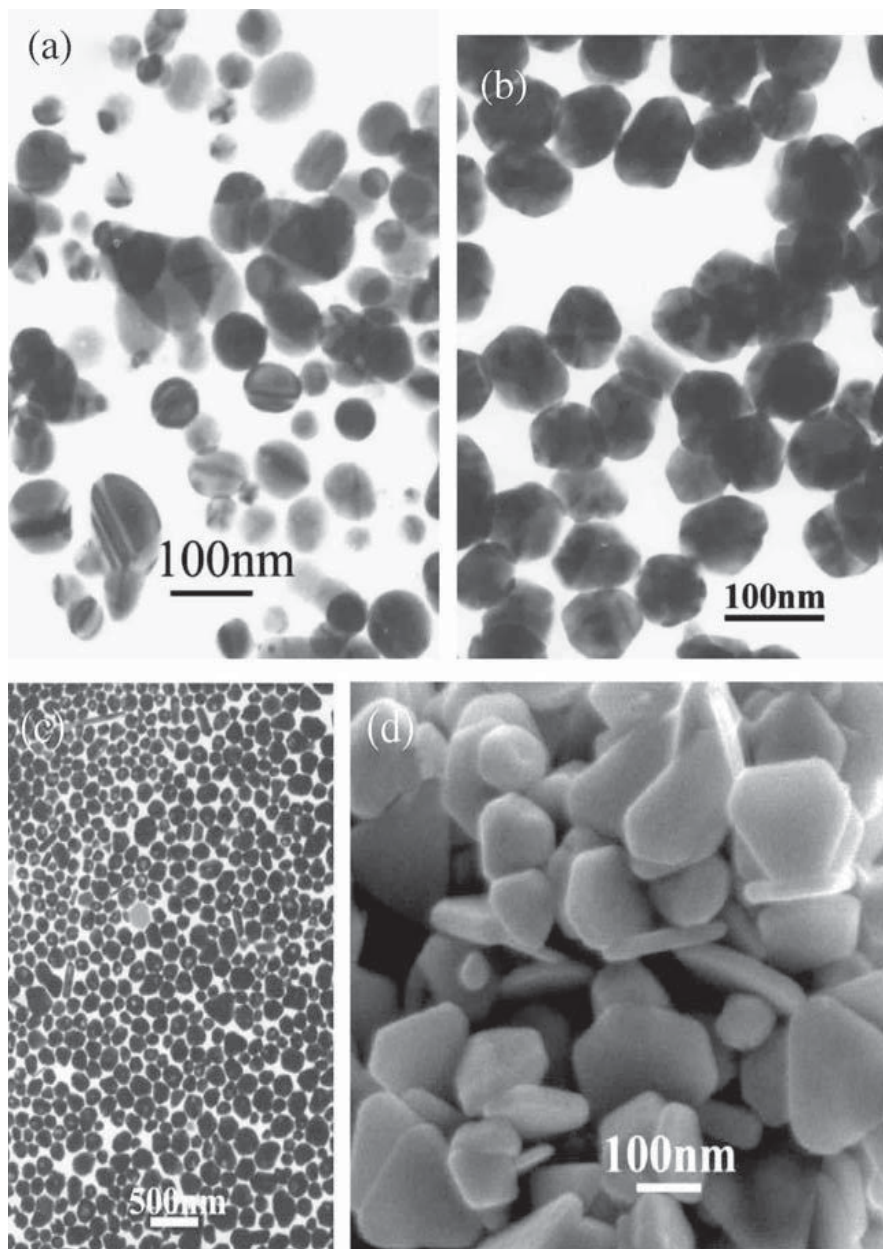
Los resultados que se muestran en la Figura 2.4 indican que la formación de plata metálica en el presente procedimiento fue exitosa, confirmado por difracción de rayos X (DRX). La muestra patrón típico de difracción de rayos X comprueba una muestra de plata obtenida. La ampliación de los picos de difracción revela la estructura a nano escala de esta muestra. Tres picos de difracción pueden ser indexados como (111) (200) y (220) planos de la estructura cúbica de plata metálica. Los picos fuertes y agudos sugieren la formación de nanopartículas de plata altamente cristalino.

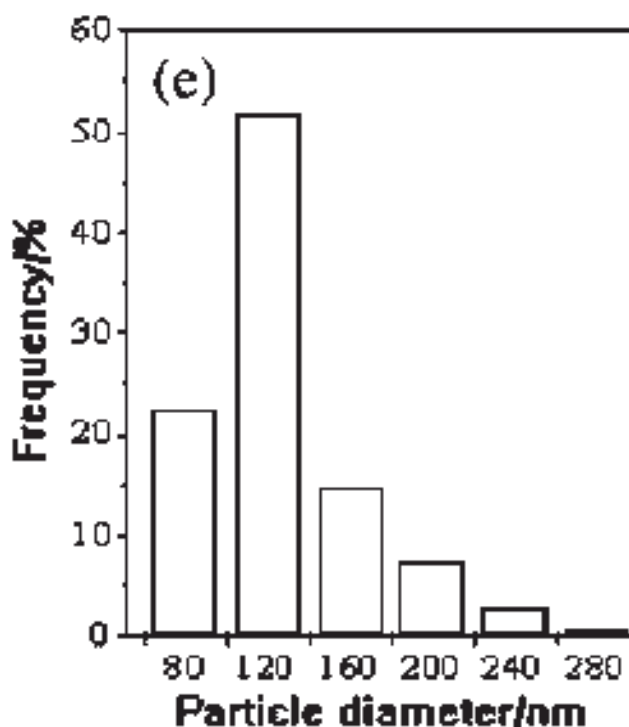


**Figura 2.4** Patrón típico de difracción de rayos X de una muestra de plata obtenido

La evolución del tamaño de las partículas y morfologías de las muestras de plata es claramente revelada por las imágenes de TEM en la Figura. 3.5. Las nanopartículas de plata se observan bien dispersas en cada muestra. Como se muestra en la Figura. 2.5 (a, b, c, y d), las nanopartículas de plata que se superponen son casi transparentes, que revela la característica fina en forma de escama de nanopartículas de plata obtenida en la etapa inicial. Para la mayoría de las partículas, los esquemas de círculo redondo puede ser claramente definido y los diámetros están en el rango de 37 a 50nm. Como la reacción procedió (1 h), las nano escamas de plata crecen en el espesor de la muestra, pero siguen siendo poco transparentes las que se encuentran superpuestas, observadas por TEM (Fig.

2.5b). También se puede ver que los copos circulares tienden a mostrar formas poligonales, y la distribución del tamaño de nano escamas de plata se hizo aún poco limitado y se centra en 70nm, al final del procedimiento de reacción (3h), más las nanopartículas de plata tienden a mostrar morfologías de polígono o forma de prisma. Fig. 2.5c muestra imágenes de TEM de nanopartículas de plata obtenidas. La morfología de las escamas como se ha caracterizado más mediante SEM, como se muestra en la figura. 2.5d, la mayoría de las nanopartículas de plata tienden a mostrar más o menos regulares formas poligonales.





**Figura 2.5** TEM y SEM imágenes de muestras de plata obtenida después de la reacción de: 30 minutos (a), 1 h (b), y 3 h (c, d), y el histograma de distribución de tamaño

Las nanopartículas de plata como escamas, se han preparado en gran escala por un enfoque de simple solución de fases. Por el método simple de envejecimiento el cual se espera que sea el control sistemático de las formas y tamaños de las nano escamas [15].

### **2.1.3 PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA POR EL MÉTODO DE PULSO SONOELECTROQUÍMICO Y ESTUDIO DE SUS CARACTERÍSTICAS**

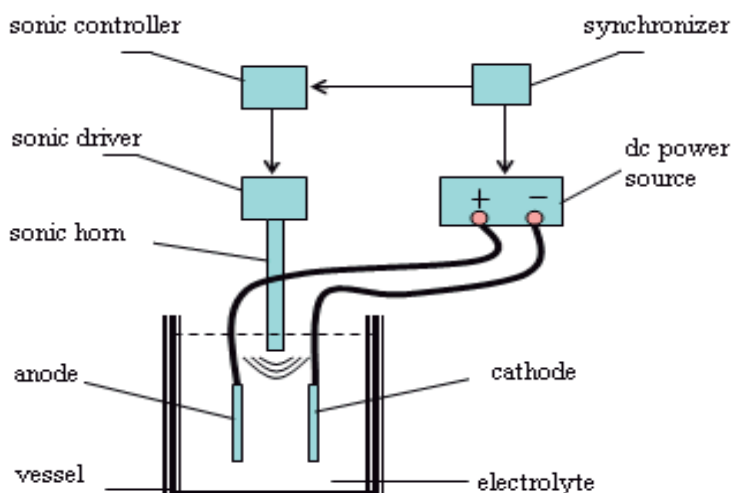
Las nanopartículas de plata como esferas y barras han sido preparadas por una técnica de sonoelectroquímica de pulso con una solución acuosa de  $\text{AgNO}_3$  en la presencia de  $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$  dodecil sulfato de sodio.

Las nanopartículas de plata como preparados se caracterizan por microscopía electrónica (TEM, SEM), difracción de rayos X (DRX), y espectroscopia de absorción UV-VIS. Se encontró que la concentración de  $\text{AgNO}_3$  afecta a la forma de las nanopartículas. El

tamaño del cristal puede variar de 5nm hasta 200nm, mediante el control de la electrodeposición con diversos parámetros de sonido [17].

Es bien sabido que la reacción catalítica depende del tamaño y la forma de las nanopartículas de metal y que la síntesis de formas bien controlados y el tamaño de las partículas podrían ser críticas para sus aplicaciones [18]. Los métodos desarrollados para la fabricación de nanopartículas incluyen la reducción de productos químicos [19], el procedimiento de crecimiento de las medidas de semillas [20-21], reducciones sonoquímicas [22], la asistencia de microondas [23], la ablación por láser, la evaporación de metal [24], etc.

Reisse y sus colaboradores han descrito un nuevo dispositivo para la producción de polvos de metal con la reducción de sonoelectroquímica de pulsado [22-25]. Este dispositivo sólo expone la superficie circular plana en el extremo de la punta del sonido de la solución de la electrodeposición como se muestra en la figura 2.6. El área expuesta actúa como cátodo y como emisor de ultrasonidos. Los metales se obtuvieron como químicamente puros, polvo fino y cristalino con una alta superficie dando un tamaño de partícula promedio de 100nm la comprensión actual del mecanismo de sonoelectroquímica describe una deposición electroquímica de una capa fina sobre el sonoelectrodo durante el pulso eléctrico. La fina capa es destruida por el pulso sonoro que viene, para formar un chorro de nanopartículas suspendidas en la solución. Así, la electroquímica y los parámetros de sonido, incluyendo la duración del pulso, se puede utilizar para controlar los parámetros de las partículas.



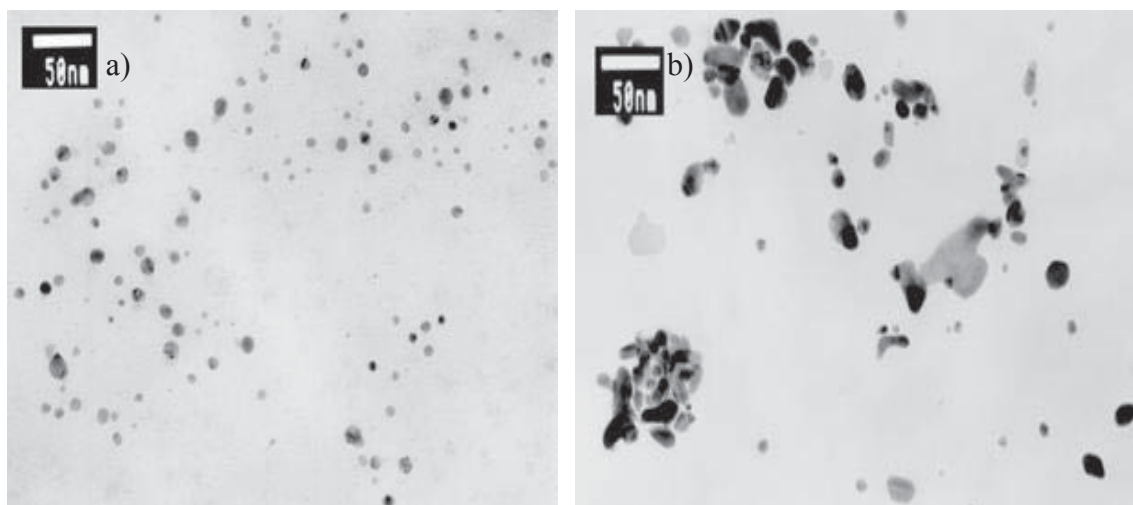
**Figura 2.6** Esquema del montaje experimental

El esquema del conjunto de montaje experimental para estos experimentos (Figura 2.6), contiene una celda electroquímica (cátodo, el ánodo, y el electrolito), un generador de pulsos de ultrasonidos (sonicador), una fuente de alimentación de corriente continua, y un sincronizador. El sincronizador se utiliza para conducir las duraciones de los pulsos ultrasónicos y eléctricos. Cada ciclo sonoelectroquímico dura de 0-9s, que consiste en un pulso de 300m/s corriente eléctrica de 40mA, un pulso sonoro de 300m/s inmediatamente después del pulso eléctrico, y un resto de 300m/s. La deposición catódica de la plata se hizo sobre una lámina de acero inoxidable. El acero inoxidable debido a que otros tipos de lámina sirven como ánodo. Una vibración de 700W fue utilizado como el aparato de ultrasonidos. La fuente de alimentación se limitaba a 20V. La célula experimental tuvo las dimensiones de la siguiente manera: El área de superficie efectiva de la hoja de acero inoxidable fue de  $2\text{cm}^2$ , la distancia entre el ánodo y el cátodo se establece en 2mm, en todos los experimentos, la cantidad de electrolitos fue de  $50\text{cm}^3$ , la temperatura es estabilizada por un baño de agua y se mantiene en el rango de temperatura de  $25\text{-}28^\circ\text{C}$ , el buque fue tapado con papel aluminio.

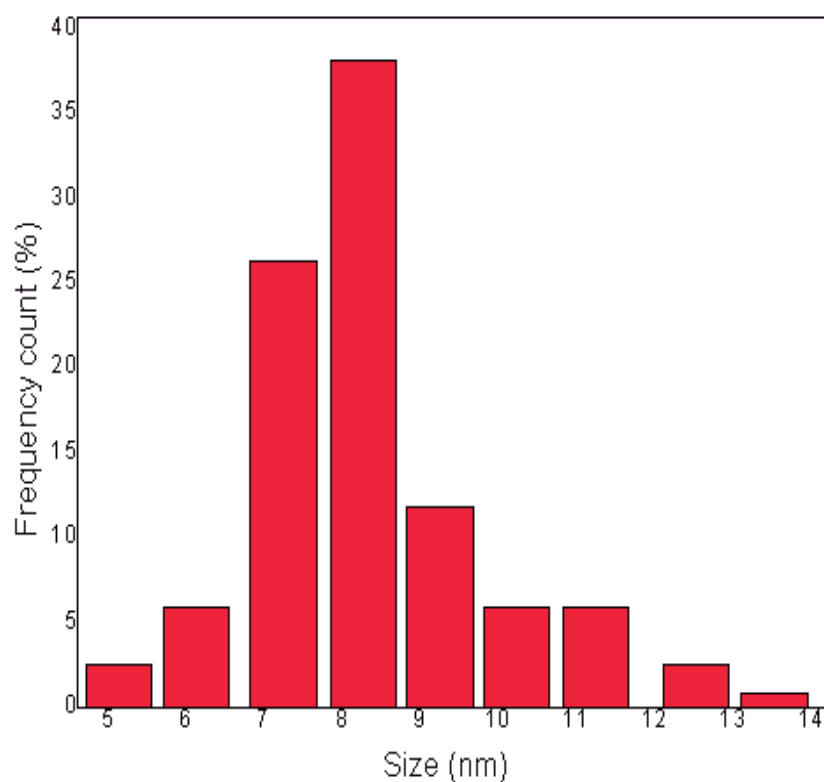
El valor normal de la densidad de corriente eléctrica fue de  $20\text{ mA/cm}^2$ . La densidad adecuada de energía ultrasónica era de unos  $100\text{W/cm}^2$ .

Las cantidades de 1, 5, y  $20\text{g/L}$  con  $\text{AgNO}_3$  sodio dodecil sulfato y  $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$  fueron mezclados en una solución acuosa en atmósfera de  $\text{N}_2$ . La deposición se llevó a cabo utilizando diferentes tiempos de reacción. El oxígeno se eliminan del agua por burbujeo de nitrógeno, y el electrolito se mezclan en una atmósfera de nitrógeno. Un agente complejante, sodio  $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$  dodecilsulfato, se añadió en  $40\text{g/L}$  del nivel para evitar la agregación. Los productos se lavaron con agua doblemente destilada y recolectados a través de una centrífuga. Las partículas de plata se caracterizaron por microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía electrónica de barrido (SEM), difracción de rayos X (DRX).

La Figura 2.7 presenta una típica imagen de TEM del producto obtenido por el método sonoelectroquímico con  $1\text{g/L}$   $\text{AgNO}_3$  y  $40\text{g/L}$  de  $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$ . La deposición se llevó a cabo durante 5 minutos. Se muestra que las nanopartículas de plata son esféricas y bien dispersas. La distribución de tamaño de partículas medido directamente a partir de micrografías TEM se muestra como un histograma en la Figura 2.8:

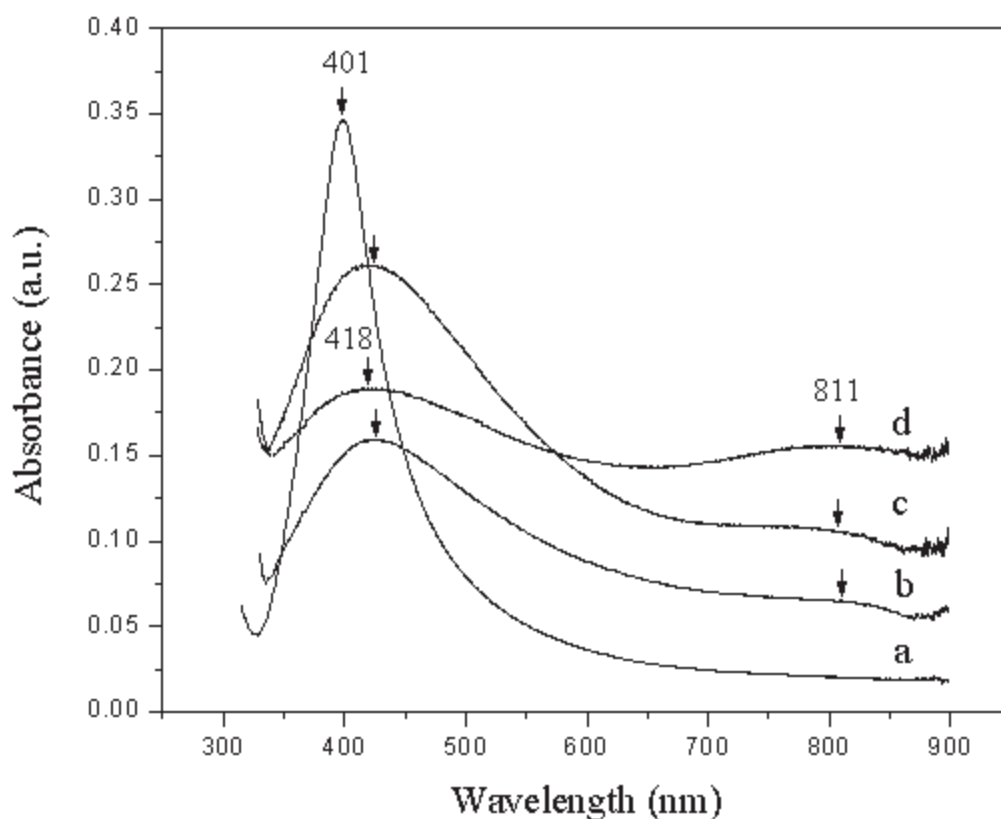


**Figura 2.7** Imágenes de TEM de partículas de plata obtenida por tratamiento sonoelectroquímico pulsado por diferentes duraciones de 1g/L  $\text{AgNO}_3$  y 40g/L de solución de  $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$ : a) 5 minutos, b) 15 minutos.



