



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA



**CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y EVALUACIÓN DE LA
ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE PELÍCULAS DE QUITOSANO
CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

JOSÉ ARTURO MARTÍNEZ NAMBO

ASESOR:

D.C. JANETT BETZABE GONZÁLEZ CAMPOS

MORELIA, MICHOACÁN. DICIEMBRE 2012

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Biopolímeros y Materiales del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección de la investigadora D.C. Janett Betzabe González Campos.

Con apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y de la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH

Parte de este trabajo fue presentado en:

**“CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y EVALUACIÓN DE LA
ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL DE PELÍCULAS DE QUITOSANO
CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA”**

***José Arturo Martínez Nambo, J. Betzabe González-Campos, Rosa
E del Río, Yliana López Castro, E. Prokhorov.***

**7^{mo} Congreso Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación
realizado los días 30 y 31 de Octubre de 2012. Morelia, Michiacán.**

DEDICATORIA

A MIS PADRES Y HERMANOS...

LOS QUIERO MUCHO.

...Y A TODOS MIS AMIGOS CON LOS QUE SIEMPRE HE
COMPARTIDO Y ME HAN COMPARTIDO ALEGRÍAS Y
TRISTESAS. A TOD@S SIEMPRE LOS LLEVO EN MI MENTE
Y CORAZÓN...GRACIAS POR SU APOYO SIEMPRE =)

*“Todos tenemos a alguien, cuyo trabajo es importante
para que nosotros podamos salir adelante. Uno necesita
muchos paracaídas en la vida; uno físico, uno emocional,
uno mental y hasta uno espiritual...”*

Charles Plumb

AGRADECIMIENTOS

Antes que todo quiero dar gracias a Dios por todas las bendiciones que me ha dado empezando por mi vida, mi familia, amig@s y en general a todos mis seres queridos. A él le agradezco la fuerza en cada momento donde he sentido que no puedo dar más pero sin embargo eh podido salir adelante.

A mi madre quien siempre me ha apoyado desde siempre, gracias por todo tu amor y todas las atenciones hacia mi. A mis hermanos que me han hecho el día infinidad de veces Gracias por su compañía y por último y no menos importante, a mi padre. Gracias familia querida por todo su amor.

También a mis amigos los MATRIX: sin olvidar a la bandita de toda la vida ,a todos mis amigos tantos que me faltan, aunque no los mencione, les agradezco cada riza, discusión, pleitos, sustos y demás que hemos vivido juntos.

A mi amada Romea Chepuplina gracias por toda tu paciencia, apoyo y comprensión (yo sé que te ha costado trabajo je...). Gracias por todo tu amor.

A mi asesora la Dra. Betzabe de verdad que no se como agradecerle y pagarle tanto apoyo y disponibilidad hacia mi. Gracias por la invitación, su confianza y la oportunidad de participar en este proyecto bajo su cargo. Todo lo que aquí viví, todo lo que aprendí fue gracias a usted.

Por último a todos mis revisores, la Dra. Yliana, la Dra. Judith, la Dra. Rosa y los Doctores Luis y Mario por dedicar parte de su tiempo para revisar este trabajo y enriquecerlo con sus valiosas aportaciones. Gracias también por su disponibilidad y sus atenciones, por recibirme siempre con una sonrisa.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	iv
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. JUSTIFICACIÓN.....	6
3. OBJETIVOS.....	7
3.1 Objetivo General.....	7
3.2 Objetivos Específicos.....	7
4. HIPÓTESIS.....	8
5. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO.....	9
5.1 Nanotecnología y Nanocompuestos.....	9
5.2 Plata.....	13
5.3 Quitosano.....	14
5.3.1 Características Físicoquímicas del Quitosano.....	17
5.3.2 Propiedades del Quitosano.....	19
5.3.3 Películas de Quitosano.....	21
5.3.4 Bionanocompuestos.....	23
5.3.5 Síntesis de Compuestos CS/AgnP's.....	24
5.3.6 Caracterización de Compuestos CS/AgnP's.....	27
6. MATERIALES Y METODOLOGÍA.....	29
6.1 Preparación de Películas CS/AgnP's.....	29
6.2 Análisis Dinámico Mecánico (DMA).....	31
6.3 Espectroscopía Dieléctrica (DS).....	31
6.4 Modulo Dieléctrico.....	31
6.5 Determinación del Contenido de Humedad (Análisis TGA).....	32
6.6 Mediciones por Espectroscopía de Infrarrojo y Análisis Morfológico ..	34
6.7 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	34

6.8 Análisis UV-Vis.....	34
6.9 Determinación de la Actividad Antibacteriana de Compuestos CS/AgnP's	34
7. RESULTADOS.....	36
7.1 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	36
7.2 Análisis UV-Vis.....	37
7.3 Interacción Química/Análisis FTIR.....	38
7.4 Mediciones TGA/Contenido de Humedad	40
7.5 Análisis Dinámico Mecánico (DMA)	43
7.6 Análisis Dieléctrico	45
7.7 Análisis Antibacteriano.....	54
8. CONCLUSIONES	62
9. BIBLIOGRAFÍA	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Conductividad del quitosano	5
Figura 5.1.1 Definición de partícula según su tamaño.....	10
Figuras 5.3.1 y 5.3.2. Proceso de obtención de quitina y de quitosano	15
Figura 5.3.3. Estructura de la quitina (5.3.3a) y del quitosano (5.3.3b).....	16
Figura 5.3.4. Formación de quitosano a partir de la desacetilación de la quitina	17
Figura 5.3.2.1. Algunas aplicaciones del quitosano.....	20
Figura 6.1.1. Tonalidad de las películas respecto a la concentración de AgnP's	30
Figura 7.1.1. Tamaño y distribución de AgnP's en las películas de CS	37
Figura 7.2.1. Espectro UV-Vis para quitosano puro y compuestos CS/AgnP's	38
Figura 7.3.1. Espectros IR de quitosano puro y compuestos de CS/AgnP's .	40
Figura 7.4.1a. Medición del contenido de humedad.....	42
Figura 7.4.1b. Contenido de humedad y temperatura de degradación	42
Figura 7.5.1. Espectro DMA para CS/AgnP's (3% en peso)	44
Figura 7.6.1. Conductividad DC vs % en peso de AgnP's en películas anhidras	46
Figura 7.6.2. Espectro de impedancia compleja (Z Vs. Z'') para películas anhidras de CS/AgnP's	47
Figura 7.6.3. Log de conductividad DC (σ_{dc}) vs 1000 K/T para compuestos CS/AgnP's	48
Figura 7.6.4. CS/AgnP's 1% en peso a diferentes temperaturas de calentamiento	50
Figura 7.6.5. Energía de activación para el proceso de relajación- σ	53
Figura 7.7.1. Log UFC/cm ² vs tiempo para compuestos NCS y NNCS	56
Figura 7.6.2. Análisis antibacteriano para compuestos CS/AgnP's (a) y (b)..	60