**Figura 2.8** La distribución de tamaño medido a partir de micrografías TEM en la Figura 2.7

El tamaño promedio de las partículas es de unos 8 nm, Uno puede ver fácilmente que, en el intervalo de tiempo inicial, hasta cerca de 15 minutos, el tamaño de los cristales puede incrementar. El tamaño promedio de los aumentos de cristalitos es de 8 nm después de 5 minutos de procesamiento sonoelectroquímico y a 20 nm después de 15 minutos, la agregación se observa si la reacción se lleva a cabo por períodos más largos de tiempo. Los espectros de absorción óptica de las nanopartículas de plata preparada con 15 minutos de tiempo de electrosonisacion se muestran en la figura 2.9. La solución acuosa de las nanopartículas esféricas de plata desarrollaron una banda de resonancia de plasmones superficiales centrados en 401nm, que fue característico de nanopartículas de plata con una dimensión inferior a 20 nm(curva a). Las curvas b, c y d son los espectros de absorción óptica de las soluciones acuosas de nanopartículas de plata forma de barra.



**Figura 2.9** En espectroscopia UV-vis los espectros de absorción de las nanopartículas de plata en solución acuosa con el tiempo de electrosonisacion de 15 minutos: a) 1g/L  $\text{AgNO}_3$  y 40g/L de  $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$ , b) 5g/L  $\text{AgNO}_3$  y 40g/L de  $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$ , c) 5g/L y  $\text{AgNO}_3$  20g/L y  $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$  d) 5g/L  $\text{AgNO}_3$  y  $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$  10g).

Es bien conocido que el tamaño y la forma de las partículas pueden influir en la posición y el ancho de la banda de absorción de resonancia de plasmones. El corrimiento de la banda de absorción de resonancia de plasmones de partículas de plata se puede atribuir al tamaño cada vez mayor debido a la agregación de partículas como se indica en las observaciones de microscopía electrónica [17].

## **2.2 ACTIVIDAD OLIGODINÁMICA DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA**

La plata es un metal al que se le ha dado diversos usos desde metalúrgicos hasta médicos. La plata fue utilizada por su propiedad bactericida para la prevención de infecciones en ojos de recién nacidos y en pacientes con quemaduras graves. También la plata coloide ha sido amplia e intensamente distribuida como desinfectante de agua y de alimentos, además de su utilidad como suplementos alimenticios. Sin embargo, no existen estudios sobre la toxicología de la plata a nivel internacional, ni menos en México es por ello que en el presente se hace una revisión de la información existente sobre sus usos y a cuestionarse los posible daños a la salud, ya que aunque la plata no es un metal esencial para los mamíferos, tiene fuerte afinidad por las regiones organizadoras de nucléolos y proteínas en sus grupos sulfidrilo “cisteína” (tiol), membrana, cromosomas. Se reconoce una alta tendencia a depositarse en diferentes tejidos corporales [26].

Desde tiempos antiguos se ha conocido en la plata su efecto bactericida así como su eliminación lenta y constante (efecto oligodinámico) [26]. Los usos terapéuticos como nitrato de plata al 1 % se reporta para prevenir infecciones en los ojos de los neonatos, las sales de plata efectivas contra las verrugas, los iones de plata han sido usados para tratar la cistitis e infecciones del tracto urinario, la sulfadiazina de plata se receta en el 70 % de los centros para quemados en Estados Unidos de América [27], se utiliza como antiséptico, astringente y en veterinaria, para el tratamiento de las heridas e inflamaciones locales [28].

Las propiedades antibacterianas de la plata conocidas desde hace varios siglos [29] conteniendo plata entre 1 a 100 nm en agua desionizada [30]. La propiedades antibacterianas se reportan de 0.1 µg/L; la concentración para la actividad fungicida de 1.9

$\mu\text{g/L}$  [31]. Así la plata y sus derivados corresponden al tipo de biocidas que actúan mediante su unión con grupos sulfhidrilos o tioles, así como aminos de las proteínas. Los grupos tioles, que derivan de los residuos de cisteína, son vitales para la actividad de enzimas. La reacción con o la oxidación de estos grupos esenciales producen inhibición celular [32].

De manera general las sales metálicas de plata tienen como sitio de acción los constituyentes citoplasmáticos y mediante mecanismos de coagulación, ataque a los ácidos nucleicos y a los ribosomas [32]. En altas concentraciones, los iones de  $\text{Ag}^+$  inhiben gran cantidad de reacciones enzimáticas, reaccionando con los grupos donadores de electrones [27]. La translocación de sodio ( $\text{Na}^+$ ) por la enzima oxido reductasa ubiquinona ha sido reconocida como uno de los primeros blancos de los iones de plata [27] incluso la adición de concentraciones micromolares de  $\text{Ag}^+$  fuera de la membrana vesiculares de *V. cholerae* inducida en un colapso total del gradiente transmembranal de pH [27].

Las sales de plata producen cambios estructurales en la pared celular de algunas bacterias como *P. aeruginosa*, y gran afinidad por virus como el VIH [33]. Los iones de plata no tienen ningún efecto sobre las esporas bacterianas [34] sin embargo tienen gran afinidad por el ADN tanto bacteriano como eucariótico, donde interactúan preferentemente con las bases nitrogenadas más que con los grupos fosfato [35].

Otro de los mecanismos bactericidas de la plata es la inducción de la liberación de iones de potasio ( $\text{K}^+$ ) de los microorganismos tanto del plasma microbiano como de la membrana citoplasmática, lo cual es asociado al funcionamiento adecuado de algunas enzimas [35].

La plata no es un elemento esencial para los humanos [36], sin embargo, parece acumularse con la edad [37] y aunque la naturaleza y sitio de acumulación aun no ha sido localizado [38] se sabe que la deposición de la plata en la piel ocurre en pacientes que ingieren crónicamente productos de plata coloidal.

A la deposición de la plata en la piel se le denomina Argyria y Argryrosis cuando la deposición de plata sucede en otros órganos [39]. La Argyria por la ingestión de derivados de la plata, aplicación de cremas y contacto con sales de plata [40]. No obstante no es

probable que se produzca la enfermedad con dosis orales acumuladas inferiores a 3.8 g [28] una vez que se desarrolla la acumulación de plata, ésta no es reversible, pues no existen tratamientos efectivos sin embargo se han logrado mejorías clínicas administrando agentes quelantes [28].

### **2.2.1 EFECTOS ANTIMICROBIANOS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN LEVADURAS, BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y GRAM-NEGATIVAS**

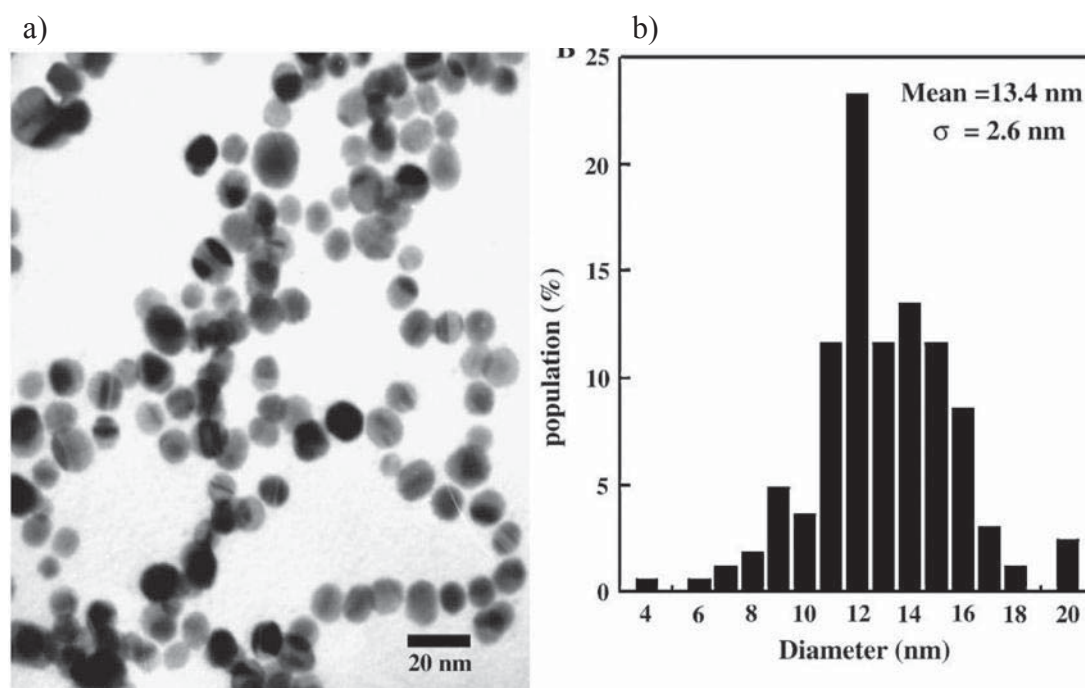
El efecto antimicrobiano de plata (Ag) de iones o sales son bien conocidos, pero los efectos de las nanopartículas de Ag en los microorganismos y el mecanismo de los antimicrobianos no se han revelado claramente.

Se prepararon nanopartículas de Ag estables, su forma y distribución de tamaño caracterizado por el estudio de microscopía electrónica de transmisión. La actividad antimicrobiana de las nanopartículas de Ag se investigó sobre las levaduras, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. En estas pruebas, se utilizaron las placas de agar Muller Hilton y Ag nanopartículas de diferentes concentraciones fueron complementados en los sistemas de líquido. Como resultados, las levaduras y *E. coli* fueron inhibidas a la baja concentración de nanopartículas de Ag, mientras que los efectos inhibidores del crecimiento de *S. aureus* fueron leves. El efecto de la generación de radicales libres de las nanopartículas de Ag en la inhibición del crecimiento microbiano fue investigado por espectroscopía de resonancia de spin electrónico. Estos resultados sugieren que las nanopartículas de Ag pueden ser utilizadas como inhibidores del crecimiento efectivo en diversos microorganismos, lo que las hace aplicables a los diversos dispositivos médicos y sistemas de control de los antimicrobianos.

La resistencia microbiana a múltiples antibióticos, aumento en los costos de atención de la salud a raíz de esto muchos investigadores han probado nuevos reactivos y desarrollos antimicrobianos buscando eficacia y costo. En esta perspectiva han dado lugar al resurgimiento de antisépticos basados en Ag vinculados a la actividad de amplio espectro biocida, menor inducción a la resistencia microbiana. Aquí, se reporta que las

nanopartículas de Ag se pueden aplicar de manera efectiva en el control de microorganismos y prevención de las infecciones. Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que las nanopartículas de Ag se pueden preparar de una manera sencilla y rentable y son adecuados para la formulación de nuevos tipos de materiales bactericida.

En este estudio se hace uso de nanopartículas de Ag que se pueden preparar de manera rentable, homogénea (Figuras 2.10) y estable, permitiendo que su tamaño tenga mayor contacto con los microorganismos.



**Figura 2.10** a) Una imagen de TEM de las nanopartículas de Ag dispersas en una rejilla de cobre (una variación en la escala de 30 nm). b) Un histograma que muestra la distribución del tamaño de las nanopartículas de Ag.

Los resultados de las levaduras, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, sugieren que los efectos antimicrobianos de las nanopartículas de Ag puede estar asociada con las características de las especies bacterianas. Las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas que se diferencian por su estructura de membrana diferenciada en contenido de péptidoglicano. Se sugiere que la menor eficacia de las nanopartículas de Ag frente a *S. aureus* puede derivar de la diferencia estructural de la membrana. La capa de péptidoglicano es una característica específica de membrana bacteriana. Por tanto, si el

efecto antibacteriano de las nanopartículas de Ag se asocia con la capa de peptidoglicano será más concreta usar las nanopartículas de Ag como agente antibacteriano.

Para diferenciar la actividad antimicrobiana entre las nanopartículas de Ag y otras nanopartículas metálicas, probaron inhibición de crecimiento usando nanopartículas de oro con diámetro de 30 nm para estimar los posibles efectos secundarios de otros componentes que podrían incluirse en la solución de nanopartículas de Ag se preparo el control del vehículo, en el que las nanopartículas de Ag fueron removidas por sedimentación. Los resultados indican que no hay actividad fundamental a los antimicrobianos, ya sea en nanopartículas de oro o el control del vehículo, lo que sugiere que la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de Ag es un evento específico de la Ag en estas condiciones experimentales [1].

El mecanismo de los efectos inhibitorios en iones de Ag sobre los microorganismos se conoce parcialmente. Algunos estudios han informado de que la carga positiva del ion Ag es crucial para su actividad antimicrobiana a través de la atracción electrostática entre la membrana celular del microorganismo que se encuentra cargada negativamente y positiva la carga de las nanopartículas. Por el contrario, Sondi y SalopekSondi [41] reportaron que la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata sobre las bacterias Gram-negativas fue dependiente de la concentración y se asoció estrechamente con la formación de depósitos en la pared celular. Así las nanopartículas de Ag acumuladas en la membrana bacteriana afecta la permeabilidad resultando en muerte celular. Sin embargo, los iones con carga positiva y las nanopartículas con carga negativa, son insuficientes para explicar el mecanismo de los antimicrobianos cargados con nanopartículas de Ag. Por lo tanto podría no ser un mecanismo posible. Amro y col. sugirieron que el agotamiento del metal puede causar la formación de pozos de forma irregular en la membrana externa y la permeabilidad de la membrana cambia, esta es causada por la liberación progresiva de moléculas de lipopolisacáridos y proteínas de la membrana [42]. Además, Sondi y Salopek especulan que un mecanismo similar puede causar la degradación de la estructura de la membrana de *E. coli* durante el tratamiento con nanopartículas de Ag [41]. Aunque su deducción es que participa algún tipo de mecanismo vinculante, el que aún no está claro es el mecanismo de la interacción entre las nanopartículas de Ag y el componente de la membrana externa.

Recientemente, Danilczuk y col. [43] informaron que la Ag genera radicales libres probado en nanopartículas de Ag por ESR. Se sugiere, que el mecanismo de los antimicrobianos de las nanopartículas de Ag está relacionada con la formación de radicales libres y daño de los radicales libres posteriores inducidos por la membrana. Para confirmar la producción de radicales libres, se analizaron las nanopartículas de Ag por ESR. Para determinar la relación entre la actividad de los radicales libres y el efecto antimicrobiano, se utilizó el NAC antioxidante para probar si los antioxidantes pueden influir en las nanopartículas de Ag inducidas por la actividad antimicrobiana. Los resultados de la VSG y el estudio de antioxidantes sugieren que los radicales libres se pueden derivar de la superficie de las nanopartículas de Ag y será responsable de la actividad antimicrobiana en estas condiciones experimentales. Las aplicaciones de nanopartículas de Ag sobre la base de estos hallazgos pueden conducir a descubrimientos valiosos en diversos campos, tales como dispositivos médicos y sistemas de antimicrobianos [1].

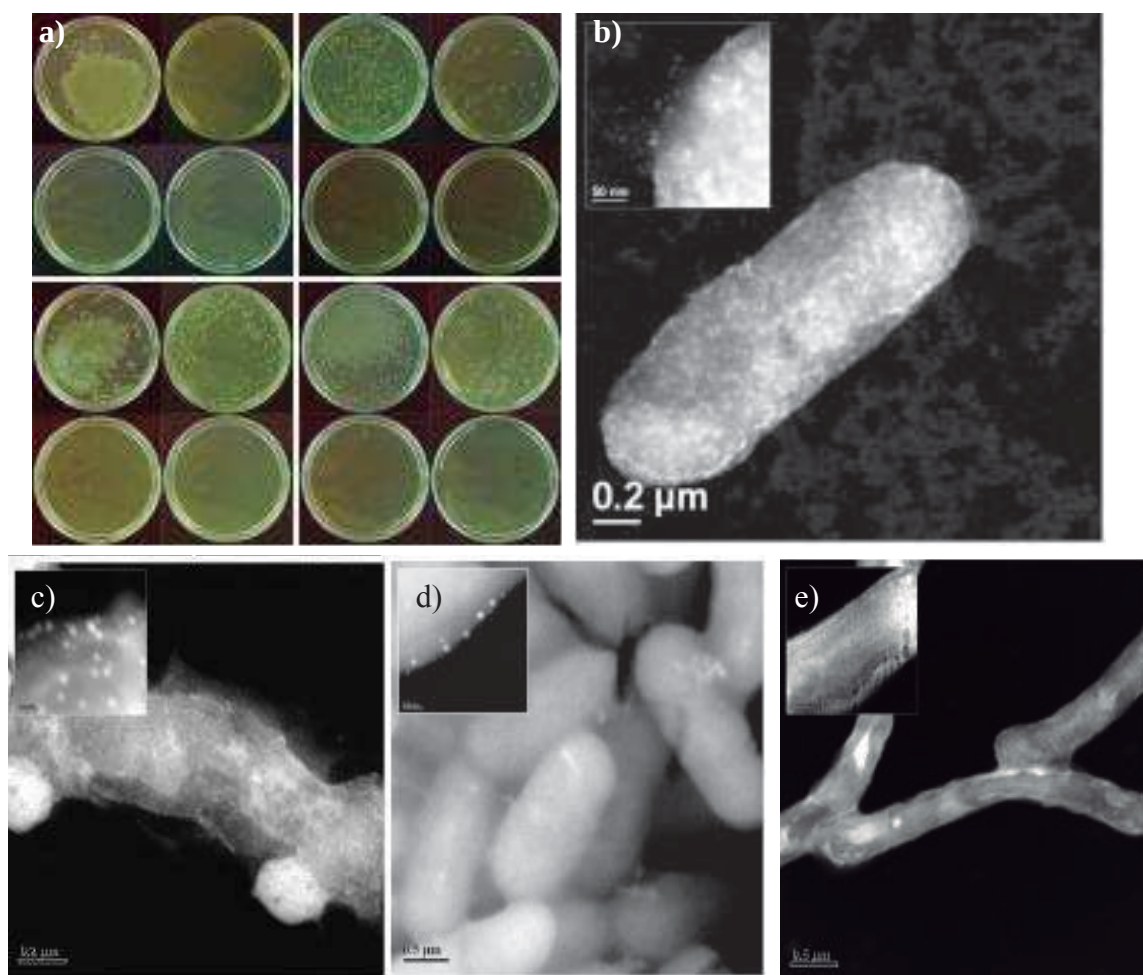
### **2.2.2 EL EFECTO BACTERICIDA DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA**

Las nanopartículas de plata utilizadas en este trabajo fueron sintetizadas por las Inc. nanotecnologías, el producto final es un polvo de nanopartículas de plata dentro de una matriz de carbono, lo que impide la coalescencia durante la síntesis. El polvo de nanopartículas de plata se suspende en el agua con el fin de realizar la interacción de las nanopartículas de plata con las bacterias, para la homogeneización de la suspensión se utiliza un limpiador ultrasónico. Las partículas en solución se caracterizan por poner una gota de la suspensión homogénea en un microscopio electrónico de transmisión de la red de cobre con una película de carbón de encaje con TEM.

Como primer paso, varias concentraciones de nanopartículas de plata (0, 25, 50, 75 y 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) fueron probadas para cada tipo de bacterias. En placas de agar con una solución de Luria-Bertani (LB) como medio de cultivo y preparadas a diferentes concentraciones de nanopartículas de plata, seguido por una muestra de la fase de registro con una densidad óptica de 0.5 a 595 nm y 37°C [44].

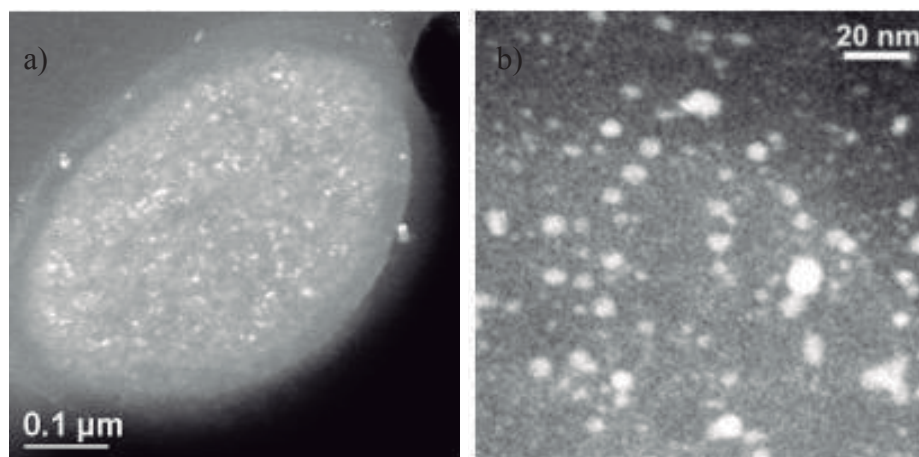
Los resultados demostraron que la concentración de nanopartículas de plata que impide el crecimiento de bacterias es diferente para cada tipo, la *P. aeruginosa* y *V. cholerae* son más resistentes que *E. coli* y *S. tifus*. Sin embargo, en concentraciones por encima de  $75 \text{ mg ml}^{-1}$  no hubo un crecimiento significativo para ninguna de las bacterias (Figura 2.11 (a)).

Los resultados que se muestran en las Figuras 4.9 (b) y (c) sugieren que HAADF es útil para determinar la presencia de nanopartículas de plata muy pequeñas ( $\sim 1 \text{ nm}$ ) sobre las bacterias que aparecen como manchas.



**Figura 2.11** a) Bacterias cultivadas en placas de agar a diferentes concentraciones de nanopartículas de plata. Arriba a la izquierda, la *E. coli*, superior derecha, *S. tifus*; abajo a la izquierda, *P. aeruginosa*, y abajo a la derecha, el *V. cholerae*.  $0 \text{ g / ml}^{-1}$  (superior izquierda),  $25 \text{ mg ml}^{-1}$  (superior derecha),  $50 \text{ mg ml}^{-1}$  (abajo izquierda) y  $75 \text{ mg ml}^{-1}$  (inferior derecha). HAADF MADRE imágenes que muestran la interacción de las bacterias con las nanopartículas de plata: b) de *E. coli*, c) *S. tifus*, d) *P. aeruginosa* y e) de *V. cholerae*. Las inserciones corresponden a las imágenes de mayor aumento.

El análisis detallado mostró el interior de la bacteria y demostraron que las nanopartículas no sólo se encuentran en la superficie de la membrana celular, sino también dentro de la bacteria (figuras 2.12 (a) - (b)). Esto fue confirmado por un análisis de mapeo elemental utilizando el espectrómetro de rayos X de energía dispersiva (EDS) en (figura 2.12 (a)). Las nanopartículas no solo se encuentran distribuidas a lo largo de la célula, sino que estaban unidos a la membrana y también fueron capaces de penetrar en las bacterias.



**Figura 2.12** a) Presencia considerable de las nanopartículas de plata se encuentra en la membrana y el interior de una muestra de *E. coli*. Derecha: EDS mapeo elemental. Se puede observar que la plata está bien distribuida a través de la muestra. b) Un primer plano del interior de una muestra de *E. coli* tratadas con nanopartículas de plata. Una vez más, la presencia de nanopartículas de plata se observa.

Se estima que la concentración de plata efectiva la y el tamaño general descrito en el manuscrito (el tamaño medio de 21 nm y una desviación estándar de 18 nm) generan una hipótesis: “todas las nanopartículas menores que  $\sim 10$  nm son las que interactúan con las bacterias”. Si tenemos en cuenta el peso de las nanopartículas con la distribución del tamaño general, los resultados indican que el porcentaje en peso de nanopartículas de entre 1 y 10 nm corresponde a 0.093% de la muestra. Aun cuando este valor parece ser pequeño, corresponde a un gran número de nanopartículas por mililitro teniendo en cuenta la concentración de nanopartículas de plata es de  $75 \text{ mg ml}^{-1}$  que resultó ser eficaz para todas las bacterias. El diámetro promedio de  $\sim 5$  nm y una densidad de plata de  $1,05 \times 10^{-14} \text{ mg nm}^{-3}$  se utiliza para aproximar el número de partículas de entre 1 y 10 nm ( $\text{ml}^{-1}$ ,  $\sim 9.8 \times 10^{10}$ ) [44].

Las partículas metálicas de pequeño tamaño ( $\sim 5$  nm) presentan efectos electrónicos, que se definen como cambios en la estructura electrónica local de la superficie debido al tamaño. Estos efectos se presentan para mejorar la reactividad de superficies de las nanopartículas [45]. Además, es razonable proponer que la fuerza vinculante de las partículas de la bacteria depende de la superficie de interacción. Un mayor porcentaje de la superficie tendrá una interacción directa en partículas más pequeñas que las grandes, estas dos razones mencionadas antes, explican la presencia solo de partículas de  $\sim 1$  a 10 nm.

El mecanismo por el cual las nanopartículas son capaces de penetrar las bacterias no se entiende totalmente, pero Salopek sugiere que en *E. coli* tratadas con nanopartículas de plata ocurren cambios en la morfología de membrana, incrementando significativamente la permeabilidad y afectando el transporte de la membrana plasmática [2]. Esta información podría explicar el depósito de nanopartículas de plata dentro de la bacteria (figura 2.12 (b)) [44].

La observación de las nanopartículas de plata unidas a la membrana celular (Figuras 2.11 (b) - (e)) y dentro de la bacteria (figuras 2.12 (a) - (b)) es fundamental en la comprensión de los mecanismos bactericidas con lo establecido por la teoría de los ácidos duros, blandos y las bases, la plata tendrá tendencia a tener una mayor afinidad para reaccionar con el fósforo y compuestos de azufre [46-47-48].

La membrana de bacterias contiene muchas proteínas azufradas [49], las cuales representan sitios preferenciales para depósitos de nanopartículas de plata. Además estas nanopartículas al interior también tenderían a reaccionar con otras proteínas azufradas, así como a reaccionar con el fósforo presente en ADN [8]. Para concluir, los cambios en la morfología presentes en la membrana de las bacterias y reacción con compuestos esenciales afectan procesos como la cadena respiratoria, división celular y finalmente la muerte celular [49].

Las nanopartículas de plata actúan principalmente de tres maneras contra bacterias Gram-negativas: (1) las nanopartículas en el rango de 1-10 nm se adhieren a la superficie de la membrana celular y alteran drásticamente su correcto funcionamiento en la permeabilidad y la respiración; (2) las nanopartículas son capaces de penetrar la bacteria y causar daños en moléculas que contienen azufre y fósforo, (3) con nanopartículas e iones de

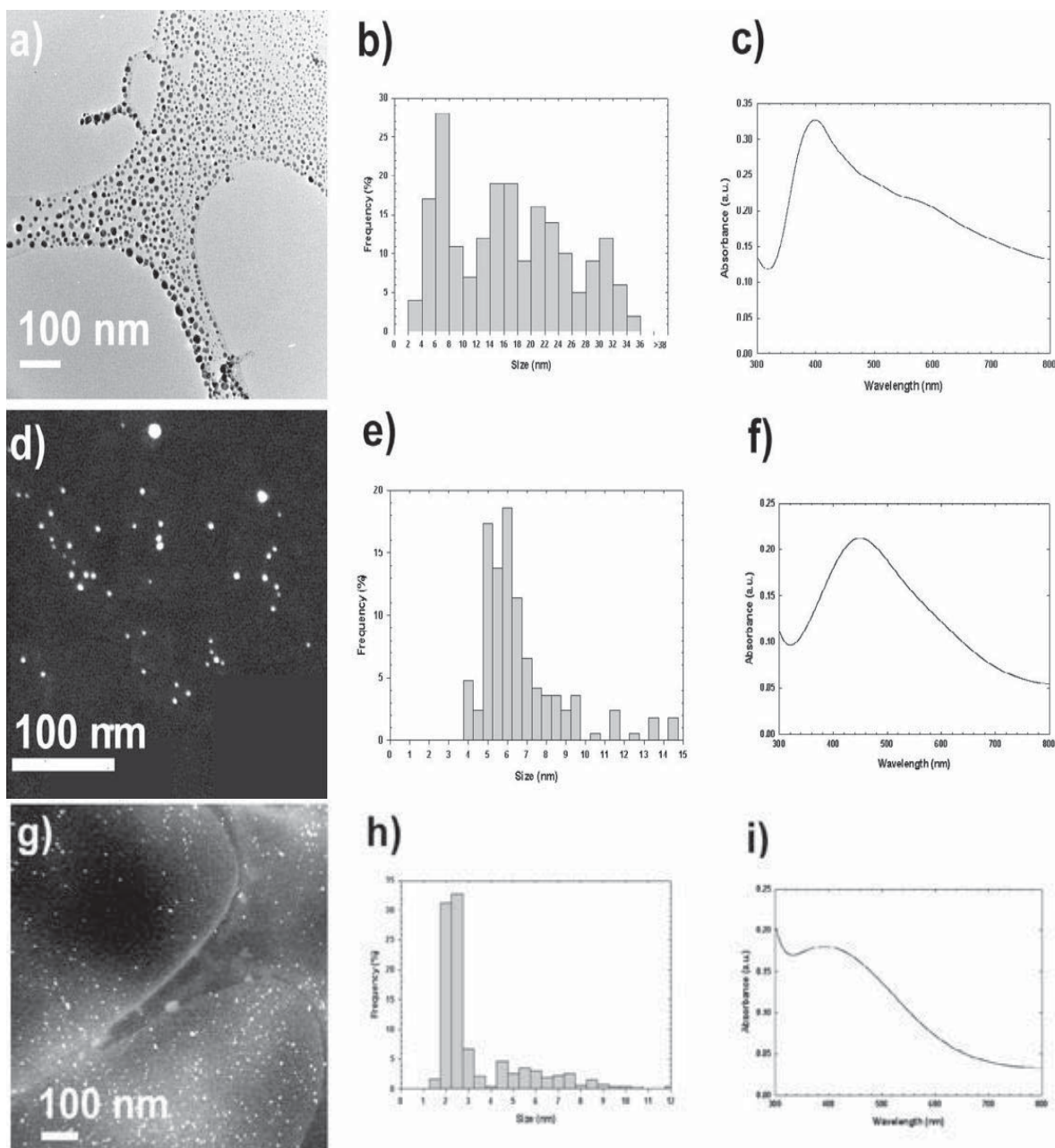
plata, que tienen una contribución adicional para el efecto bactericida de las nanopartículas plata como la reportada por Feng [50].

### **2.2.3 INTERACCIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA CON EL VIH-1**

La interacción de las nanopartículas con biomoléculas y microorganismos es un campo en expansión de la investigación. Dentro de este campo, un área que ha sido en gran parte sin explorar es la interacción de las nanopartículas de metal con los virus.

Nanopartículas recubiertas de espuma de carbono se obtuvieron de las nanotecnologías, Inc., sin utilizar ningún tratamiento adicional. Estas nanopartículas forman parte de una matriz de carbono espuma que impide la coalescencia durante su síntesis. La muestra de nanopartículas que se reciben consiste en un polvo negro muy fino. Los efectos del polvo que se recibe se deben a la dispersión de estos en agua desionizada por ultrasonidos. Los análisis por TEM muestran que las nanopartículas tienden a aglomerarse en el interior de la matriz de carbono espuma, aunque una fracción significativa de la población se libera de esta matriz por la energía proporcionada del baño de ultrasonidos (Figura 2.13a y 2.13f). Estas nanopartículas son liberadas principalmente como nanopartículas de superficie libre, y se observó que las nanopartículas que se han escapado de la matriz de carbono espuma interactuar con el VIH-1 en las células.

La liberación de las nanopartículas de carbono que queda en la espuma de la matriz, fue de un tamaño promedio de  $\sim 21 \pm 18$  nm. Además, el examen por TEM demostró que la muestra se compone de varias morfologías incluyendo nanopartículas multihermanadas con cinco simetría distintas, es decir, decaedros e icosaedros, pirámides truncadas, las nanopartículas octaédricos y cubo-octaédricos, entre otros (Figura 2.13c y 2.13f) [51].



**Figura 2.13** Nanopartículas de plata de los preparativos. a) una imagen en TEM de nanopartículas de plata la superficie libre de carbono liberado de la espuma de la matriz de dispersión como la recibida en polvo disuelta en agua desionizada por ultrasonificación. b) La distribución de tamaño de la superficie de las nanopartículas sin ser medida por el análisis de TEM. c) El espectro UV-visible de las nanopartículas de plata recubierta de carbono. d) la imagen HAADF de nanopartículas de plata PVP revestido. e) Distribución de tallas de las nanopartículas recubiertas con PVP medidas por el análisis de TEM. f) El espectro UV-visible de las nanopartículas de plata recubiertas con PVP. g) la imagen HAADF de nanopartículas de plata revestidas con BSA. h) Distribución de tallas de las nanopartículas BSA recubierto medido por el análisis de TEM. i) El espectro UV-visible de las nanopartículas de plata BSA-revestido.

Nanopartículas recubiertas con PVP fueron sintetizados por el método de poliol utilizando glicerina como agente reductor y solvente. En este método, un precursor del metal se disuelve en un poliol líquido en presencia de un agente de nivelación como PVP [52]. PVP es un polímero lineal y estabiliza la superficie de las nanopartículas a través de la vinculación con el anillo de la pirrolidona. Por medio de Infrarrojo (IR) y la espectroscopia de rayos X de fotoelectrones (XPS), los estudios han revelado que los dos átomos de oxígeno y el nitrógeno del anillo de la pirrolidona puede promover la adsorción de las cadenas de PVP en la superficie de la plata [53].

Las nanopartículas mostraron un tamaño promedio de 6.53 nm con una desviación estándar de 2.41 nm (Figura 2.13 (d) y 2.13 (e)).

Nanopartículas de plata directamente conjugado con moléculas de proteínas BSA fueron sintetizados en disolución acuosa. La albúmina es una proteína globular, y es la proteína más abundante en el plasma sanguíneo. La albúmina de suero bovino (BSA) es una cadena polipeptídica única compuesta de 583 residuos de aminoácidos [54]. Varios de los residuos de BSA tienen oxígeno, azufre y llevan grupos de nitrógeno que puede estabilizar la superficie de las nanopartículas.

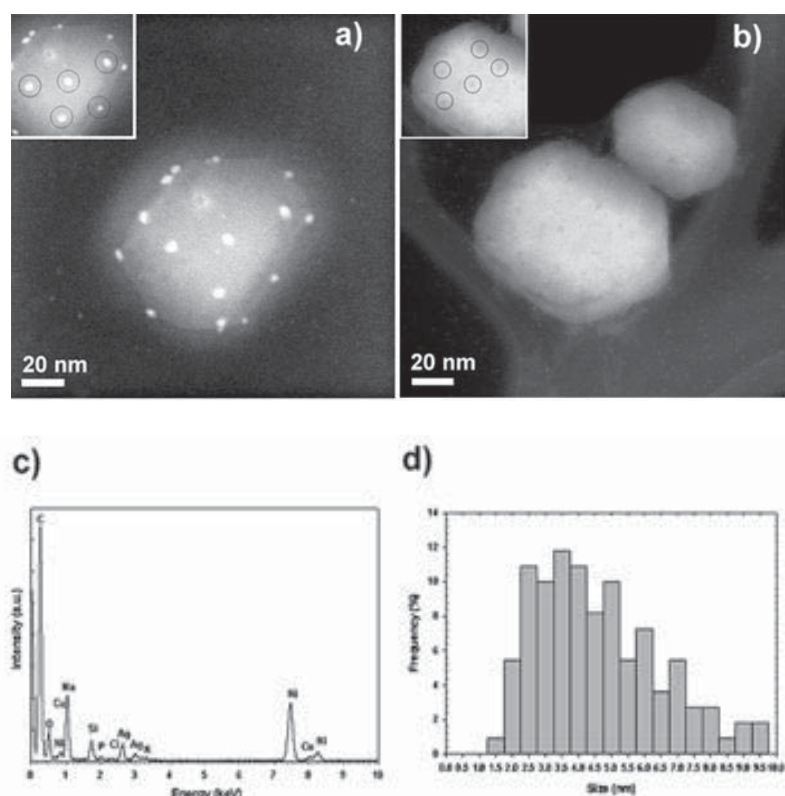
Casi el 75% de las nanopartículas de plata conjugadas con BSA fueron de  $2.08 \pm 0.42$  nm de diámetro, pero una fracción importante de partículas de mayor tamaño también se observó, con lo que el promedio total es de  $3.12 \pm 2.00$  nm (Figura 2.13 (g) y 2.13 (h)).

## **Interacción con el VIH**

En la figura 2.14, se presentan imágenes por HAADF del virus VIH-1, en (2.14(a) con nanopartículas de plata impregnadas y en (2.14 (b)) sin las nanopartículas de plata. La presencia de la plata fue confirmada de forma independiente por energía dispersiva de rayos X espectroscopia (EDS), que se muestra en la Figura 2.14(c). Curiosamente, el tamaño de las nanopartículas vinculada al virus (Figura 2.14 (d) eran exclusivamente dentro del rango de 1 a 10 nm, en el caso de las nanopartículas de plata liberadas de la matriz de carbono, muestran que las nanopartículas no mayor de 10 nm de diámetro que se observaron interactuando con el virus son significativas, ya que el tamaño de la población

en general está más allá del rango de  $\sim 40\%$ . Esto proporciona una fuerte evidencia para el tamaño de la dependencia de la interacción.

Además, las nanopartículas que se ven en la Figura 4.12 (a) adjuntas al virus no son al azar, como regular las relaciones espaciales que se observan entre los grupos de tres partículas. Tanto la disposición espacial de las nanopartículas y la dependencia del tamaño de la interacción puede ser explicado en términos de la envoltura del VIH-1 viral, y pueden proporcionar información sobre el modo de interacción entre el virus y nanopartículas [51].



**Figura 2.14** HAADF imágenes de los virus VIH-1. a) Una imagen por HAADF de un virus VIH-1 expuestos a las nanopartículas de plata conjugados con BSA. El recuadro muestra la disposición regular espacial entre grupos de tres nanopartículas. b) la imagen por HAADF del virus VIH-1 sin tratamiento de nanopartículas de plata. El recuadro de relieve y la disposición espacial regular observada en la superficie de los virus VIH-1 no tratados. c) análisis de EDS de la imagen a) confirman la presencia de Ag. La señal C proviene tanto de la red MET y el virus, O y P son a causa del virus, y Na, Cl y K están presentes en el medio de cultivo. Ni y Si vienen de la red MET, mientras que Cu se atribuye al titular de la muestra. d) la distribución de tamaño compuesta de las nanopartículas de plata unidas al virus VIH-1, se derivan de todas las preparaciones de la prueba.

El exterior del virus VIH-1 se compone de una membrana lipídica entremezclada con las perillas de la glicoproteínas que sobresalen, formados por trímeros y estos por dos subunidades: la subunidad de glicoproteína gp120 de la superficie está expuesta al exterior, y la gp41 transmembranal abarca la subunidad glucoproteica de la membrana viral y conecta el exterior de la glicoproteína gp120 con el interior P17 que es una proteína de la matriz [55]. La principal función de estos mandos es la glicoproteína gp120 que resalta y se unen a los receptores CD4 de las células huésped. Numerosas proteínas celulares también están integradas dentro de la envoltura viral [56]. Sin embargo, la que sobresale es la glicoproteína gp120 y los mandos están más expuestos al exterior, debería ser más accesible para las interacciones potenciales de las nanopartículas.