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

τ	Tiempo de Relajación
°C.....	Grados centígrados
°C/min.....	Grados centígrados por minuto
μ L.....	microlitro
μ m.....	micrómetro
ADN.....	Ácido Desoxirribonucleico
Ag.....	Plata
AgNO ₃	Nitrato de Plata
AgnP's.....	Nanopartículas de Plata
C ₆ H ₇ NaO ₆	Ascorbato de Sodio
cm.....	centímetro
CS.....	Quitosano
DC.....	Conductividad Eléctrica de Corriente Directa
DMA (por sus siglas en inglés).....	Análisis Dinámico Mecánico
DS (por sus siglas en inglés).....	Espectroscopía Dieléctrica
DSC (por sus siglas en inglés).....	Calorimetría Diferencial de Barrido
EIE.....	Espectroscopía de Impedancia Eléctrica
etc.....	etcétera
FTIR (por sus siglas en inglés).....	Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier
g.....	gramos
g/mol.....	gramo por mol
GlcN.....	Glucosamina
h.....	hora
HAuCl ₄	Tetracloroaurato (III) de Hidrógeno

HOC (COONa)(CH ₂ COONa) ₂ ·2H ₂ O.....	Citrato Sodio
Hz.....	Hertz
IUPAC (por sus siglas en inglés).....	International Union of Pure and Applied Chemistry
K.....	Kelvin
kg/m ³	kilogramo por metro cúbico
KOH.....	Hidróxido de Potasio
m.....	metro
M.....	Molar
Mg.....	miligramo
mg/L.....	miligramo por litro
mg/m ³	miligramo por metro cúbico
MHz.....	Megahertz
mL/min.....	mililitro por minuto
mm.....	milímetro
mV.....	milivoltios
Mw (por sus siglas en inglés).....	peso molecular
N.....	Nitrógeno
NaBH ₄	Borohidruro de Sodio
NaCl.....	Cloruro de Sodio
NaOH.....	Hidróxido de Sodio
NCS.....	Quitosano Neutralizado
nm.....	nanómetro
NNCS.....	Quitosano puro no Neutralizado
p. eb.....	punto de ebullición
pH.....	potencial hidrógeno

ppb.....	partes por billón
ppm.....	partes por millón
R-NH ₃ ⁺	Grupo amino protonado
S.....	Siemens
SEM (por sus siglas en inglés).....	Microscopía Electrónica de Barrido
T ₀	Temperatura de Vogel
tan δ.....	Factor de Amortiguamiento
T _g	Temperatura de Transición Vítrea
TGA (por sus siglas en inglés).....	Análisis Termogravimétrico
UFC.....	Unidades Formadoras de Colonia
UV-Vis.....	Ultravioleta-Visible
VFT.....	Relación Vogel-Fulcher-Tammann
X-RD (por sus siglas en inglés).....	Difracción de Rayos X
ε*.....	permitividad compleja

RESUMEN

De la combinación de plata en forma de nanopartículas (AgNP's) con el quitosano (CS), el cual es un biopolímero derivado de la quitina, se obtiene un nuevo material en forma de una película delgada conformada por el CS funcionando como una matriz polimérica en la cual están incrustadas las nanopartículas de plata. Ambos componentes fueron elegidos debido al hecho de que por si solos tienen la capacidad de interactuar contra una amplia gama de microorganismos causando en ellos un efecto bactericida y/o bacteriostático, por lo que es de esperarse que con la combinación de ambos compuestos sea posible potencializar dicho efecto, además de que se obtienen películas con propiedades mecánicas mejoradas.

Esta combinación no es nueva, sin embargo estos compuestos solamente han sido estudiados desde el punto de vista de los parámetros manejados para su síntesis y no se cuenta con una caracterización fisicoquímica integral de los mismos. En este sentido, el contar con una caracterización integral es importante para verificar si existe una relación entre su actividad antibacteriana y sus propiedades fisicoquímicas (conductividad, tamaño de partícula, interacción química, etcétera). Conociendo las propiedades físicas y químicas a nivel molecular podemos determinar como se comportará el compuesto a nivel macroscópico.

Entre las herramientas empleadas para la caracterización de estos compuestos, se resalta específicamente el uso la Espectroscopía de Impedancia Eléctrica (EIE), la cual permitió realizar la determinación de las propiedades dieléctricas de las películas y a su vez relacionar estos resultados con la actividad antibacteriana que presentan estos compuestos. Esto permite sugerir el uso de estos bionanocompuestos como sensores bacteriológicos a partir de la medición de sus propiedades dieléctricas. Los análisis son apoyados con el uso de diferentes técnicas de caracterización como el análisis dinámico mecánico (DMA), la Espectroscopía de Infrarrojo (FTIR), la Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), entre otras.