Leonard y colaboradores [57] reportaron que la subunidad gp120 tiene nueve puentes disulfuro, tres de los cuales se encuentran en las inmediaciones del dominio de unión de CD4. Estos enlaces disulfuro expuesto pueden ser los sitios más atractivos para las nanopartículas de interactuar con el virus. Como se mencionó anteriormente, las nanopartículas parecen estar situadas en posiciones específicas. Los arreglos espaciales observados se correlacionan con las posiciones de la glicoproteína gp120 que son mandos en el modelo estructural para el VIH-1 propuesto por Nermut y compañeros de trabajo [55]. Previamente se ha determinado que el espacio del centro de entre las perillas de la glicoproteína es de  $\sim 22$  nm [58]. En el recuadro de la Figura 4.12 (a), la media del espaciamiento de centro a centro entre las nanopartículas de plata es de  $\sim 28$  nm, que se correlaciona con la distancia esperada entre las perillas de la glicoproteína. La media de la separación entre las pequeñas regiones más oscuras sobre el virus sin tratamiento es de  $\sim 22$  nm, lo que también sugiere que estos sitios son la perillas de las glicoproteína gp120. Por lo tanto, la disposición espacial observada de las nanopartículas, de la distancia entre el centro de las nanopartículas y el hecho de que los residuos expuestos de azufre de sustentación de las perillas de la glicoproteína serían sitios atractivos para la interacción de las nanopartículas de plata con el VIH-1 del virus mediante la unión preferencial a las perillas de la glicoproteína gp120.

Suponiendo que los sitios más atractivos para la interacción son los residuos de azufre de sustentación de la glicoproteína gp120, sólo hay un número limitado de enlaces que puede formar una nanopartícula. Este número limitado de estabilización de los sitios se

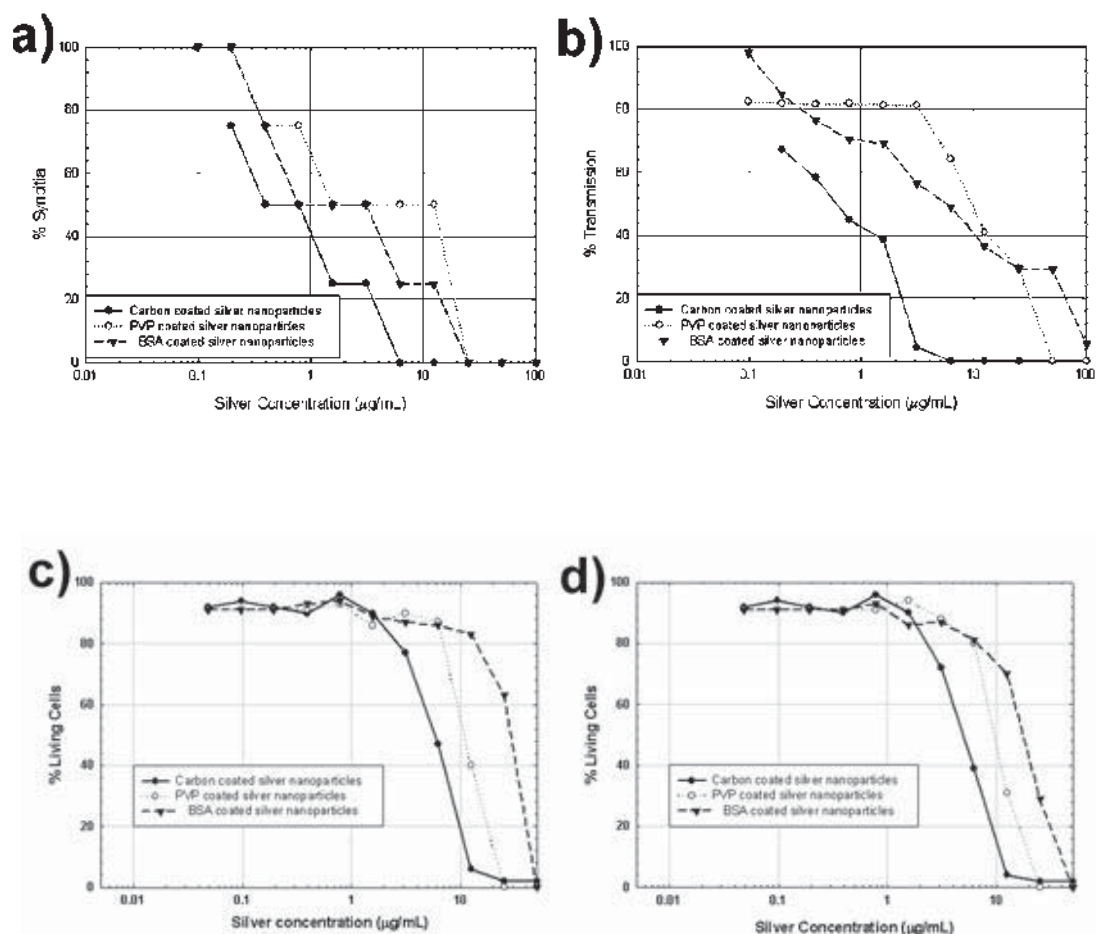
puede explicar por qué las grandes nanopartículas no se observan en la unión al virus. Suponiendo que cada nanopartícula interactúa con un sitio único de la glicoproteína, y que cada espacio de vecino más cercano está ocupado por otra de las nanopartículas, a partir de consideraciones geométricas del límite superior teórico para el diámetro de estas nanopartículas sería de aproximadamente 20 nm, sin embargo, si una nanopartícula más grande que el diámetro de un botón (~ 14 nm [58]) iban a ser conectados, sólo una pequeña fracción de la superficie de las nanopartículas totales serían ancladas, lo que resulta en una interacción menos estable. Por lo tanto, si las nanopartículas están interactuando con el VIH-1 a través de su unión preferencial a las perillas de la glicoproteína gp120, que se espera encontrar en su mayoría nanopartículas de menos de 14 nm de diámetro, en forma de partículas de este tamaño tendría las interacciones de superficie más estables. Esto se corresponde estrechamente con nuestra observación experimental de que las partículas mayores de 10 nm no unen adecuadamente a la envoltura viral.

Aunque el mecanismo por el cual el VIH infecta a las células huésped todavía no está completamente entendido, hay dos pasos que se acordaron en términos críticos generales. El primer paso consiste en la unión de la gp120 al sitio receptor CD4 en la célula huésped. Entonces, al unirse a CD4, un cambio conformacional se induce en la gp120, lo que resulta en la exposición de los nuevos sitios de unión para un receptor de quimiocinas, CCR5 o CXCR4 es decir, [36-38], un agente que interactúa preferentemente con la glicoproteína gp120 podría bloquear el virus de la unión con las células huésped. Por lo tanto, se midieron los efectos inhibitorios de nanopartículas de plata contra el VIH-1 in vitro.

La capacidad de las nanopartículas de plata para inhibir la infectividad del VIH-1 se determinó mediante pruebas en contra de CD4 + células MT-2 y cMAGI VIH-1 las células del reportero [51].

Los efectos infecciosos citopáticos de células CD4 + MT 2 se analizaron mediante microscopía óptica de evaluación de la formación de sincicio como se describe en otro lugar [59-60], así como por la infección de VIH-1 de células cMAGI utilizando el ensayo azul tripán de la célula [61-62]. La citotoxicidad de todos los preparativos de nanopartículas contra células MT-2 se determinó utilizando el ensayo de azul tripán exclusión [63]. Para las tres preparaciones de nanopartículas, en concentraciones de plata por encima de 25

mg/ml, la infectividad viral se redujo en un grado que no podía ser detectado por la formación de sincitios, como se muestra gráficamente en la Figura 4.13 Para cada preparación de nanopartículas, se encontró una inhibición dependiente de la infecciosidad del VIH-1, donde sólo se observó toxicidad celular moderada, como se ve en la Figura 2.15



**Figura 2.15** La inhibición del VIH-1 y los datos de toxicidad. a) Evaluación del VIH-1 mediada por la formación de sincitios en células MT-2. b) El porcentaje de transmisión del VIH-1 en células cMAGI. La toxicidad de los preparados de nanopartículas contra células MT-2 se determinó utilizando el ensayo de azul tripán exclusión. Las muestras fueron incubadas a 37 ° C, y las células se evaluó a través de microscopía óptica tras c) 3 h, y d) 24 horas de exposición a las nanopartículas de plata.

# CAPÍTULO III

**ESTUDIO DE LAS ESPECIES DE PLATA  
SOPORTADAS EN CUERO, POR ESPECTROSCOPÍA  
DE REFLECTANCIA DIFUSA UV-vis Y  
ESPECTROSCOPÍA DE EMISIÓN ATÓMICA (ICP)**

Los cueros de mamíferos tienen una estructura variada entre la epidermis y dermis, por lo que las interacciones entre los iones, cúmulos, nanopartículas metálicas y una matriz orgánica van desde la absorción por poros hasta un complicado ensamblaje en el interior o en paredes. Las interacciones metal-cuero evaluando diferentes parámetros experimentales permiten seguir las relaciones de las especies metálicas y su que estabilidad pensando en el cueros para calzado y prendas de la industria peletera.

Uno de los procesos de aplicación de plata en cuero es la absorción por baño en una solución de la plata coloidal antes descrita en el capítulo anterior.

Los estudios por espectroscopia de reflectancia difusa UV-visible (ERD UV-vis) se describe la presencia de una gran variedad de especies de plata en disolución, así como nanopartículas soportadas en matrices de cueros de ganado bovino y porcino que indican que los átomos, iones, cúmulos y nanopartículas de plata poseen bandas de absorción características en la región UV-visible del espectro mismos que han sido objeto de estudios experimentales y teóricos de los cuales se respaldan los resultados generados en este trabajo (T.D. 61,71,76,78).

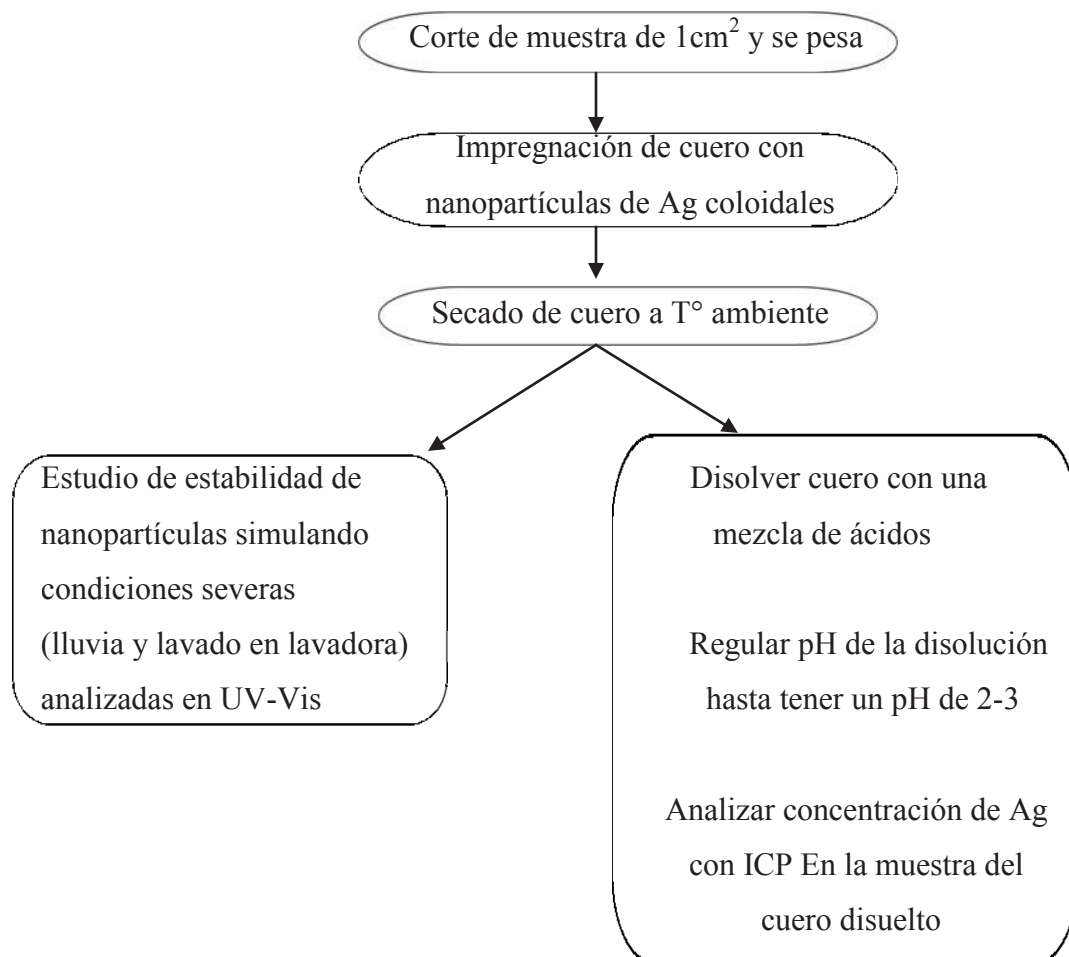
En este capítulo describe el proceso de reducción de los iones de plata intercambiados inicialmente en los cueros de ganado bovino y porcino, seguido por medio de la EDR UV-vis la cinética de formación de cúmulos y nanopartículas de plata.

Los resultados pretenden contribuir con la mejora en los materiales usados para la construcción de calzado especializado para usuarios con diabetes y contribuir en el cuidado del pie diabético.

### **3.1 MUESTRA DE CUERO IMPREGNADO CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA**

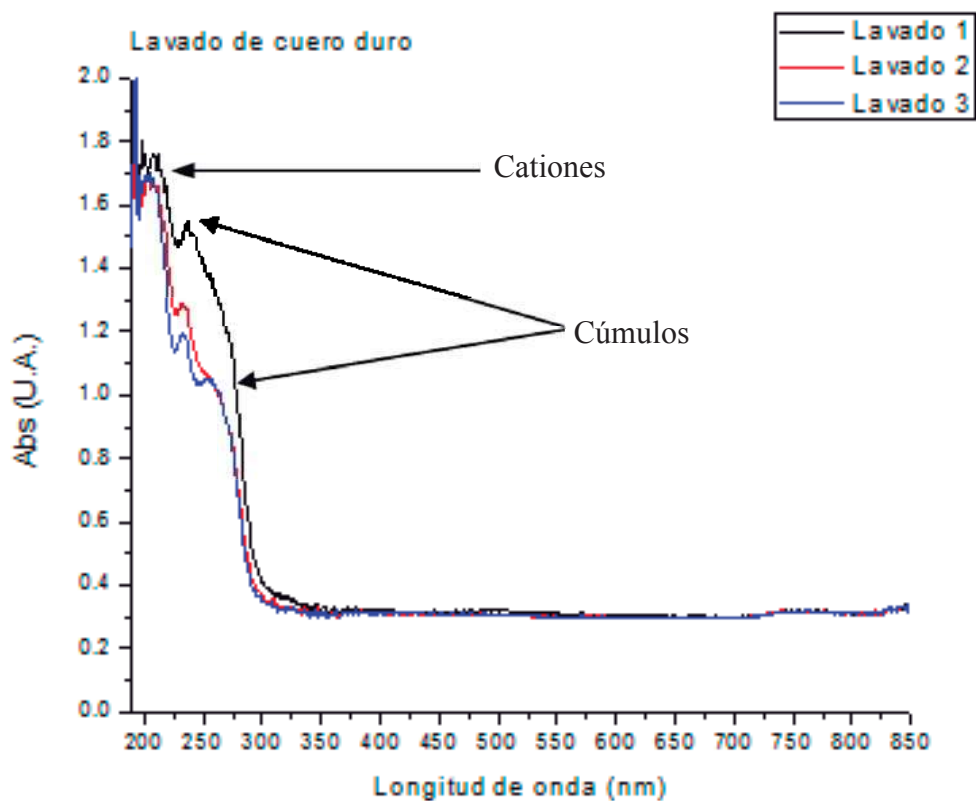
Los cueros de bovino y cerdo impregnados con el coloide de plata ya secados a temperatura ambiente. Una vez así preparados los cueros se sometieron a diferentes tipos de baños algunos simulando lluvia intensa, lavado sumergido al agua en su totalidad y otros simulando lavado violento con lavadora, con el propósito de evaluar las especies de plata, cantidad eliminada en el lavado, así como corroborar si la plata tiene capacidad de movilización desde los poros del cuero e indirectamente estimar propiedad biocida.

## METODOLOGÍA:



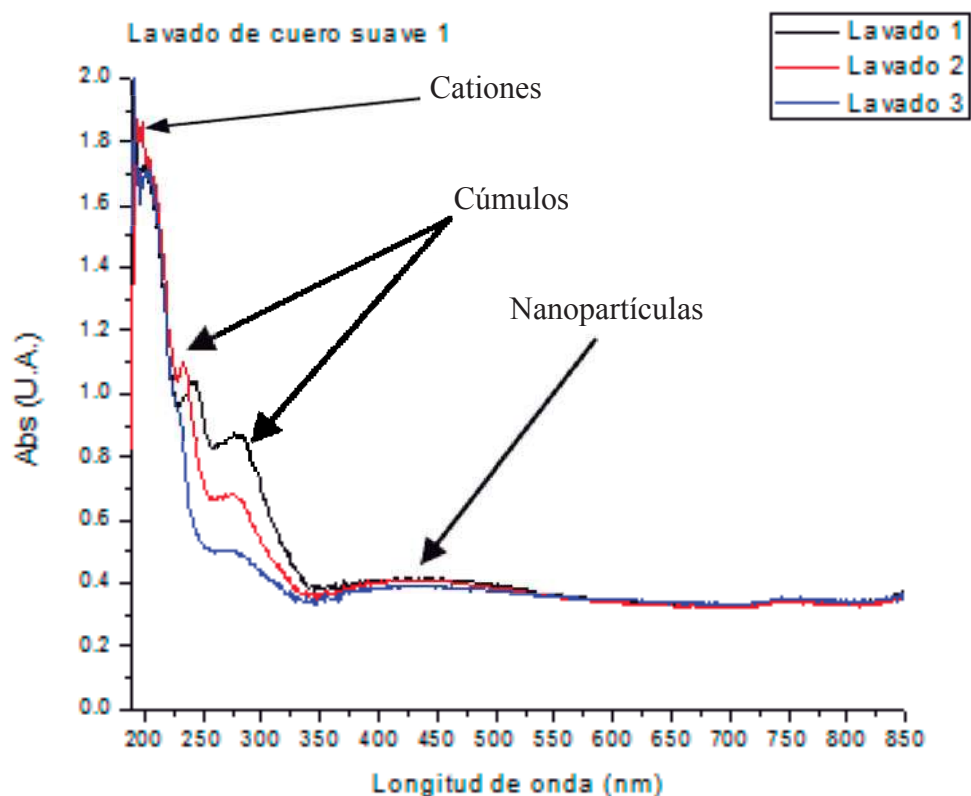
### 3.1.1 RESULTADOS OBTENIDOS POR ESPECTROSCOPÍA DE REFLECTANCIA DIFUSA UV-VIS

Posterior a los lavados el líquido del baño donde se sumergió totalmente el cuero, llamado cuero duro fue analizado por el UV-vis encontrando lo siguiente.



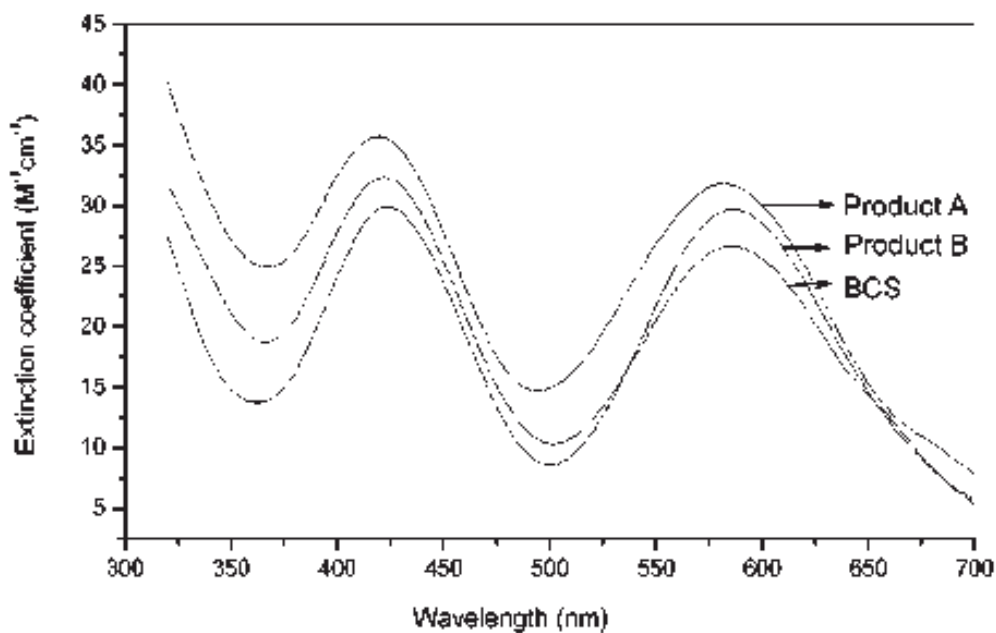
**Figura 3.1** Presencia de especies de plata en cuero duro analizado por UV-vis. Las especies encontradas en líquido del lavado son solamente salida de cationes y cúmulos de nanopartículas de plata analizados posteriores al baño en cuero duro.

Un segundo lavado en condiciones más violentas (lavadora) se realizó para apreciar de nuevo la capacidad y cantidad plata coloidal liberada al exterior del cuero, denominado cuero suave, lo observado fue lo siguiente.



**Figura 3.2** Presencia de especies de plata en cuero suave analizado por UV-vis. A diferencia del cuero duro, la grafica muestra salida de cationes, cúmulos y una nula cantidad de nanopartículas de plata del líquido analizado posterior al baño en el cuero suave.

En los procesos de manufactura de los diversos cueros de animales son tratados con un metal el cromo (Cr) el cual aparece en un rango muy similar al de plata entre 400 nm solamente que se diferencia en que el cromo hace aparecer una serie de marcas en diversas zonas del espectro 425 y 600 nm, lo corroborado con literatura (figura 3.3), para cerciorarse de que el cuero presenta la plata se realizaron diferentes espectroscopias de reflectancia.



**Figura 3.3** Muestra con cromo. La grafica rebela las diversas zonas de identificación de una muestra con cromo (CR) tomada de la literatura.

El estudio realizado de las graficas tomadas con espectroscopia de reflectancia difusa UV-vis encontramos que efectivamente las diversas especies de plata absorbidas y liberadas son solamente cationes, cúmulos y nanopartículas de plata y así mismo se corroboro que solamente es plata la que está presente ya que el cromo agregado a los cueros presenta una grafica diferente a la encontrada en nuestra investigación.

### 3.2 PROCESO DE DILUCIÓN DE CUERO

Se agregaron 2 ml del ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) al 97% y 2ml de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) al 98%, para obtener una mezcla de ácidos corrosivos, esto sumado a la muestra de cuero de  $1\text{cm}^2$  en un tubo plástico con rosca de 10 ml, se tomo con un pH-metro el rango de acides que se obtuvo de la mezcla y esta nos dio valores negativos, por lo que se esperaba una pronta desintegración del cuero, al no observar actividad de la mezcla de ácidos se dejaron en agitación el tiempo que fuera necesario, después de 24 horas y no

observar ningún deterioro en la muestra del cuero, se diluyo con 2ml de agua destilada e inmediatamente la muestra del cuero se desintegro en su totalidad quedando pequeñísimos residuos pegados al tubo, estos eran casi inapreciables al ojo humano ya que solo se apreciaba una coloración similar a la del cuero impregnada en las paredes del tubo, sumado a esto se observo que al racionar los ácidos y diluirlos el tubo comenzó a incrementar su temperatura rápidamente y al mismo tiempo a generar gran cantidad de gases.

Una vez disuelto el cuero con los ácidos aplicados se deberá diluir la muestra con agua destilada o con alguna sustancia que no forme nuevos compuestos con la plata, para ser analizado por espectroscopia de emisión atómica (ICP), para ver la concentración de plata que permanece en los cueros después de los lavados violentos y por sumersión. Ya que el pH que presenta nuestra muestra del cuero disuelto tiene un pH negativo, y podría llegar a dañar el equipo, cuando la muestra estrictamente haya alcanzado un pH entre 2 y 3 o mayor, esta pudo ser analizada por el ICP.

### **3.3 RESULTADOS OBTENIDOS POR ESPECTROSCOPIA DE EMISIÓN ATÓMICA ICP**

Los resultados obtenidos por espectroscopia de emisión atómica ICP muestran (tabla II y III) una perfecta cantidad de las distintas especies de plata en sus diferentes fracciones: iones, cúmulos y nanopartículas soportadas en la matriz de cueros bovino y porcino. Por otro lado, la cantidad de plata en los cueros tratados con un baño violento (lavadora) fue mayor respecto a los cueros que no se lavaron, lo que indica que la cantidad de plata absorbida depende del área anatómica o corte del cuero y edad del animal, cualquiera que sea el caso, se comprobó que la plata presente en un cuero tratado con baños violentos esté presente en cantidad y tiempo suficiente para valorar interacción en propiedades bactericidas con el usuario.

**Tabla II** Concentración de plata absorbida por muestra con ICP en un cuero sin lavar

| Tipo de cuero sin lavar | pH Optimo para muestrear | Concentración de plata en ppm |
|-------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| Cuero suave             | pH = 2.13                | 1.14 ppm                      |
| Cuero duro              | pH = 2.7                 | 0.25 ppm                      |

Las propiedades antibacterianas de la plata reportadas desde hace varios siglos, sobre todo con moléculas de plata entre 1 a 100 nm suspendida en agua y con 0.1 µg/L, y refiriendo a las cantidades de plata contenida en cuero desde 1.9 µg/L (1.1) deja en base las posibilidad de que la plata en el cuero presente inhibición sobre bacterias y posiblemente hongos (Tabla III)

**Tabla III** Concentración de plata absorbida por muestra con ICP en un cuero lavado

| Tipo de cuero lavado | pH óptimo para muestreo | Concentración de plata en ppm |
|----------------------|-------------------------|-------------------------------|
| Cuero suave          | pH = 2.11               | 1.87 ppm                      |
| Cuero duro           | pH = 1.97               | 0.11 ppm                      |

### 3.4 CONCLUSIÓN DEL CAPÍTULO

Las condiciones experimentales más favorables para obtener la forma intercambiada de Ag-cuero fue por medio de la absorción por sumersión total de los cueros de ganado bovino y porcino en el coloide de plata. El análisis de las muestras por UV-vis y espectroscopia de emisión atómica ICP permitió identificar las especies de plata soportadas en nuestra matriz biológica, que es el cuero de ganado bovino y porcino en función de la capacidad de absorción de los poros del cuero.

Las especies de plata contenidas al interior de las fibras de cuero son iones, cúmulos y nanopartículas oscilantes entre 1 y 10 nm que son los tamaños con los que se trabaja en este coloide. Con los datos del ICP se corrobora que efectivamente la cantidad de plata impregnada en los cueros es suficiente para producir el efecto microbicida deseado para ser utilizado en la elaboración del calzado.

Estas especies de plata introducidas en las fibras del cuero no han sido con anterioridad por lo que se espera contribuir al registro de patente internacional para la producción de un calzado modelo con nanoplata con propiedad inhibitoria de bacterias patógenas presentes en los pies.

# CAPÍTULO IV

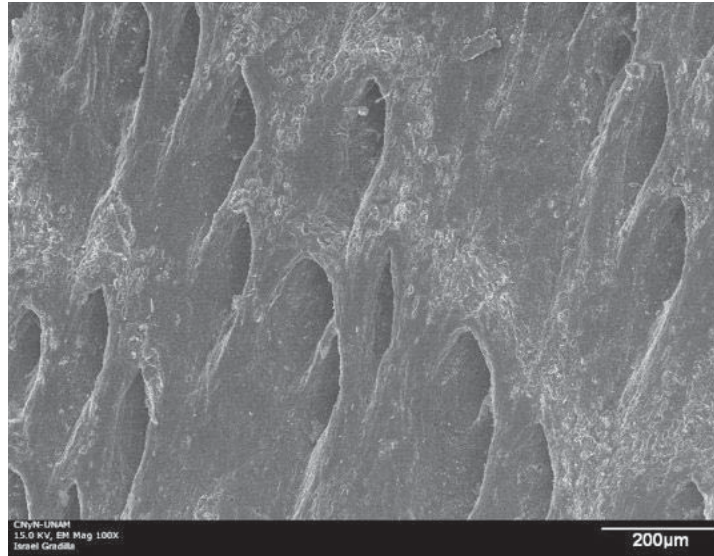
## **CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES POR MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)**

Los resultados previos de la espectroscopia UV-vis determinaron las especies de plata soportadas en el cuero bovino y porcino. La síntesis en función de la absorción del coloide de plata en el cuero en el rango del espectro de absorción de UV a 210 nm hasta 380 nm se observan máximos bien definidos asociados a cationes de  $\text{Ag}^+$ , cúmulos y nanopartículas que varían de tamaño entre 1 y 10 nm. Sin embargo, en la zona visible del espectro ( $>400$  nm) ocurre solapamiento de las bandas de absorción. Este comportamiento sugiere una distribución de tamaño de partículas de Ag de dimensiones manométricas, aunque no es posible determinar el tamaño de las nanopartículas utilizando la espectroscopia UV visible.

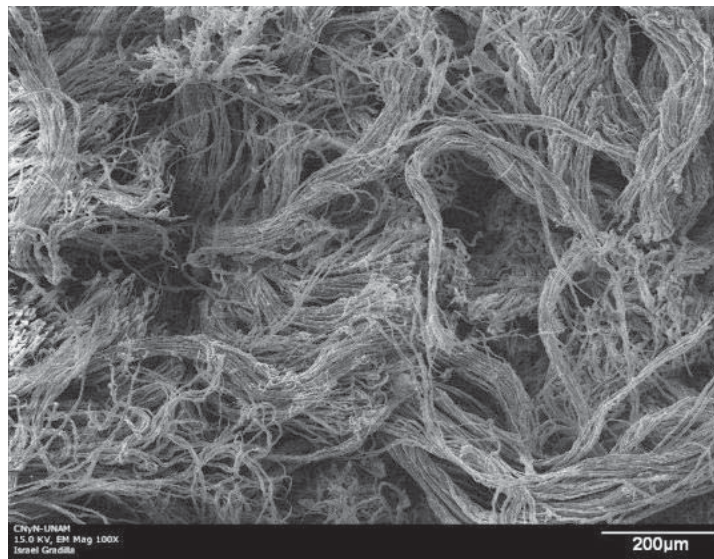
Este capítulo muestra la distribución de las nanopartículas de Ag en la superficie del cuero empleando microscopia electrónica de Barrido (SEM). Esta técnica permitió identificar la distribución de las nanopartículas de Ag en función a la absorción por las fibras del cuero y su impregnación en intersticios del cuero.

#### **4.1 ESTUDIO DE LA POROSIDAD Y ESTRUCTURA DEL CUERO DE GANADO BOVINO Y PORCINO POR SEM**

La finalidad de utilizar SEM es para conocer la estructura al igual que las dimensiones de la porosidad presente de los cueros, ya que estos datos son muy indispensables para una buena impregnación del coloide de plata que se pretende soportar. En las imágenes obtenidas por SEM de las figuras 3.1 cara posterior o epidermis y 3.2 cara anterior o dermis, se observan las dimensiones de los poros e hilos de fibras orgánicas así como la cantidad de estos presentes en nuestra muestra del cuero que fue tomada en sus dos perspectivas frontal y lateral del cuero.



**Figura 4.1** Micrografía de la parte lisa del cuero. La micrografía tomada con SEM muestra la cara posterior o epidermis de la muestra del cuero, donde se observan poros e imperfecciones estructurales propias de la piel al igual que una escala micrométrica para poder apreciar las dimensiones de los poros.



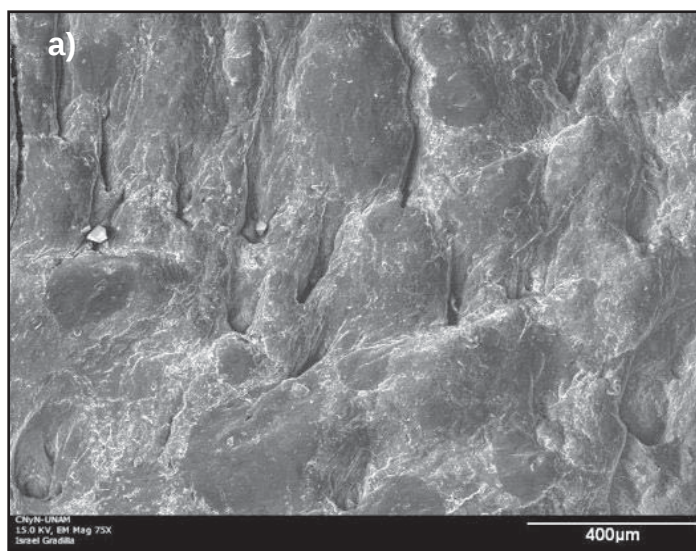
**Figura 4.2** Micrografía de la parte rugosa del cuero. La micrografía tomada con SEM muestra la cara anterior o dermis de la muestra del cuero, donde se observan numerosas hebras de material orgánico dando un aspecto de madeja de hilo, al igual que gran cantidad de espacios o intersticios, la medición marcada a 200 μm nos permite apreciar las dimensiones de los espacio huecos.

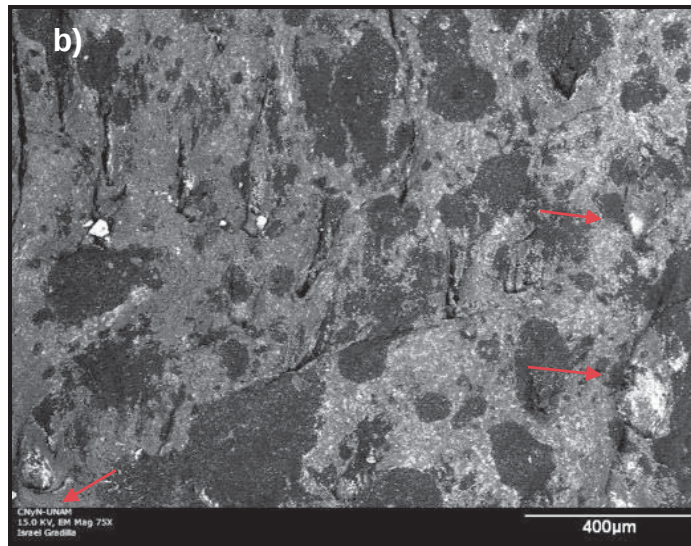
En las micrografías anteriores tanto en la dermis como en la epidermis, se observan una gran cantidad de poros con dimensiones favorables para la impregnación de la plata coloidal, así como imperfecciones en la estructura de la epidermis donde también puede ser impregnada la plata, mientras que en el caso de la dermis o flor del cuero se observa en mayor cantidad los intersticios donde puede ser acumulada la plata coloidal, dándonos un aspecto de una madeja de hilos de estambre.

#### **4.2 ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN E IMPREGNACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN EL CUERO POR SEM**

Con la microscopia electrónica de transmisión SEM se corroboró la distribución e impregnación de las fibras y poros del cuero con dichas nanopartículas metálicas, además de observar su distribución homogénea por toda la superficie y porosidad del cuero tratado.

En las siguientes imágenes obtenidas por SEM, de la figura 4.3 se observan las nanopartículas de plata dispersas en la superficie de la epidermis, así como puntos específicos de poros donde hay deposición masiva de las nanopartículas de plata.

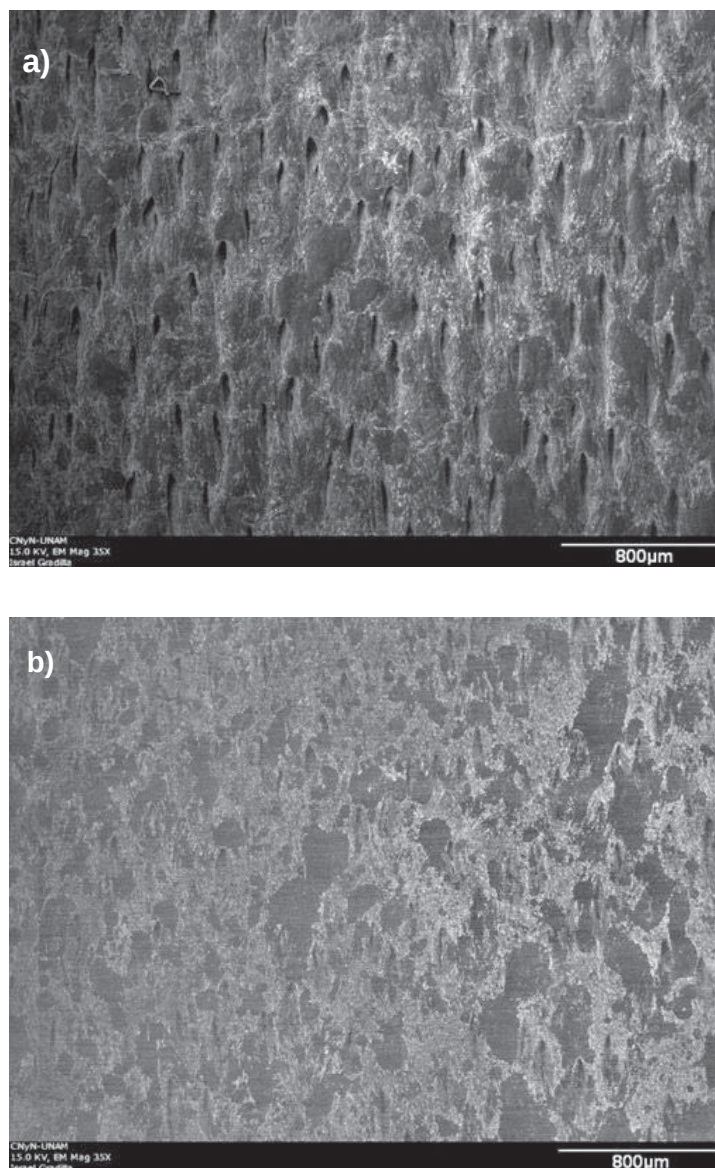




**Figura 4.3** Micrografías del cuero impregnado con nanopartículas de plata. La micrografía tomada con SEM y RDS muestra la cara posterior o epidermis del cuero impregnado con nanopartículas de plata, la cual se aprecia de un color blanco o plata. Con RDS la porosidad presentes en el cuero no son muy apreciables pero los puntos luminosos son de gran cantidad de nanopartículas de plata, a) muestra una uniformidad de distribución de nanopartículas sobre el cuero, b) la muestra tomada con RDS corrobora la distribución de nanopartículas y pequeñas zonas más brillantes marcadas con flechas que son acumulaciones masivas de nanopartículas debido a los poros del cuero.

En estas micrografías se observa una aplicación efectiva de nanopartículas de plata por baño y sumersión total del cuero, fue perfectamente homogenizado en las distintas estructuras del cuero siendo más abundante en los poros, pues se estima que su área oscila entre 100 y 300  $\mu\text{m}^2$ , espacio suficiente para depositar las nanopartículas con diámetro entre 1 y 10 nm.