El estudio se realizó en películas de quitosano puro neutralizadas y no neutralizadas así como en compuestos CS/AgnP's con diferentes concentraciones de AgnP's en % peso respecto del peso de quitosano (1%, 3%, 5% y 10%) sobre cuatro bacterias: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus*. Se observó un incremento de la actividad antibacteriana del quitosano puro al adicionar las AgnP's y se determinó que este efecto aumenta al incrementar la concentración hasta llegar a un 3% en peso de las mismas. Sin embargo, arriba de esta concentración este efecto disminuye debido a la formación de aglomerados y a la disminución del contenido de agua en las películas de los compuestos.

La concentración de 3% en peso de AgnP's resulta ser el umbral de percolación en conductividad y una concentración clave en todas las técnicas de caracterización empleadas en este trabajo. Además, un 3% en peso de nanopartículas es la concentración óptima para obtener la actividad antibacteriana más pronunciada, lo que define a ésta concentración como un punto clave para obtener un cambio drástico en las propiedades de los bionanocompuestos.

Dado estos resultados, es posible obtener información de manera indirecta sobre la actividad antibacteriana de estos bionanocompuestos a través de mediciones dieléctricas, sin la necesidad de realizar cultivos bacteriológicos.

ABSTRACT

The combination of silver in the form of nanoparticles (AgnP's) with chitosan (CS) which is a chitin derivative, a new material in the form of a thin film formed by the CS polymer matrix where silver nanoparticles are embedded was obtained. Both components were chosen due to the fact that individually they have the capacity to interact against a broad range of microorganisms causing them a bactericidal and/or bacteriostatic effect, and it is expected that the combination of both compounds will potentiate the antibacterial effect and films with improved mechanical properties can be obtained.

This combination is not new, however these compounds have been studied only from the point of view of synthesis parameters, and an integral physicochemical characterization has not been done. In this regard, a complete characterization is important to verify if there is a relationship between their antibacterial activity and physicochemical properties (conductivity, particle size, chemical interaction, etc...). Knowing the physical and chemical properties at the molecular level could help to determine how the compound will behave macroscopically.

Among the tools used for the characterization of these compounds it is important to stand out the use of the Impedance Spectroscopy (IS), which allowed the determination of films dielectric properties and related them to the antibacterial activity. This allows us to suggest the use of these bionanocomposites as bacteriological sensors by means of the measurement of the dielectric properties. The study is supported by different characterization techniques such as Dynamic Mechanical Analysis (DMA), Infrared Spectroscopy (FTIR), Scanning Electron Microscopy (SEM) between others.

The study was carried out on neat neutralized and non-neutralized chitosan films as well as in CS/AgnP 's compounds with different concentrations of AgnP's weight percent (1%, 3%, 5% and 10%) respect to the weight of chitosan on four bacteria: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus*. An increase of the antibacterial activity of chitosan by

adding the AgnP's was observed, and this effect increases with increasing concentration of AgnP's up to 3 wt%. However, above this concentration this effect decreases due to formation of agglomerates and the decrease of moisture content on the compound films.

The percolation threshold in conductivity is 3 wt% of AgnP's, and this concentration is found to be a turning point in all the characterization techniques used in this work. In addition, a 3 wt% nanoparticles is the optimal concentration for the antibacterial activity, which defines this concentration as a key to obtain a drastic change in bionanocomposites properties.

With these results, it is important to note, that it is possible to obtain information of the antibacterial activity of these bionanocomposites indirectly from the dielectric measurements without the need of bacterial cultures.

1. INTRODUCCIÓN

La adhesión de las bacterias sobre las superficies de diversos materiales, tales como implantes médicos y los conductos industriales, puede conducir a la formación de biopelículas y el brote de enfermedades infecciosas [1]. Los recubrimientos antibacterianos pueden aplicarse fácilmente a diferentes tipos de superficies para evitar la proliferación de microorganismos dañinos lo cual reduciría al mínimo este tipo de situaciones no deseadas. Los recubrimientos antibacterianos de partículas coloidales podrían ser incluso más beneficiosos en diversas aplicaciones debido a sus altas relaciones superficie-volumen. Tales partículas coloidales antibacterianas, podrían incorporarse en los materiales que se procesan a partir de suspensiones o emulsiones, como por ejemplo materiales de revestimiento en polvo y pigmentos, y también se podrían utilizar como cargas en diversos dispositivos médicos, además, mediante el uso de partículas que responden a campos externos, sería posible enviar agentes antibacterianos a lugares específicos donde las bacterias tienden a adherirse y formar biopelículas sin contaminar la mayor parte del fluido de las tuberías de procesamiento industrial y alimentos con altas concentraciones del agente antibacteriano.

En la actualidad existe una gran preocupación acerca de la aparición de cepas bacterianas resistentes a múltiples fármacos y los continuos esfuerzos de investigación están enfocados al desarrollo de nuevos y efectivos agentes antimicrobianos. Por lo cual, los agentes antimicrobianos inorgánicos en general y las nanopartículas metálicas en particular son considerados como candidatos ideales para satisfacer dichos requisitos, debido a su estabilidad química, larga vida y resistencia al calor [2].

Es bien conocido desde tiempos antiguos que la plata posee extraordinarias propiedades bacteriostáticas y bactericidas. Si bien, es relativamente no tóxica para las células humanas, la plata es letal para un amplio espectro de cepas bacterianas presentes en procesos industriales, así como en el cuerpo humano. Debido a estas características, la plata en diversas formas es ideal para un gran

campo de aplicaciones en productos industriales, médicos y de consumo. Varios dispositivos y productos tales como catéteres urinarios, anillos de sutura, y elementos de envasado de alimentos contienen plata como un componente antiséptico [1]. En la época moderna diversos compuestos de plata se venden en el mercado en forma de suplementos naturales para combatir infecciones. En los hospitales, uno de los compuestos usado con frecuencia es el nitrato de plata en soluciones diluidas, el cual se aplica en los ojos de recién nacidos para evitar posibles infecciones. Es conocida la actividad antibacteriana de los iones plata y de compuestos a base de plata, así como de las nanopartículas de plata en las cuales existe un efecto dependiente de la concentración y el tamaño, el cual es más pronunciado contra bacterias Gram negativas que contra Gram positivas [3]. Esto debido a las diferentes estructuras de membrana que permiten una clasificación general de las bacterias.

En particular, las nanopartículas de plata (AgnP's) han demostrado ser más convenientes para ser utilizadas en tales aplicaciones debido a su sintonizable tamaño, forma y superficie química que les permite ser diseñadas con propiedades específicas requeridas.

El tamaño de los nanomateriales es similar al de algunas moléculas y estructuras biológicas como virus, polímeros o el material genético por ejemplo, por lo tanto, los nanomateriales pueden ser útiles tanto para investigaciones biomédicas *in vivo* como *in vitro* lo cual permite ampliar sus aplicaciones. La integración de los nanomateriales con la biología ha llevado al desarrollo de dispositivos de diagnóstico, agentes de contraste, herramientas analíticas, aplicaciones de terapia física y vehículos de suministro de fármacos. Diferentes tipos de materiales en su estado nanométrico, tales como cobre, zinc, titanio, magnesio, oro, alginato y plata han sido estudiados, sin embargo, las nanopartículas de plata han demostrado ser más efectivas ya que tienen mayor eficacia antimicrobiana contra bacterias, virus y otros microorganismos eucariotas [4].

Las nanopartículas aumentan la actividad química respecto a los materiales a macroescala, debido a la estructura de la superficie cristalográfica con su gran superficie en relación al volumen. La importancia del estudio de los nanomateriales con efecto bactericida es debida al aumento de nuevas cepas de bacterias resistentes a los antibióticos más potentes. Esto ha promovido la investigación de la síntesis de una nueva familia de antibióticos basada en compuestos de plata principalmente, debido a la eficiencia mostrada en recientes estudios y la antigua trayectoria de este metal como agente microbicida.

Por otro lado, un aspecto importante en el campo de la investigación biomédica es la mejora de la biocompatibilidad de los agentes terapéuticos. Típicamente es probable que las AgnP's presenten toxicidad para las células de seres vivos como animales y humanos bajo condiciones fisiológicas, lo que limita sus aplicaciones en sistemas biológicos. Por lo tanto, numerosos esfuerzos de investigación se centran en la combinación de AgnP's con surfactantes, polímeros y antibióticos, que pueden conducir a la obtención de agentes antibacterianos sinérgicos con propiedades nuevas y mejoradas, que no se conseguirían a partir de los componentes individuales. De esta forma, el quitosano (CS), un compuesto derivado de la quitina, es un biopolímero el cual posee actividad antibacteriana contra bacterias Gram negativas y Gram positivas [2].

Debido a su excelente biocompatibilidad biodegradabilidad y no toxicidad, el CS ha sido utilizado con éxito en nanomedicina para la liberación de medicamentos terapéuticos, proteínas y genes. Hasta la fecha se ha reportado que el CS sirve para promover la síntesis de nanopartículas metálicas, principalmente nanopartículas de oro y plata. Sin embargo, se ha prestado poca atención a la utilización de estos nanocompuestos metal-biopolímero como agentes antibacterianos por lo que su caracterización fisicoquímica completa no ha sido reportada anteriormente [2].

De esta manera, el estudio de los mecanismos de relajación en materiales de base polimérica es de suma importancia para su posterior aplicación, y es de especial interés en esta combinación quitosano (CS)/nanopartículas de plata (AgNP's) ya que no han sido abordados anteriormente. El estudio de la naturaleza de estos mecanismos proporciona información sobre diferentes propiedades físicoquímicas de los materiales y posibles respuestas bajo ciertos estímulos; tal es el caso de la temperatura de transición vítrea (T_g).

La T_g es un valor de extrema importancia en ingeniería de polímeros, pues indica la temperatura de trabajo del material y por ende determina si puede ser utilizado o no para una aplicación dada. En quitina y quitosano, esta temperatura puede ser detectada y monitoreada a través del análisis del proceso de relajación tipo α [5]. Por su parte el conocer el mecanismo de conductividad y su dependencia con la temperatura es trascendental para algunas aplicaciones específicas de estos compuestos metal-polímero como lo es en biosensores y componentes electrónicos, ya que las aplicaciones futuras en electrónica se han enfocado recientemente en la creación de elementos a nanoescala.

La conductividad del quitosano puro es de tipo iónico debido a la presencia de grupos amino libres y se encuentra entre 10^{-9} y 10^{-11} S cm^{-1} . La absorción de humedad del ambiente puede aumentar su conductividad hasta 10^{-4} S cm^{-1} , debido a que los grupos amino pueden protonarse (R-NH_3^+), dejando a los iones oxidrilo libres en el agua lo cual origina cambios en la conductividad iónica del quitosano (Figura 1.1) [5]. Adicionalmente, debido a un fuerte efecto plastificante del agua, la absorción de humedad en quitosano hace posible la detección de la relajación- α de baja frecuencia asociada a la transición vítrea. Sin embargo, cuando el material presenta un porcentaje de humedad cercano a cero, no es posible observar este proceso de relajación. Es por esta razón que el control inadecuado de la humedad en el quitosano genera dificultades adicionales en la investigación de este material y por ende puede dar lugar a interpretaciones

erróneas en el análisis de las propiedades fisicoquímicas de bionanocompuestos y biomateriales base quitosano.