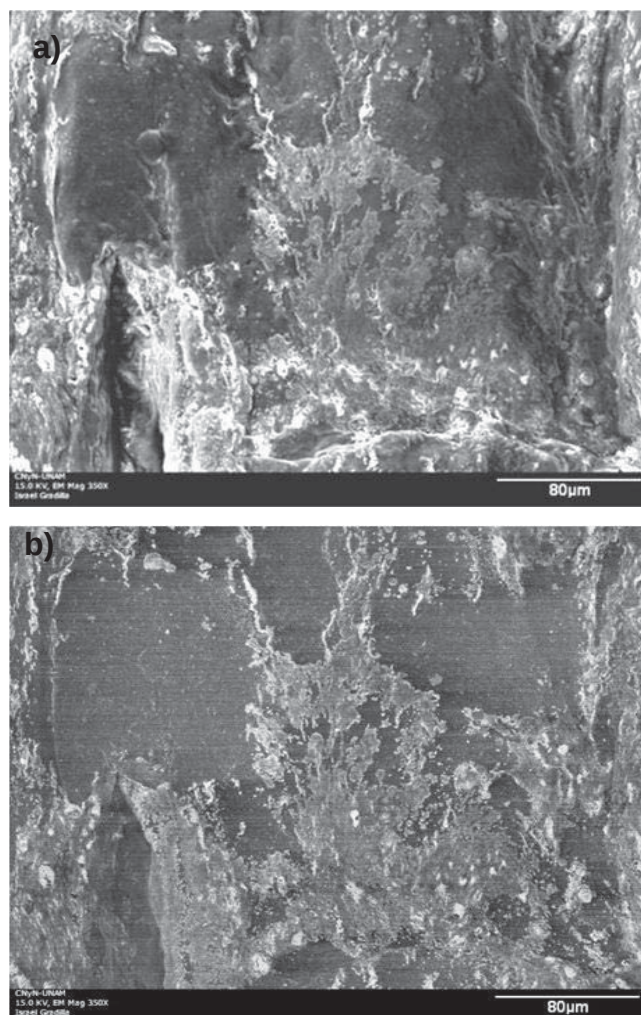
A continuación se muestran imágenes con SEM con electrones secundarios y electrones retro dispersados a 800  $\mu\text{m}$  para tener mejor visión de una mayor área de superficie del cuero.



**Figura 4.4** Micrografías de un cuero impregnado con nanopartículas de plata tomada a 800  $\mu\text{m}$ . Las micrografías a y b tomadas con SEM muestran la misma muestra solo que la micrografía a) fue tomada con electrones secundarios mientras que la micrografía B fue tomada con electrones retro dispersados, para indicar las zonas y datos más significativos.

Las imágenes (figuras 4.4) muestran el panorama de la gran cantidad de plata presente en los poros del cuero tratado, dando una apariencia de formar una capa metálica que recubre el cuero, sin olvidar que corresponden a nanopartículas, por ello se aprecian como una recubierta continua, aunque en la realidad las nanopartículas no están unidas sino

dispersas gracias a una membrana proteica que las cubre e impide que estas se unan y formen partículas de mayor dimensión.



**Figura 4.5** Micrografías tomadas con SEM que muestran la misma imagen del cuero tratado con nanopartículas de plata. La micrografía a) tomada con microscopio electrónico de transmisión con electrones secundarios y la micrografía b) tomada con microscopio electrónico de transmisión con electrones retrodispesados.

### 4.3 CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO

Las micrografías SEM presentadas en este capítulo muestran que el cuero de ganado bovino presentan una superficie adecuada para depositar cualquier partícula de la escala manométrica, ya sea impregnación anterior o posterior del cuero generando así una buena

impregnación debido a la gran cantidad de poros, fibras e imperfecciones superficiales del cuero .

El cuero analizado por SEM, mostró una distribución casi uniforme en su totalidad debido a que en los poros del cuero se observaron acumulaciones de plata mayores que en las imperfecciones estructurales de la epidermis.

Las micrografías tomadas a 200  $\mu\text{m}$  muestran porosidades cercanas a estas dimensiones en la epidermis, mientras que en la dermis o flor resulta difícil medir los intersticios ahí presentes pues se ven mayores y de estructura semejante a madeja de estambre y estos representan espacios huecos difíciles de medir.

Las micrografías tomadas a 400  $\mu\text{m}$  y 800  $\mu\text{m}$  se observa mejor la distribución y dimensión de los poros del cuero así como los bordes producidos por estos, también un amplio panorama de la estructura de la piel para observar a escala mayor la perfecta repartición de las nanopartículas por la superficie de la muestra, solo que a esta escala las nanopartículas no son muy apreciables debido a su muy pequeño tamaño.

Las micrografías tomadas a 80  $\mu\text{m}$  revelan una imagen perfecta de la distribución de las nanopartículas de plata en los bordes de los poros así como en su interior, la superficie del cuero donde no hay poros también se observa una perfecta impregnación dando una apariencia de una capa continua de plata, lo cual es solamente una apariencia ya que las nanopartículas están dispersas y separadas solo que su tamaño es tan pequeño que la presentación que se utilizó habla de partículas oscilantes entre 1 y 10 nm de diámetro, si se hiciera un acercamiento a este rango no se podría apreciar nuestra matriz biológica ni su porosidad por ello las micrografías han sido tomadas a estas dimensiones ya que el nuestro objetivo es la impregnación de la plata en el cuero.

# CAPÍTULO V

**VALORACIÓN PRELIMINAR DEL CUERO  
IMPREGNADO CON IONES, CÚMULOS Y  
NANOPARTÍCULAS DE PLATA SOBRE  
*PSEUDOMONAS AERUGINOSA* Y *CÁNDIDA*  
*ALBICANS***

La nanotecnología ofrece la posibilidad de diseñar nuevos materiales mediante el control de su tamaño, lo que ha conducido la investigación hacia una gran multitud de usos potenciales de los nanomateriales, entre los nanomateriales más prometedores con propiedades antibacterianas son las nanopartículas metálicas, que presentan una mayor actividad química debido a su gran superficie con respecto al volumen y estructura de la superficie cristalográfica. La interacción de las nanopartículas con biomoléculas y microorganismos es un campo en expansión de la investigación. Se ha demostrado que nanopartícula de plata en especial las de un diámetro conocido de 1 a 10 nanómetros son eficaces para producir efectos nocivos en microorganismos tales como bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas así como una gran variedad de hongo, levaduras e incluso virus (VIH). Basados en esta información se pensó en darle una aplicación a estos nanomateriales metálicos como son las nanopartículas de plata, la producción de un calzado con nanopartículas de plata no ha sido registrada en literatura hasta hoy en día, por lo que los estudios aquí presentados dan paso a una patente nacional e internacional de un calzado que reduce la cantidad de amputaciones de pie en pacientes inmunosuprimidos.

Nuestros resultados aquí presentados de la inhibición fúngica y bacteriana de un cuero de ganado bobino y porcino tratado con nanopartículas de plata para la producción de un calzado, indican que las propiedades microbidas de las nanopartículas no interactúan con nuestra matriz orgánica que es el cuero ya que la actividad biocida continua teniendo su efecto perfectamente.

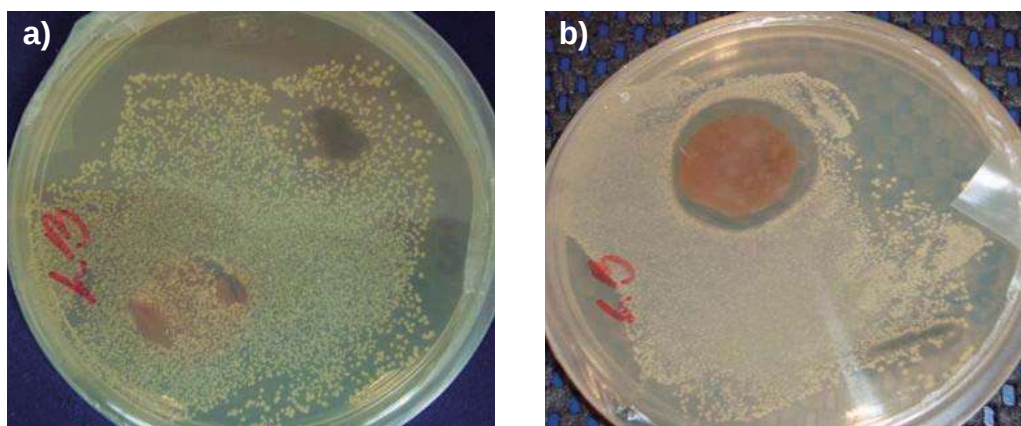
## **5.1 ACTIVIDAD MICROBICIDA DE LAS MUESTRAS DE CUERO TRATADAS PREVIAMENTE CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA FRENTE A *PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

El estudio antibacteriano y antifúngico del cuero tratado con nanopartículas de plata, se realizó específicamente en *Pseudomonas aeruginosa* conocida como patógeno oportunistas presente en pacientes inmunosuprimidos (diabético, VIH/SIDA).

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria Gram-negativa, aeróbica, con motilidad unipolar [89]. Patógeno oportunista en humanos y en plantas[90]. Este patógeno infecta el tracto pulmonar, el urinario, tejidos, heridas y también causa otras infecciones de sangre. *Pseudomonas* puede causar neumonías a grupos [91], necesitando a veces ayuda mecánica para superar dichas neumonías, siendo uno de los más comunes y aislados en muchos estudios [92].

Para el estudio preliminar de las propiedades bactericidas frente a *Pseudomonas aeruginosa* se analizaron las muestras de cuero tratadas con nanopartículas de plata y lavadas como es mencionado en el Capítulo III.

El análisis de propiedades biocidas se realizó en medio de cultivo de agar simple, la siembra bacteriana fue líquida y masiva, en la cual se colocaron los cortes de los diversos tipos de cuero (diámetro 1cm de radio), posteriormente se incubaron y fueron observados a las 24 horas como se muestra en la Figura 5.1



**Figura 5.1** Cuero suave y duro impregnado con nano-Ag sobre un cultivo de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*. a) Muestra de un cuero duro impregnado con nanopartículas de plata con una eliminación bacteriana muy limitada, b) Muestra de un cuero suave impregnado con nanopartículas de plata presentando un halo de inhibición bacterial muy notorio.

Los resultados muestran que el medio de cultivo es favorable para el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* y contrasta el efecto inhibitorio del cuero con la nanoplata en los puntos de contacto del cuero (Figura 5.1 (a)), lo que indica que las especies de plata presente en el cuero son efectivas para inhibir a *Pseudomona aeruginosa*, además que las *Pseudomonas* no interactúan con el cuero, aunado a esto agregamos que la concentración de

plata utilizada en la deposición de estas al cuero es suficiente para lograr la eliminación bacteriana.

La muestra presente en la Figura 5.1 (b), indican que en el cuero blando o suave no solamente se tiene una perfecta eliminación bacteriana sino que, debido al curtido y edad del animal tiene una mejor absorción en cuanto a la cantidad de nanopartículas de plata, así como una mejor liberación de estas, ya que la eliminación bacteriana se observa en los puntos de contacto del cuero y también halo de inhibición bacteriana, se sugiere que el ambiente húmedo que existe en el medio favorece el contacto de partículas de nanoplate y las bacterias por los efectos observados.

## **5.2 ACTIVIDAD MICROBICIDA DE LAS MUESTRAS DE CUERO TRATADAS PREVIAMENTE CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA FRENTE A *CÁNDIDA ALBICANS***

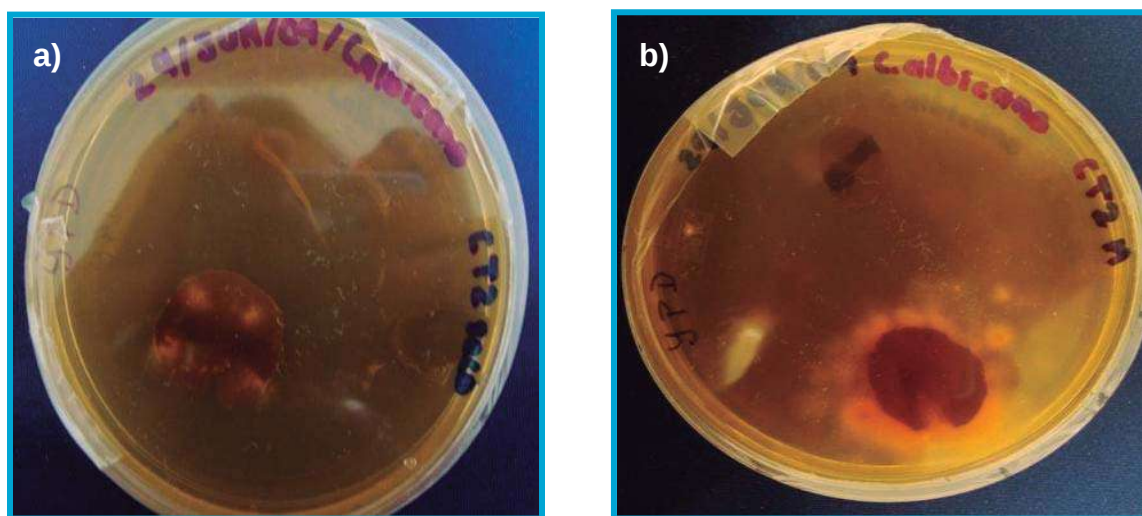
*Cándida albicans* es un hongo diploide asexual (forma de levadura) [64-65]. Normalmente se encuentra en la cavidad oral, en tracto gastrointestinal y en vagina. Está envuelta en un rol relevante en la digestión de los azúcares mediante un proceso de fermentación.

*Cándida albicans* puede adquirir patogeneidad provocando la candidiasis como una afección vaginal, de la cavidad oral (muguet), del intestino o de la piel.

En un físico debilitado, inmunodeprimido o convaleciente de un larga cura antibiótica, la *Cándida* se multiplica en modo anómalo y atraviesa el intestino, para entrar al torrente sanguíneo, donde libera sus propias toxinas provocando la candidemia. Este fenómeno da lugar a síntomas algunos abdominales, mala digestión, gases e hinchazón, molestias intestinales (estreñimiento o diarrea), intolerancia alimentaria, irritabilidad, insomnio, pérdida de la memoria, dolores de cabeza y depresión [66].

Para evaluar las propiedades fungicidas frente a *Cándida albicans* se seleccionaron las muestras de cuero tratadas con nanopartículas de plata y lavadas como es mencionado en el Capítulo III. El estudio se realizó medio de cultivo con sabouraud, la siembra antifúngica fue líquida y masiva, en la cual se colocaron los cortes de cuero (diámetro 1cm

de radio), posteriormente se incubaron y fueron observados a las 24 horas como se muestra en la Figura 5.2



**Figura 5.2** Cuero suave y cuero duro impregnado con nano-Ag sobre un cultivo de *Cándida albicans*. a) Muestra del cuero duro tratado con nanopartículas de plata, sin observar efecto fungicida, b) Muestra de un cuero suave tratado con nanopartículas de plata sin resultados de actividad antifúngica.

Los resultados muestran un análisis diferente y opuesto al observado con *Pseudomonas*, ya que en ninguna de las muestras hubo inhibición fúngica, esto se debe a que la concentración para eliminar hongos, debe ser una concentración mayor ya que los hongos son organismos más complejos que las bacterias, además de presentar una pared celular mas estructurada.

Las muestras de la Figura 5.2, comprueban datos mencionas antes en la literatura, que para inhibir hongos es necesario una aplicación de nanopartículas de plata a concentraciones más alta que las usadas contra bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas.

### 5.3 CONCLUSIÓN DEL CAPÍTULO

Las bacterias tienen una membrana celular a partir de la cual es posible clasificarlas en Gram-negativas y gram positivas. Las diferencias estructurales se encuentran en la organización de un componente clave de la membrana, peptidoglicano. Las bacterias gram negativas sólo tienen una capa delgada de peptidoglicano ( $\sim 3.2$  nm) entre la membrana citoplasmática y la membrana exterior [67], mientras que las bacterias Gram-positivas carecen de membrana externa, pero tienen una capa de peptidoglucano de unos 30 nm de espesor [68].

Se sabe que la plata ha sido durante mucho tiempo un metal que presenta una toxicidad fuerte para una amplia gama de microorganismos [69], por esta razón los compuestos a base de plata se han utilizado ampliamente en muchas aplicaciones bactericida [70-71]. Compuestos inorgánicos con una tasa de plata de liberación lenta que actualmente se utilizan como conservantes en una variedad de productos, otra aplicación actual incluye compuesto por micro esferas de gel de sílice, que contiene un complejo de tiosulfato de plata, que se mezclan en plásticos para protección antibacteriana duradera [71]. Los compuestos de plata también se han utilizado en el campo de la medicina para el tratamiento de quemaduras y una variedad de infecciones [72].

El efecto bactericida de los iones de plata en los microorganismos es muy conocido, sin embargo, el mecanismo bactericida es sólo parcialmente comprendido. Se ha propuesto que la plata iónica interacciona fuertemente con los grupos tiol de las enzimas [73-74]. La evidencia experimental sugiere que el ADN pierde su capacidad de replicación una vez que las bacterias han sido tratadas con iones de plata [72]. Otros estudios indican cambios estructurales en la membrana celular, así como la formación de pequeños gránulos electrón-densos formados por plata y azufre [72-75]. Los iones de plata han demostrado ser útil y eficaz en aplicaciones de bactericida, pero debido a las propiedades únicas de nanopartículas nanotecnología presenta una alternativa razonable para el desarrollo de nuevos bactericidas.

Partículas metálicas en las propiedades de tamaño nanométrico presentan gama físicas que son diferentes tanto de la de iones y el material a granel. Esto hace que exhiben

propiedades notables tales como aumento de la actividad catalítica debido a la morfología de las facetas de gran actividad [76-77].

El estudio de los nanomateriales bactericida es especialmente oportuno teniendo en cuenta el reciente aumento de nuevas cepas de bacterias resistentes a los antibióticos más potentes. Esto ha promovido la investigación en la actividad conocida de iones de plata y sus compuestos a base de plata, incluyendo nanopartículas de plata. Algunos resultados indican que las propiedades bactericidas de las nanopartículas depende de una interacción directa con las bacterias preferentemente tener un diámetro de  $\sim 10.1$  nm [51].

Se ha demostrado que, en el caso de los nanocristales de metal noble, de las propiedades electromagnéticas, ópticas y catalíticas son altamente influenciados por la forma y el tamaño [78-79]. Esto ha impulsado el desarrollo de las rutas de síntesis que permitan un mejor control de la morfología y el tamaño [80-81]. Nanomateriales de metales nobles se han sintetizado utilizando una variedad de métodos, incluidos los de difícil plantilla [82], biorreducción [83] y la fase de solución de síntesis [80-84-81].

Entre los nanomateriales de metales nobles, las nanopartículas de plata han recibido considerable atención debido a sus propiedades físico-químicas atractivo. La resonancia de plasmón superficial y gran eficacia sección eficaz de dispersión de las nanopartículas de plata individual los hacen candidatos ideales para el etiquetado molecular [85], donde fenómenos como la superficie de mejorar la dispersión Raman (SERS) puede ser explotada. Además, la toxicidad de las nanopartículas fuertes que exhibe la plata en varias formas químicas a una amplia gama de microorganismos es muy bien sabido [86-87], y la plata han sido recientemente demostrado que es un material antimicrobiano prometedores [88].

En base a los resultados del trabajo desarrollado se puede concluir que las especies de plata soportadas en el cuero si fueron nanopartículas de rango de medición  $< 10$ nm (1 a 10nm) demostrado por el análisis SEM, espectrometría UV-vis y la concentración de plata depositada en el cuero bovino y puede utilizarse como una matriz depositar nanopartículas de plata con el propósito de utilizar forro de cuero para calzado especializado para usuarios diabéticos.

Las concentraciones de plata depositadas en una matriz de cuero resultó conveniente en la evaluación de inhibición bacteriana *Pseudomonas aeruginosa* pero no de *Candida albicans* comúnmente encontrado en pacientes inmunosuprimidos.

Existen diferencias de la interacción de las nanopartículas de plata para bacterias y hongos, una parte se explica en la diferencia estructural, composición de la pared celular y membrana plasmática, así como fases de la reproducción entre estos microorganismos siendo más sensibles a la plata las bacterias en comparación a los hongos.

## APÉNDICE I

### ESPECTROSCOPIA UV-VISIBLE

Por medio de espectroscopia UV-Vis se estudió el estado electrónico de la plata (cationes de Ag pico  $\sim 200$  nm, nanopartículas  $\sim 400$  nm, cúmulos con diámetro de menos de 1 nm presentan máximo de pico entre 225- 275nm). Para la caracterización óptica de las muestras se utilizó el espectrómetro de UV-vis, *Cary 300 SCAN de Varian* [94]. La muestra líquida se colocó dentro de una cubeta 3.5 mL de volumen. N. de parte 6610001100 (Figura A-1).