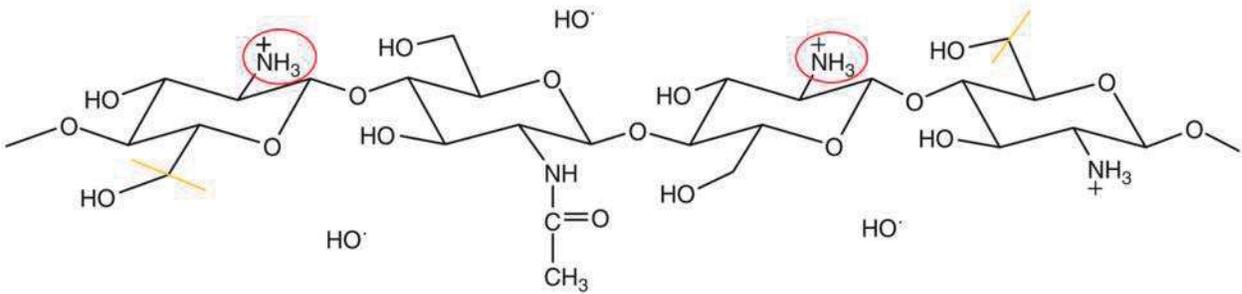


Figura 1.1. Conductividad del quitosano.

2. JUSTIFICACIÓN

La resistencia que presentan las bacterias actualmente a diferentes agentes antimicrobianos es debida principalmente al mal uso que se les ha dado a dichos agentes, por lo cual es necesario crear nuevos materiales que sean capaces de combatir a estas cepas resistentes evitando que generen mayor resistencia. En general, es importante tener a la mano más y mejores herramientas que nos ayuden a combatir este problema tratando de dar un enfoque más natural, menos dañino y sobre todo con una selectividad más elevada. Es por eso que la combinación de un polímero natural como el CS y las AgnP's es ampliamente atractiva debido a la capacidad antibacteriana que poseen ambos componentes de forma individual y de la posibilidad de generar un compuesto biodegradable y biocompatible, comúnmente denominado bionanocompuesto. La incorporación de AgnP's al quitosano permite aumentar su conductividad, mejorar sus propiedades mecánicas y a la vez potenciar su efecto antibacteriano, con lo que es posible ampliar su espectro de aplicación, específicamente en aquellas aplicaciones donde la higiene es un factor clave; tal es el caso del campo de la biomedicina. Otras aplicaciones muy atractivas actualmente incluyen biosensores, celdas combustible electrolíticas, partes electrónicas, etc. En dichas aplicaciones, los mecanismos de conductividad y procesos de relajación son de gran importancia al estar relacionados con sus propiedades macroscópicas, sin embargo, éstos compuestos no han sido aún estudiados integralmente ya que las investigaciones se han centrado en su fabricación, caracterización microestructural y antibacteriana, siendo entonces el tema central de este trabajo de tesis su caracterización integral. Al obtener una caracterización integral, será posible relacionar sus propiedades fisicoquímicas con la actividad antibacteriana de estos compuestos y medir de forma indirecta esta propiedad (como es el caso de sus propiedades dieléctricas) sin la necesidad de realizar cultivos para su análisis.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Obtener compuestos CS/AgnP's con actividad antibacteriana, e investigar la influencia de las nanopartículas de plata sobre la absorción de humedad, los mecanismos de conductividad y los procesos de relajación del quitosano puro y relacionarlos con sus propiedades macroscópicas y su actividad antibacteriana haciendo uso como técnica principal de caracterización de la espectroscopia de impedancia eléctrica.

3.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar fisicoquímicamente y evaluar la actividad antibacteriana de películas delgadas de quitosano con diferentes concentraciones de AgnP's.
- Determinar las propiedades y datos dieléctricos de películas de quitosano puro neutralizadas y no neutralizadas, al igual que de los compuestos CS/AgnP's.
- Obtener datos de propiedades mecánicas por medio del Análisis Dinámico Mecánico (DMA) para verificar los resultados dieléctricos.
- Realizar un análisis estructural de los compuestos a través de la Microscopía Electrónica de Barrido (SEM por sus siglas en inglés) y relacionar los resultados con los obtenidos con las otras técnicas.
- Obtener información sobre posibles interacciones químicas entre el quitosano y las nanopartículas de plata a través de la Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés) y relacionarla con los datos obtenidos por las otras técnicas.
- Realizar un estudio sobre la actividad antibacteriana del quitosano puro neutralizado y no neutralizado y los compuestos CS/AgnP's.
- Determinar si existe una relación entre su respuesta dieléctrica y su potencial como antibacteriano e integrar todas las técnicas para realizar una caracterización fisicoquímica integral de estos compuestos.

4. HIPÓTESIS

El quitosano es un polímero cuyas propiedades físicas y químicas pueden estar relacionadas con su actividad antibacteriana. Dentro de los posibles mecanismos para explicar dicha actividad se plantea que los grupos amino protonados interactúan con la pared celular bacteriana provocando su ruptura causando por lo tanto la muerte de la misma. En el caso de la plata se sabe ya de su capacidad antibacteriana así como los medios por los cuales interactúa con microorganismos, sin embargo, al modificar el tamaño de las nanopartículas, también cambian sus propiedades fisicoquímicas, por lo tanto se espera que los mecanismos de interacción con las bacterias sean diferentes.

Sabiendo entonces que ambos compuestos presentan una actividad antibacteriana se espera que con la combinación de ambos se llegue a potencializar dicho efecto. A través de la Espectroscopía de Impedancia Eléctrica es posible obtener datos sobre la presencia y cantidad de los grupos amino protonados del quitosano los cuales, como se ha mencionado, están directamente relacionados con su actividad antibacteriana, de esta forma es posible establecer una relación directa entre la respuesta dieléctrica de estos materiales con su potencial antibacteriano, de tal forma que se pueda tener una medición indirecta de esta propiedad sin la necesidad de realizar cultivos bacteriológicos.