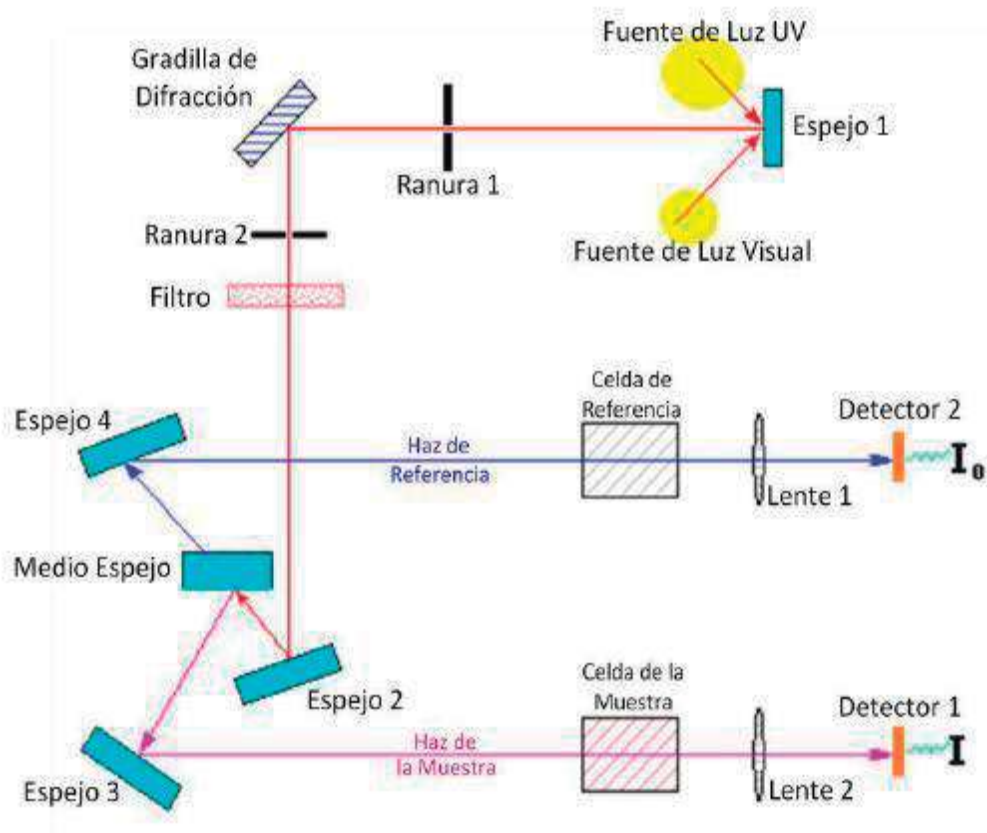


**Figura A-1. Equipo UV-visible Cary 300 Scan**

Se determinó el espectro de absorbancia de cada una de las muestras para corroborar la producción de nanopartículas de Ag, y estudiar la cinética de almacenaje de las muestras preparadas.

Para medir concentración de nanopartículas de plata en solución se necesita obtener la curva de calibración (función de altura o área superficial del perfil del pico de concentración de nanopartículas en solución coloidal). En caso del presente trabajo no es posible conseguir soluciones de calibración comerciales porque cada curva de calibración cambia con respecto al tamaño, forma, etc. de las nanopartículas. En nuestro trabajo el método de espectroscopia de UV-Visible se aplicó como un método semi-cuantitativo de caracterización de concentración y propiedades (tamaño, morfología, interacción, etc.) de nanopartículas de plata.

Las medidas de absorbancia (o transmitancia) se llevan a cabo por medio del espectrofotómetro UV-Vis y son complementarias a las de luminiscencia. En este tipo de medidas se hace pasar un haz de luz a través de una muestra y posteriormente se analiza que parte de ella ha sido absorbida. Normalmente los espectrofotómetros funcionan con un sistema de doble haz: uno de ellos incide sobre la muestra mientras que el segundo llega a un detector sin atravesar ningún cuerpo (Figura A-2). Posteriormente se comparan las intensidades de ambos haces con lo que se puede calcular la cantidad de luz absorbida o reflejada por la muestra. Con este sistema se evitan posibles errores debidos a la inestabilidad de la lámpara o a su respuesta espectral. Lógicamente, las medidas de absorbancia no pueden realizarse sobre muestras opacas.



**Figura A-2. Diagrama de un espectrofotómetro UV-Visible típico.**

La absorción ( $A$ ) de un material se define como el cociente entre la intensidad de la luz que incide sobre el mismo  $I_0$  y la luz que absorbe  $I_{abs}$ . La absorción está relacionada con el coeficiente de absorción ( $\alpha$ ) según la ecuación:

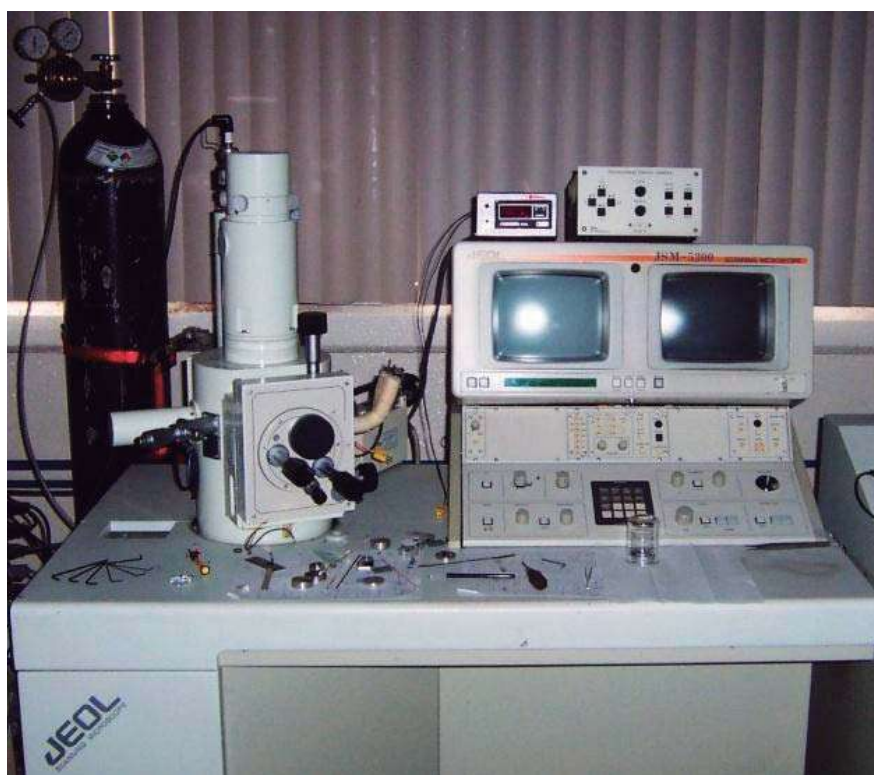
$$A = \frac{I_{abs}}{I_0} = 1 - e^{-\alpha \cdot d}$$

Donde  $d$  es el espesor de la muestra. De la anterior ecuación se deduce que el perfil del espectro de absorción de una muestra dependerá de su espesor. Por ello, para caracterizar un material se utiliza habitualmente el coeficiente de absorción ( $\alpha$ ), cuyo perfil no depende del espesor. De esta forma se pueden comparar curvas de absorción correspondientes a muestras con distinto espesor [95].

## APÉNDICE II

### MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO (SEM)

El microscopio electrónico de barrido fue utilizado para realizar la investigación con respecto a la morfología y el análisis elemental de la muestra (cuero de ganado bovino y porcino). Estos estudios fueron realizados con el equipo JEOL JSM-5300 scanning electron microscope, del cual se obtuvo la morfología de la muestra



**Figura A-3. SEM JSM-5300**

La preparación de muestras para SEM se llevo a cabo de la siguiente manera:

1. Se tomó un portamuestras de vidrio, se limpió con agua desionizada y con acetona, se dejó secar.
2. Sobre el portamuestras se adhirió un trozo pequeño  $\sim 1 \text{ cm}^2$  de cinta de grafito.

3. Se colocó una gota de la muestra de plata coloidal sobre la cinta de grafito y se dejó secar a temperatura ambiente durante 24 horas.

4. El portamuestras de vidrio se colocó sobre el portamuestras del SEM.

El SEM está diseñado para el estudio de las superficies de objetos sólidos. Por medio de un barrido con un haz de electrones el cual ha sido generado y enfocado por la operación del microscopio<sup>19</sup>. La resolución es del orden de 1 nm, en términos de amplificación se puede decir que amplifica hasta 200,000 veces. Permite una mayor profundidad de campo que el microscopio óptico. Por esta razón el SEM puede producir imágenes que son una buena representación de la topografía tridimensional de la muestra. Cuando un haz de electrones incide en la muestra, se producen muchas interacciones entre los electrones del mismo haz y los electrones de la muestra (rayos x, electrones Auger etc. Figura 19); cuando los electrones del haz incidente pierden energía (dispersión inelástica) provoca que otros electrones salgan despedidos de los átomos de la muestra y se producen electrones. Estos se mueven tan lentamente y se encuentran cargados negativamente, pueden ser atraídos al detector polarizado con una diferencia de potencial positivo. De este modo, se pueden coleccionar electrones de un área amplia y alrededor de esquinas y bordes. Esta capacidad de los electrones secundarios es lo que permite la obtención de imágenes con aspectos tridimensionales [96] de la muestra. El SEM que se utilizó en este trabajo se encuentra equipado con un detector de rayos X, se puede aprovechar que los rayos X tienen la “firma” del elemento que los produjo y así realizar un análisis químico en el área de resolución del instrumento [97].

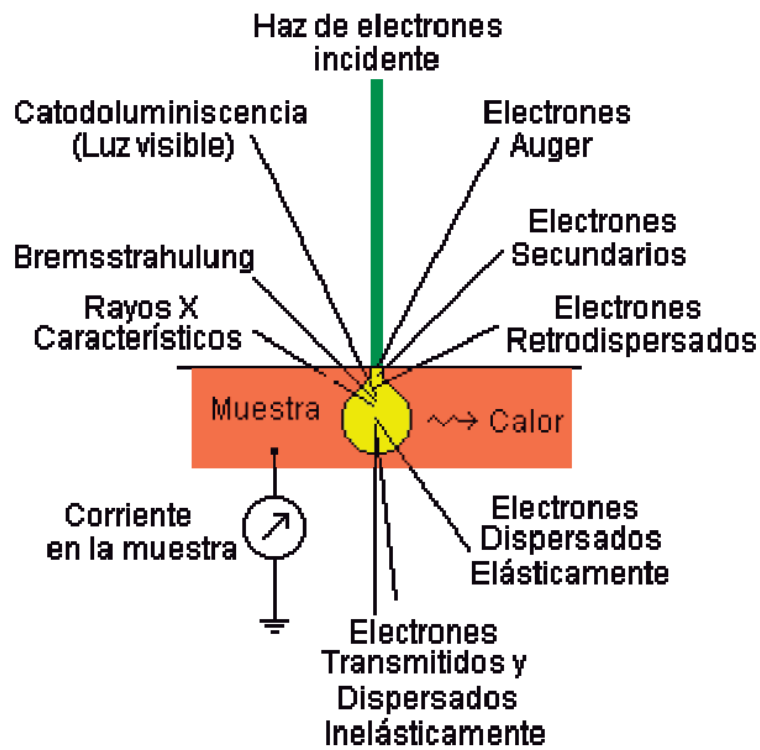


Figura A-4 Esquema de tipo de electrones emitidos

## **APÉNDICE III**

### **ESPECTRÓMETRO DE EMISIÓN CON FUENTE DE PLASMA DE INDUCCIÓN ICP**

Por medio de espectroscopia ICP se obtuvieron los datos de la concentración de plata presente en el cuero posterior a los lavados, los parámetros capaces de medir del espectrómetro ICP son de partes por billón (ppb) ya que la muestra a medir es de 1 cm<sup>2</sup> disuelta en una mezcla de ácidos concentrados de 8 ml y tomando en cuenta que la absorción de ICP es menor a 1 ml por muestra.

El espectrómetro de Emisión con Fuente de de Plasma de Inducción (ICP) de Varian tiene las ventajas propias del la técnica de ICP como linealidad, alta sensibilidad y selectividad, rapidez, etc.

El generador de radiofrecuencia de alta eficacia es capaz de suministrar una frecuencia de 40MHz y acoplamiento en serie directo, produce un plasma robusto que permite analizar cualquier tipo de muestras (desde muestras con alto contenido en sales o procedentes de un método de preparación por fusión, a muestras en disolventes orgánicos altamente volátiles). El software del quipo permite automatizar completamente los métodos de medida, pudiendo llevar a cabo la optimización del método de forma automática, permitiendo que dicha operación de forma manual o automática.

#### **Aplicaciones:**

Mediante la técnica de ICP es posible medir los elementos que se describen en la siguiente tabla tanto en matrices orgánicas como inorgánicas una vez puesta la muestra en disolución, con una gran sensibilidad.

| ICP-AES Detection Limits (µg/L) |                   |                  |                 |                  |                |                  |                  |                  |                 |                  |                |                  |                 |                  |                  |                  |  |
|---------------------------------|-------------------|------------------|-----------------|------------------|----------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|------------------|----------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|--|
| <b>Li</b><br>0.3                | <b>Be</b><br>0.1  |                  |                 |                  |                |                  |                  |                  |                 |                  |                | <b>B</b><br>1    | <b>C</b><br>40  | <b>N</b><br>na   |                  |                  |  |
| <b>Na</b><br>3                  | <b>Mg</b><br>0.1  |                  |                 |                  |                |                  |                  |                  |                 |                  |                | <b>Al</b><br>3   | <b>Si</b><br>4  | <b>P</b><br>30   | <b>S</b><br>30   | <b>Cl</b><br>na  |  |
| <b>K</b><br>20                  | <b>Ca</b><br>0.02 | <b>Sc</b><br>0.3 | <b>V</b><br>0.5 | <b>Ti</b><br>0.5 | <b>Cr</b><br>2 | <b>Mn</b><br>0.4 | <b>Fe</b><br>2   | <b>Co</b><br>1   | <b>Ni</b><br>5  | <b>Cu</b><br>0.4 | <b>Zn</b><br>1 | <b>Ga</b><br>4   | <b>Ge</b><br>20 | <b>As</b><br>20  | <b>Se</b><br>50  | <b>Br</b><br>na  |  |
| <b>Rb</b><br>30                 | <b>Sr</b><br>0.06 | <b>Y</b><br>0.3  | <b>Nb</b><br>5  | <b>Zr</b><br>0.8 | <b>Mo</b><br>3 |                  | <b>Ru</b><br>6   | <b>Th</b><br>5   | <b>Pd</b><br>3  | <b>Ag</b><br>1   | <b>Cd</b><br>1 | <b>In</b><br>9   | <b>Sn</b><br>30 | <b>Sb</b><br>10  | <b>Te</b><br>10  | <b>I</b><br>na   |  |
| <b>Cs</b><br>10                 | <b>Ba</b><br>0.1  | <b>La</b><br>1   | <b>Hf</b><br>4  | <b>Ta</b><br>15  | <b>W</b><br>8  | <b>Re</b><br>5   | <b>Os</b><br>0.4 | <b>Ir</b><br>5   | <b>Pt</b><br>10 | <b>Au</b><br>4   | <b>Hg</b><br>1 | <b>Tl</b><br>30  | <b>Pb</b><br>10 | <b>Bi</b><br>20  |                  |                  |  |
|                                 |                   |                  |                 |                  |                |                  |                  |                  |                 |                  |                |                  |                 |                  |                  |                  |  |
|                                 |                   |                  | <b>Ce</b><br>5  | <b>Pr</b><br>1   | <b>Nd</b><br>1 |                  | <b>Sm</b><br>2   | <b>Eu</b><br>0.1 | <b>Gd</b><br>1  | <b>Tb</b><br>2   | <b>Dy</b><br>2 | <b>Ho</b><br>0.4 | <b>Er</b><br>1  | <b>Tm</b><br>0.6 | <b>Yb</b><br>0.3 | <b>Lu</b><br>0.2 |  |
|                                 |                   |                  | <b>Th</b><br>70 |                  | <b>U</b><br>16 |                  |                  |                  |                 |                  |                |                  |                 |                  |                  |                  |  |

Tabla IV Elementos capaces de ser detectados por ICP

## DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA Y FUNDAMENTOS

Si se considera la naturaleza del átomo, éste se puede definir como un núcleo donde se concentra la práctica totalidad de la masa del átomo con sus protones, neutrones y una corteza donde se encuentran los electrones en estados de o escalones de energía típicas y características para cada átomo (es decir la altura de cada escalón de energía es típico de cada átomo). Esto es lo que se conoce como estado fundamental.

Sin embargo, cuando a un átomo se le suministra energía un electrón puede pasar de su propio estado de energía a otro estado de energía superior inestable, es decir pasa de su estado fundamental a un estado excitado. Como ya dijimos dicho estado es inestable y el electrón tiende a volver a su estado de energía típico emitiendo energía en forma de

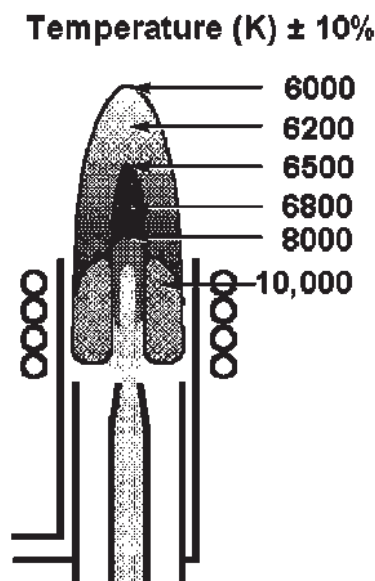
radiación electromagnética característica tanto del átomo como del estado de energía al que se haya trasladado el electrón.



**Figura A-5** Excitación electrónica de los átomos para su identificación por ICP

La espectrometría de emisión atómica se basa en la medida de la radiación electromagnética emitida por los átomos cuando éstos son excitados.

Existen muchas fuentes de excitación: chispa, arco eléctrico, plasma de inducción, etc. Se define como plasma el estado de un gas ionizado. Dicho gas tiene una temperatura tan elevada (supera los 10.000 K) que es capaz no sólo de secar y atomizar a la muestra sino además de excitarla.

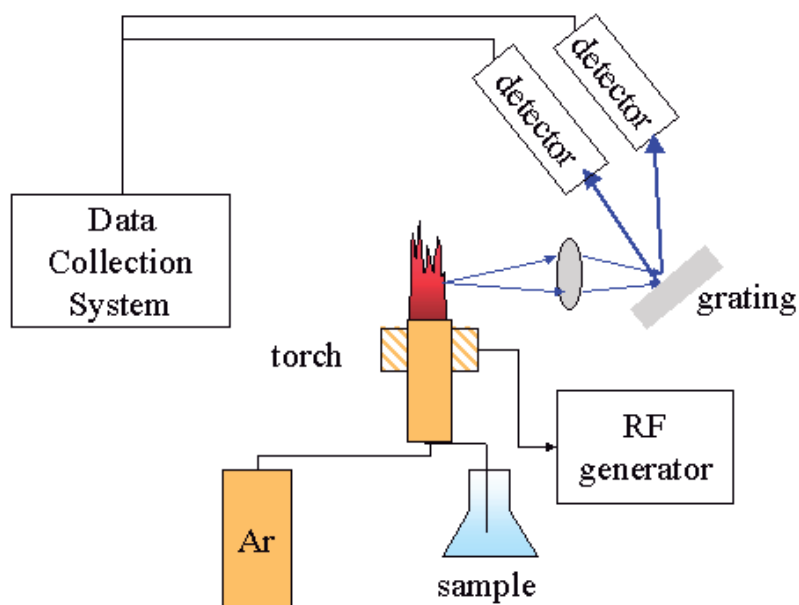


**Figura A-6** Imagen del plasma mostrando sus temperaturas emitidas

El plasma de acoplamiento inductivo se produce cuando en una corriente de gas se hace saltar una chispa que lo ioniza y después se mantiene acoplando un campo electromagnético.