Por otro lado, conociendo las propiedades fisicoquímicas de las películas se podrá hacer una correlación más clara respecto a su actividad antibacteriana con la ayuda de diferentes herramientas de análisis como la Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), la Espectroscopía de Impedancia Eléctrica (EIE), la Espectroscopía de Infrarrojo (FTIR), el Análisis Dinámico Mecánico (DMA), entre otras; determinando las interacciones del polímero-metal-bacteria.

5. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO

5.1 Nanotecnología y Nanocompuestos

El prefijo “nano” proviene del griego *vávoς* que significa “superenano”, lo cual denota a los nanómetros (10^{-9} m) y esto equivale a la mil millonésima parte del metro. El término nanotecnología fue acuñado por el profesor Norio Taniguchi de la Universidad de Ciencia en Tokyo en el año de 1974 [3], para describir la fabricación precisa de materiales al nivel nanométrico. La definición de una partícula de acuerdo a su tamaño se presenta en la Figura 5.1.1, donde se observa que menos de 100 nm es una nanopartícula, menos de 1,000 nm (representado también como 1 μ m) una micropartícula submicrónica y más de 1,000 nm una micropartícula. Según su definición la nanotecnología era la tecnología necesaria para poder fabricar objetos o dispositivos (circuitos integrados, memorias de ordenador, dispositivos optoelectrónicos, etc.) con una precisión del orden de 1 nm. En la década siguiente se fue fraguando una definición que afirmaba que la Nanotecnología era “la tecnología donde las dimensiones o tolerancias en el rango de 0.1 a 100 nm (desde el tamaño del átomo a la longitud de onda de la luz) juegan un tamaño crítico”. Esta definición se ha mantenido en la comunidad científica y se conoce como aproximación top-down (de arriba hacia abajo, de lo grande a lo pequeño).

Un concepto alternativo irrumpió en 1986 cuando Eric Drexler propuso construir objetos más grandes a partir de sus componentes atómicos y moleculares. Esta aproximación se conoce como bottom-up (de abajo hacia arriba). En la actualidad se usa la terminología de Nanotecnología Molecular para describir esta aproximación. El concepto de nanotecnología fue presentado por el profesor de física Richard P. Feynman (quien es considerado como el padre de la nanociencia) en 1959 en una reunión de la Sociedad Americana de Física en su discurso titulado «*There's plenty of room at the bottom*» (“Hay un gran espacio en

el fondo”). Desde entonces, la nanotecnología se ha desarrollado en un campo multidisciplinar de ciencia aplicada y tecnología [3, 6, 7, 8].

La nanotecnología es la capacidad para trabajar en una escala alrededor de 1-100 nm con el fin de entender, crear, caracterizar y usar estructuras materiales, dispositivos y sistemas con nuevas propiedades que surgen de sus respectivas nanoestructuras [7].

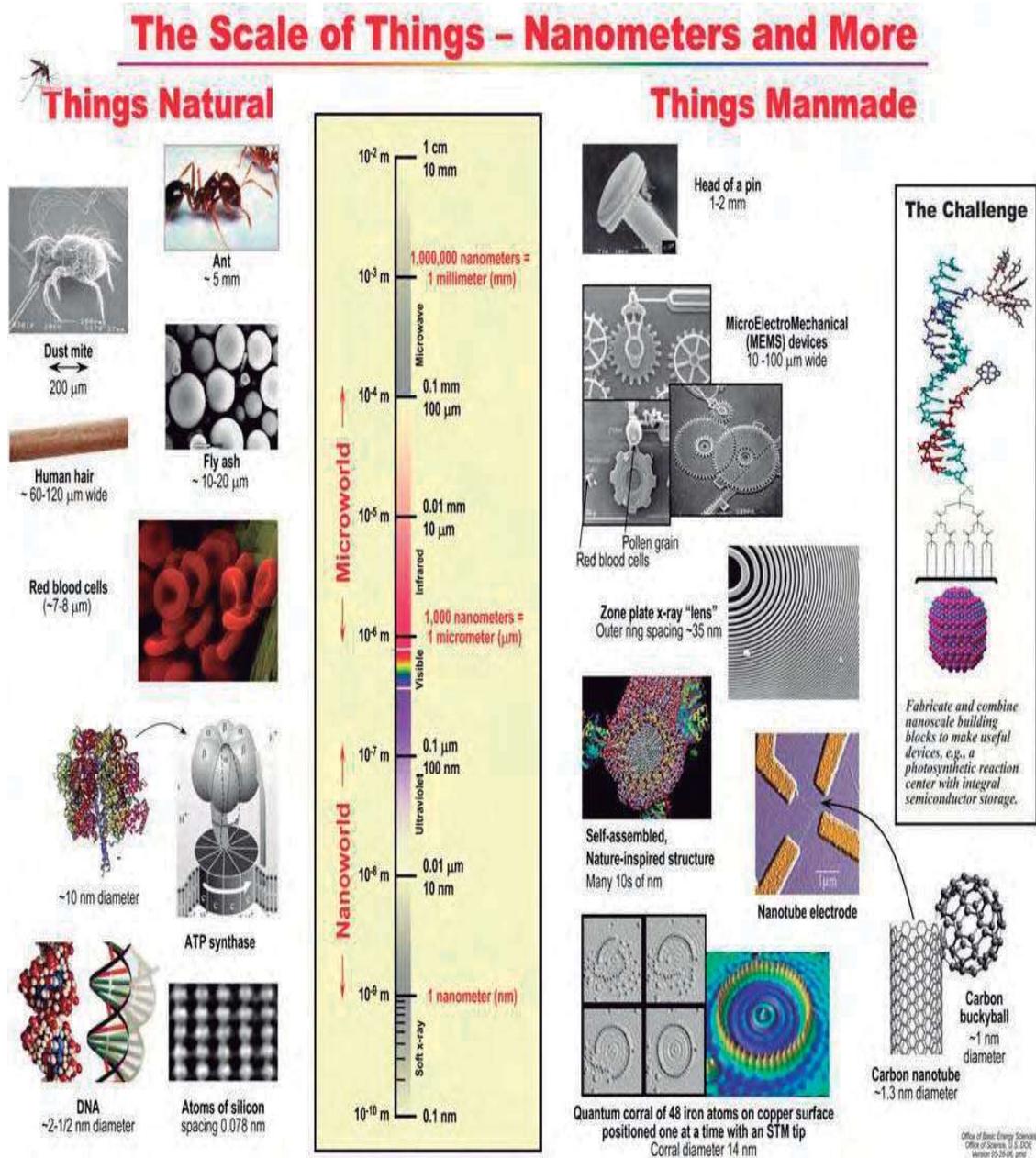


Figura 5.1.1. Definición de partícula según su tamaño. (Tomada de Ref. 59).

Debido a su tamaño, las nanopartículas tienen áreas superficiales proporcionalmente más grandes y por lo tanto más átomos superficiales que su contraparte: la microescala. En la escala nanométrica, los materiales pueden presentar diferentes propiedades electrónicas, que a su vez afectan a sus propiedades ópticas, reactivas, catalíticas, entre otras [7].

Como ya se mencionó, los nanomateriales están constituidos por estructuras elementales de las cuales al menos una de las dimensiones está comprendida, pero no exclusivamente, entre 1 a 100 nanómetros (nm) [9]. Esta característica dimensional confiere a los nanomateriales propiedades o comportamientos particulares utilizados notablemente para nuevas aplicaciones tecnológicas. Las propiedades de los nanomateriales varían notablemente según su composición química, tamaño, superficie específica, estado de la superficie, o aun la forma del nano-objeto considerado. Además, cada nanomaterial puede estar dotado de una reactividad o un comportamiento diferente según la formulación y la matriz del producto final que lo contiene. Debido a las aplicaciones innovadoras muchos sugieren que estas propiedades físicas, químicas o biológicas de los nanomateriales representan un área de investigación científica y técnica en expansión [9].

Por otra parte, el término “nanocompuesto” es comúnmente usado para polímeros que están repletos de nanocargas dispersas con tamaños de partícula promedio menores a 100 nm. Los “polímeros compuestos” son mezclas de polímeros con inclusiones inorgánicas u orgánicas con ciertas geometrías (fibras, copos, esferas, partículas, entre otras). El uso de materiales de relleno los cuales tienen al menos una dimensión en el rango nanométrico (nanopartículas) producen nanocompuestos poliméricos [7]. Una dispersión uniforme de las nanopartículas conduce a una matriz muy grande con un área interfacial rellena, lo que cambia la movilidad molecular, el comportamiento de relajación y por lo tanto las propiedades térmicas y mecánicas del material. Además de los efectos de los nanorefuerzos mismos, una región de la interface de la movilidad alterada que

rodea a cada nanopartícula es inducida por la buena dispersión de las nanopartículas resultando en una red de interface filtrada en el compuesto y que juega un papel importante en la mejora de las propiedades de los nanocompuestos. Para un contenido constante de inclusiones, una reducción en el tamaño de partícula aumenta el número de partículas de relleno, acercándolas entre sí, por lo que las capas de la interface entre partículas adyacentes sobrepuestas alteran las propiedades de volumen significativamente [7].

Unos de los materiales inorgánicos ampliamente utilizados en nanocompuestos son las nanopartículas metálicas, tales como cobre, oro y plata. Las nanopartículas de plata son de gran interés debido a que poseen propiedades antibacterianas, y en este caso, su combinación con un polímero proporciona estabilidad y da origen a un nanocompuesto con propiedades atractivas y un amplio potencial de aplicaciones.

Diferentes rutas de producción de nanopartículas de plata han sido investigadas. Muchas de ellas basadas en la reducción de nitrato de plata (AgNO_3) con borohidruro de sodio (NaBH_4), o citrato de sodio $\text{HOC}(\text{COONa})(\text{CH}_2\text{COONa})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [10]. Otros métodos incluyen el uso de microondas, electrólisis de sales de plata, microemulsión y fotoreducción de iones Ag. La reducción química es el método más común para la preparación de AgnP's, como dispersiones coloidales estables. La reducción de la plata en solución acuosa produce plata coloidal con diámetros de partículas de varios nanómetros. Inicialmente, la reducción conduce a la formación de átomos de plata (Ag^0) y su posterior agregación en grupos oligoméricos, lo que conduce a la formación de partículas de Ag. Las AgnP's más pequeñas, tienen un área mayor de superficie disponible para la interacción con las células microbianas, resultando en un mejor efecto bactericida en comparación con partículas de plata más grandes [7].

La nanotecnología en la medicina, es un campo emergente de investigación interdisciplinaria, que permite modificar las propiedades de los materiales

mediante el cambio en el tamaño de las partículas a escalas nanométricas, ofreciendo propiedades atractivas para la aplicación en la detección, en el diagnóstico y en el tratamiento de diversas enfermedades. Estudios recientes han mostrado que la plata en forma de nanopartículas es altamente efectiva como agentes antimicrobial contra bacterias y virus; incluyendo el VIH [10,11].