La muestra debe introducir en el plasma en forma de disolución líquida, si bien se han realizado estudios y puestas a punto de introducir sólidos en suspensión (slurries).

## ICP Spectrometer



**Figura A-7 Instrumentación de un Espectrómetro de Emisión con fuente de Plasma de Inducción ICP**

Fuente de excitación: Plasma. Dentro de esta parte se puede hablar de los sistemas de introducción de muestra o nebulizadores, los cuales sirven para crear el espray que de minúsculas gotas que serán arrastradas por el gas portados hasta el plasma. Pueden ser de diferentes tipos como se recoge en la figura.

Otra parte importante es la antorcha donde se crea y mantiene el plasma así como el generador de radiofrecuencia que ayudará a crea el campo electromagnético para mantener el plasma.

Sistema de discriminación de longitudes de onda. El plasma excita a todos los átomos presentes en la muestra y por tanto emiten todos los elementos a la vez de modo que es necesario separar las diferentes longitudes de onda de los diferentes elementos para poder determinarlos de forma selectiva.

Los sistemas más modernos de discriminación de longitudes de onda combinan las características de dos sistemas de dispersión diferentes colocándolos de forma

perpendicular uno de otro (red echelle). Consiste en una red de difracción que separa la radiación policromática en diferentes longitudes de onda y produce múltiples órdenes de solapamiento espectral y una segunda red de difracción o un prisma que separa o dispersa de forma cruzada los órdenes de solapamiento en un dibujo bidimensional llamado echelograma.

Sistema de detección: Detectores de estado sólido. Se basan en tener un bloque de silicio cristalino de alta pureza. Sobre dicho substrato se silicio crece una película aislada de sílice. Cada átomo de silicio del substrato está enlazado a cada átomo de silicio de forma tridimensional formando una red cristalina. El enlace Si-Si se puede romper con una energía suficientemente fuerte como es la que pueden proporcionar los fotones del espectro energético del visible u del ultravioleta. Cuando el enlace se rompe, un electrón se libera dentro de esta estructura reticular y se forma un hueco en la misma. Esto se llama par electrón-hueco.

Si se aplica un voltaje a través del bloque de silicio los electrones liberados se mueven en una dirección opuesta al campo eléctrico aplicado y los huecos se mueven en la misma dirección del campo eléctrico, creando una corriente eléctrica que es proporcional a los pares electrón hueco creados y por tanto a los fotones detectados.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Jun Sung Kim, Eunye Kuk, Kyeong Nam Yu, Jong-Ho Kim, Sung Jin Park, Hu Jang Lee. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *ELSEVIER*, 95-101.
- [2] Elda Maria del Rocío Coutiño Rodríguez, Rocío Anaís Pérez Gutiérrez. (2007). Los compuestos de plata y la salud. *Altepepaktli*, 29.
- [3] Furno F, Morley KS, Wong B, Sharp BL, Arnold PL, Howdle SM, et al. Silver nanoparticles and polymeric medical devices: a new approach to prevention of infection. *J Antimicrob Chemother* 2004;54:1019-24.
- [4] Crabtree JH, Burchette RJ, Siddiqi RA, Huen IT, Handott LL, Fishman A. The efficacy of silver ion implanted catheters in reducing peritoneal dialysis-related infections. *Perit Dial Int* 2003;23(4):368-74.
- [5] Hamouda T, Myc A, Donovan B, Shih A, Reuter JD, Baker Jr JR. A novel surfactant nanoemulsion with a unique non-irritant topical antimicrobial activity against bacteria, enveloped viruses and fungi. *Microbiol Res* 2000;156:1-7.
- [6] David H. Lloyd y Anita P. Patel. (2008). Estructura y funciones de la piel. *dermatologia.indb*, 1-13.
- [7] Ron Pinhasi, Boris Gasparian, Gregory Areshian, Diana Zardaryan, Alexia Smith, Guy Bar-Oz, Thomas Higham. (2010). First Direct Evidence of Chalcolithic Footwear from the Near Eastern Highlands. *PLOS ONE*, 1-5.
- [8] McCann, M. (07 de Febrero de 2011). *cuero, pieles y calzado*. Recuperado el 07 de Febrero de 2011, de cuero, pieles y calzado: <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/EnciclopediaOIT/tomo3/88.pdf>
- [9] Ing. Agr. Eliana VILLAGRAN AER Chamical, Vet. Sergio G. CUELLO AER Portezuelo, Ing. Agr. Graciela VERA AER Chamical. (07 de Febrero de 2011). *curtido de cueros - INTA*. Recuperado el 07 de Febrero de 2011, de curtido de cueros - INTA: [http://www.inta.gov.ar/larioja/info/documentos/descarga/Curtido\\_cueros.pdf](http://www.inta.gov.ar/larioja/info/documentos/descarga/Curtido_cueros.pdf)
- [10] S Link, Z. L. Wang y M. A. El-Sayed. *J. Phys. Chem. B* 1999, 103, 3529-3533
- [11] Santos-Hernández David, González-García B. María et al, *Electroanalysis* 2002, 14, No. 18
- [12] Maria Starowicz, Barbara Stypuła, Jacek Banas. (2006). Electrochemical synthesis of silver nanoparticles. *ELSEVIER*, 227-230.

- [13] A. Thaler, B.G. Cox, H. Schneider, *Inorganica Chimica Acta* 351 (2003) 123.
- [14] V.N. Titova, V.A. Kazakov, N.V. Petrova, S. Bialozor, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 381 (1995) 227.
- [15] Debao Wang, Caixia Song, Zhengshui Hu, Xiaodong Zhou. (2005). Synthesis of silver nanoparticles with flake-like shapes. *ELSEVIER*, 1760-1763.
- [16] I. Sondi, D.V. Goia, E. Matijevic, *J. Colloid Interface Sci.* 260 (2003) 75.
- [17] Le Van Vu, Nguyen Ngoc Long, Sai Cong Doanh and Bui Quoc Trung. (2009). Preparation of silver nanoparticles by pulse sonoelectrochemical method and studying their characteristics. *IOPSCIENCE*, 1-5.
- [18] Yu ChuanLiu, KuangHsuan Yang and Shung Jim Yang 2006 *Analyt. Chimica Acta* **572** - 290
- [19] Suzuki M, Niidome Y, Kuwahara Y, Terasaki N, Inoue K and Yamada S 2004 *Nano Lett. J. Phys. Chem. B* **108** - 11660
- [20] Tapan K. Sau and Catherine J. Murphy 2004 *Langmuir* **20** -6414
- [21] Murphy C J, Sau T K, Gole A M, Orendorff C J, Jinxin Gao, Linfeng Gou, Hunyadi S E and Tan Li 2005 *J. Phys. Chem. B* **109** - 13857
- [22] Reisse J, Francois H, Vandercammen J, Fabre O, Mesmaeker K D, Maerschalk C and Delplanck J L 1994 *Electrochim. Acta* **39** -37
- [22] Navaladian S, Viswanathan B, Varadarajan T K and Viswanath R P 2008 *Nanotech.* **19** - 045603
- [24] Biswas A, Marton Z, Kanzow J, Kruse J, Zaporozhchenko V, Faupel F and Strunskus T 2003 *NanoLett.* **3** -69
- [25] Yehoshua Socol, Oleg Abramson, Aharon Gedanken, Yitzhak Meshorer, Larisa Berenstein and Arie Zaban 2002 *Langmuir* **18** - 4736
- [26] Elda Maria del Rocío Coutiño Rodríguez, Rocío Anaís Pérez Gutiérrez. (2007). Los compuestos de plata y la salud. *Altepepaktli*, 29-36.

- [27] Dibrov P., Dzioba J., Khoosheh K. Gosink and Häse C. Chemiosmotic Mechanism of Antimicrobial Activity of  $Ag^+$  in *Vibrio cholerae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. (2002) *Ag Vol* 46, No 8. 2668-2670 pp.
- [28] Nordberg G. Metales; propiedades químicas y toxicidad. En *Enciclopedia de salud y seguridad del trabajo*. (2002) 37- 38 pp.
- [29] Liao S., Read D., Pugh W., Furr J., Russell A. Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions. *Letters in applied microbiology* (1997) 25; 279-283 pp.
- [30] Kvítek L., Prásková M., Pálek P., Prucek R. 38 Volumen 3, Nº 5, marzo 2007 and Novotný R. Effect of cetyltrimethylammonium bromide on formation of colloidal silver particles. *Natural Chemica* (2001), 40 41-41-42 pp.
- [31] Dorau B., Arango R. and Green F. An Investigation into the potential of ionic silver as a wood preservative. *Proceedings from the Woodframe housing durability and disaster issues*. October. USA. (2004) 133 -145 pp.
- [32] Maillard. J.Y. Bacterial target sites for biocide action. *Journal of applied Microbiology Symposium Supplement* (2002) 92; 16- 27 pp.
- [33] Elechinguerra J.L., Burt J., Morones J., Camacho A. Gao X., Lara H. y Yacamán M., Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *Journal of Nanobiotechnology* (2005). 10p.
- [34] Russell A.D. Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides. *Journal of antimicrobial chemotherapy* (2003) 52; 750-763 pp.
- [35] McDonnell and Russell. Antiseptics and disinfectants. *Clin Microbiol. Rev* (1999) Vol 12. pp.
- [36] Tonkin A, Ahokas J, Bennett J, Chow R, Cumming F, Duke C, Fluhrer J, Johanson V, Lin C, Myers S, Peachey G, Benyei J, Cameron H, Cunningham J, Lehane L, Newman-Martin G. Colloidal silver. *Complementary Medicines Evaluation Committee Tenth Meeting*. Sydney (1998) 5-7 pp.
- [37] Lockey J.D y Venugopal. Metal toxicity in mammals. En "Physiologic and chemical Basis for metal toxicity" (1977) Vol 1. New York and London. 33 -37 pp.
- [38] Lockey J.D and Venugopal B., Metal toxicity in mammals. En *Physiological and chemical Basis for metal toxicity* New York and London (1999) Vol 2. 32 -37 pp.
- [39] Tonkin A, Ahokas J, Bennett J, Chow R, Cumming F, Duke C, Fluhrer J, Johanson V, Lin C, Myers S, Peachey G, Benyei J, Cameron H, Cunningham J, Lehane L, Newman-Martin

- G. Colloidal silver. Complementary Medicines Evaluation Committee Tenth Meeting. Sydney (1998) 5-7 pp.
- [40] Jeffrey K. McKenna, Christopher M. Hull and John J. Zone. Argyria associated with colloidal silver supplementation. *International Journal of Dermatology* (2003) Vol 42, 549 pp.
  - [41] Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci* 2004;275:177 - 82.
  - [42] Amro NA, Kotra LP, Wadu-Mesthrige K, Bulychev A, Mobashery S, Liu G. High-resolution atomic force microscopy studies of the *Escherichia coli* outer membrane: structural basis for permeability. *Langmuir* 2000;16:2789- 96.
  - [43] Danilczuk M, Lund A, Saldo J, Yamada H, Michalik J. Conduction electron spin resonance of small silver particles. *Spectrochimica Acta Part A* 2006;63:189 - 91.
  - [44] Jose Ruben Morones, Jose Luis Elechiguerra, Alejandra Camacho, Katherine Holt, Juan B Kouri, Jose Tapia Ramirez and Miguel Jose Yacaman. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *NANOTECHNOLOGY*, 2346–2353.
  - [45] Raimondi F, Scherer G G, Kotz R and Wokaun A 2005 *Angew. Chem. Int. Edn Engl.* 44 - 2190 -209.
  - [46] Hatchett D W and Henry S 1996 *J. Phys. Chem.* 100 - 9854–9
  - [47] Vitinov T and Popov A 1983 *J. Electroanal. Chem.* 159 - 437–41
  - [48] Ahrland S, Chatt J and Davies N R 1958 *Q. Rev. Chem. Soc.* 12 - 265–76
  - [49] Alcamo I E 1997 *Fundamentals of Microbiology* 5th edn (Reading, MA: Addison Wesley Longman Inc.)
  - [50] Feng Q L *et al* 2000 *J. Biomed. Mater. Res.* 52 -662–8
  - [51] Jose Luis Elechiguerra, Justin L Burt, Jose R Morones, Alejandra Camacho-Bragado, Xiaoxia Gao, Humberto H Lara and Miguel Jose Yacaman. (2005). Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *Journal of Nanobiotechnology*, 1-10.
  - [52] Bonet F, Guery C, Guyomard D, Urbina RH, Tekaia-Elhsissen K, Tarascon JM: Electrochemical reduction of noble metal compounds in ethylene glycol. *International Journal of Inorganic Materials* 1999, 1:47-51.
  - [53] Wiley B, Sun Y, Mayers B, Xia Y: Shape-controlled synthesis of metal nanostructures: The case of silver. *Chemistry - A European Journal* 2005, 11:454-463.

- [54] Peters TJ: All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications. In *All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications* San Diego, Academic Press; 1996:9-75.
- [55] Forster MJ, Mulloy B, Nermut MV: Molecular modelling study of HIV p17gag (MA) protein shell utilising data from electron microscopy and X-ray crystallography. *J Mol Biol* 2000, 298:841-857.
- [56] Arthur LO, Bess JW, Sowder RC, Benveniste R, Mann D, Chermann J, Henderson L: Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines. *Science* 1992, 258:1935-1938.
- [57] Leonard CK, Spellman MW, Riddle L, Harris RJ, Thomas JN, Gregory TJ: Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1990, 265:10373-10382.
- [58] Gelderblom HR, Hausmann EHS, Ozel M, Pauli G, Koch MA: Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology* 1987, 156:171-176.
- [59] Harada S, Koyanagi Y, Yamamoto N: Infection of HTLV-III/LAV in HTLV-I-carrying cells MT-2 and MT-4 and application in a plaque assay. *Science* 1985, 229:563-566.
- [60] Sodroski J, Goh WC, Rosen C, Campbell K, Haseltine WA: Role of the HTLV-III/LAV envelope in syncytium formation and cytopathicity. *Nature* 1986, 322:470-474.
- [61] Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, Di Marzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, Davis CB, Peiper SC, Schall TJ, Littman DR, Landau NR: Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 1996, 381:661.
- [62] Chackerian B, Long EM, Luciw PA, Overbaugh J: Human immunodeficiency virus type 1 coreceptors participate in postentry stages in the virus replication cycle and function in simian immunodeficiency virus infection. *J Virol* 1997, 71:3932-3939.
- [63] Kaltenbach JP, Kaltenbach MH, Lyons WB: Nigrosin as a dye for differentiating live and dead ascites cells\*1. *Exp Cell Res* 1958, 15:112-117.
- [64] Candida albicans at NCBI Taxonomy browser, url accessed 2006-12-26
- [65] Ryan KJ; Ray CG (editors) (2004). *Sherris Medical Microbiology* (4th ed. edición). McGraw Hill. ISBN 0-8385-8529-9.

- [66] libre, W. I. (08 de Febrero de 2001). *Candida albicans*. Recuperado el 08 de Febrero de 2011, de Candida albicans: [http://es.wikipedia.org/wiki/Candida\\_albicans](http://es.wikipedia.org/wiki/Candida_albicans)
- [67] Murray R G E, Steed P and Elson H E 1965 *Can. J. Microbiol.* 11 – 547
- [68] Shockman G D and Barret J F 1983 *Annu. Rev. Microbiol.* 37 – 501
- [69] Liao S Y *et al* 1997 *Lett. Appl. Microbiol.* 25 - 279–83
- [70] Nomiya K *et al* 2004 *J. Inorg. Biochem.* 98 - 46–60
- [71] Gupta A and Silver S 1998 *Nat. Biotechnol.* 16-888
- [72] Feng Q L *et al* 2000 *J. Biomed. Mater. Res.* 52 - 662–8
- [73] Matsumura Y *et al* 2003 *Appl. Environ. Microbiol.* 69 - 4278–81
- [74] Gupta A, Maynes M and Silver S 1998 *Appl. Environ. Microbiol.* 64 - 5042–5
- [75] Nover L, Scharf K D and Neumann D 1983 *Mol. Cell. Biol.* 1648–55
- [76] Yacaman M J *et al* 2001 *J. Vac. Sci. Technol. B* 19 1091–103
- [77] Ajayan P M and Marks L D 1988 *Phys. Rev. Lett.* 60 585–7
- [78] Liz-Marzan LM: Nanometals: Formation and color. *Materials Today* 2004, 7:26-31.
- [79] Burda C, Chen X, Narayanan R, El-Sayed MA: Chemistry and Properties of Nanocrystals of Different Shapes. *Chemical Reviews (Washington, DC, United States)* 2005, 105:1025-1102.
- [80] Yu YY, Chang SS, Lee CL, Wang CRC: Gold nanorods: electrochemical synthesis and optical properties. *Journal of Physical Chemistry B* 1997, 101:6661-6664.
- [81] Lisiecki I, Filankembo A, Sack-Kongehl H, Weiss K, Pileni MP, Urban J: Structural investigations of copper nanorods by high-resolution TEM. *Physical Review B: Condensed Matter and Materials Physics* 2000, 61:4968-4974.
- [82] Zhou Y, Yu SH, Cui XP, Wang CY, Chen ZY: Formation of Silver Nanowires by a Novel Solid-Liquid Phase Arc Discharge Method. *Chemistry of Materials* 1999, 11:545-546.
- [83] Canizal G, Ascencio JA, Gardea-Torresday J, Jose-Yacaman M: Multiple twinned gold nanorods grown by bio reduction techniques. *Journal of Nanoparticle Research* 2001, 3:475-481.

- [84] Jana NR, Gearheart L, Murphy CJ: Seed-mediated growth approach for shape-controlled synthesis of spheroidal and rod-like gold nanoparticles using a surfactant template. *Advanced Materials (Weinheim, Germany)* 2001, 13:1389-1393.
- [85] Schultz S, Smith DR, Mock JJ, Schultz DA: Single-target molecule detection with nonbleaching multicolor optical immunolabels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* FIELD Publication Date:2000 Feb 1 97:996-1001.FIELD Reference Number: FIELD Journal Code:7505876 FIELD CallNumber:.
- [86] Liao SY, Read DC, Pugh WJ, Furr JR, Russell AD: Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions. *LettApplMicrobiol*1997, 25:279-283.
- [87] Nomiya K, Yoshizawa A, Tsukagoshi K, Kasuga NC, Hirakawa S, Watanabe J: Synthesis and structural characterization of silver(I), aluminium (III) and cobalt(II) complexes with 4-isopropyltropolone(hinokitiol) showing noteworthy biologicalactivities. Action of silver(I)-oxygen bonding complexes on the antimicrobial activities. *J InorgBiochem*2004, 98:46-60.
- [88] Sondi I, Salopek-Sondi B: Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci*2004, 275:177-182.
- [89] Ryan KJ; Ray CG (editors) (2004). *Sherris Medical Microbiology* (4th ed. edición).McGraw Hill.ISBN 0-8385-8529-9.
- [90] Iglewski BH (1996). Pseudomonas. In: Baron's Medical Microbiology (Baron S et al, eds.) (4th ed. edición). Univ of Texas Medical Branch.(via NCBI Bookshelf)ISBN 0-9631172-1-1.
- [91] Fine et al, JAMA 1996: 275: 134
- [92] Diekema DJ et al. ClinInfectDis 1999;29:595
- [93] libre, W. I. (08 de Febrero de 2011). *Pseudomonas aeruginosa*. Recuperado el 08 de Febrero de 2011, de Pseudomonas aeruginosa:  
[http://es.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas\\_aeruginosa](http://es.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas_aeruginosa)
- [94] <http://www.varianinc.com>
- [95] Surface Plasmons, H. Raether, Springer-Verlag, Berlin (1988).
- [96] <http://www.mse.iastate.edu/microscopy/home.html>

- [97] El Microscopio electrónico de barrido como herramienta en la investigación. M.Avalos, I. Gradilla, ConCiencia,16-20
- [98] <http://www.itma.es/esp/02/equipamiento/servicios/equipamientonometal23.html>