5.2 Plata

En la tabla periódica podemos encontrar a la plata como parte de los metales nobles. Es un elemento químico de número atómico 47, situado en el grupo Ib. Su símbolo es Ag (procede del latín: *argentum*). Es un metal de transición blanco, brillante, blando, dúctil, maleable y es el mejor conductor metálico del calor y la electricidad. Tiene una densidad de 10490 kg/m^3 y una estructura cristalina cúbica centrada en las caras. Se encuentra en la naturaleza formando parte de los distintos minerales (generalmente en forma de sulfuro) o como plata libre. Desde el punto de vista químico, es un material poco reactivo; se disuelve en ácidos oxidantes y puede presentar estados de oxidación +1, +2 y +3, siendo el más común el estado de oxidación +1. En su estructura atómica presenta 5 niveles de energía con 2, 8, 18, 18 y 1 electrones en cada uno de ellos, respectivamente. El 95% del consumo mundial anual de plata es para usos industriales, fotografía, joyería y ornamentales; aunque con el avance de la tecnología, están tomando importancia sus usos eléctricos, mecánicos, ópticos y médicos. Se encuentra a niveles menores de 0.000001 mg/m^3 de aire, 0.2-2.0 ppb en aguas superficiales como lagos y ríos, así como a niveles de 0.20-0.30 ppm en suelo en los sitios de fuente natural [12].

Sin embargo, es preciso mencionar que este elemento ha sobresalido de entre los otros por tener propiedades únicas dentro de las cuales podemos mencionar sus propiedades magnéticas, ópticas, eléctricas y catalíticas, sin olvidar también su papel dentro de la biomedicina como agente conservador, antimicrobiano, etc. La plata en forma de nanopartículas posee también

propiedades biocidas o antimicrobianas y han encontrado aplicaciones diversas en áreas como la farmacología, medicina, industria alimentaria, purificación de agua, entre otras. [12].

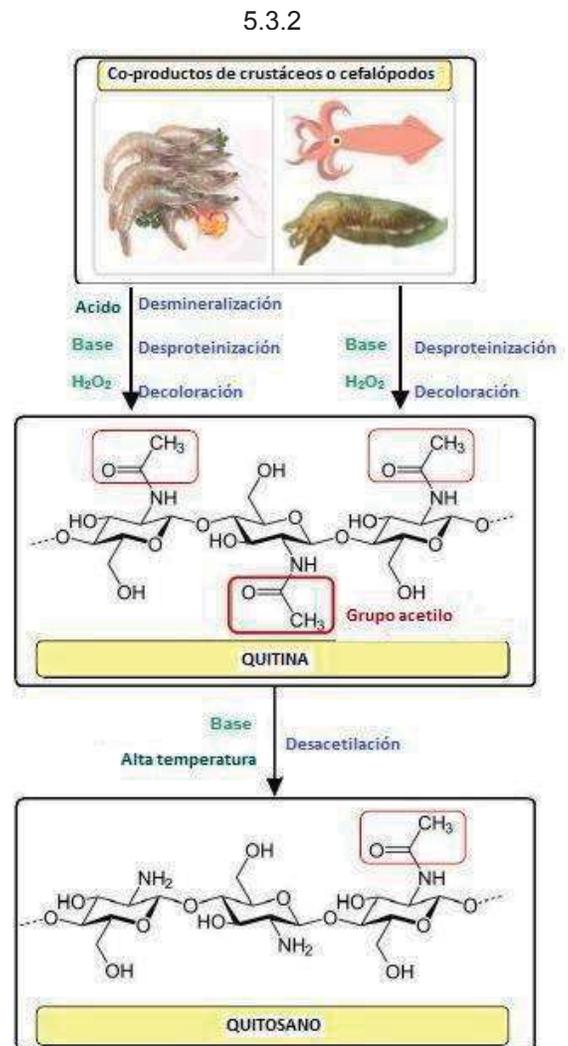
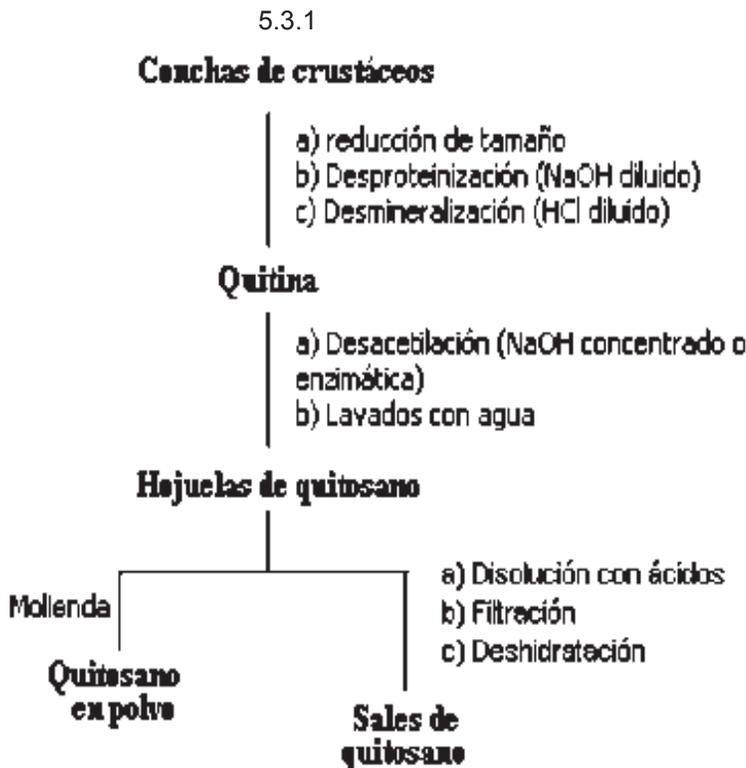
El historial de la plata como agente microbicida de amplio espectro, lo sitúan como uno de los candidatos a ser el arma fundamental en la lucha contra cepas resistentes a los antibióticos de uso común [13].

Se conoce desde la antigüedad que la plata prevenía enfermedades. Como un ejemplo, se sabe que el ejército de Alejandro Magno añadía monedas de plata a sus almacenes de agua para mantenerla pura, y la clase noble de épocas posteriores almacenaban agua en contenedores de plata y comían con utensilios fabricados de este metal. Posteriormente, durante el siglo XIX, se encontró que el nitrato de plata, una de las sales de este metal, ayudaba en la cicatrización y prevención de infecciones en quemaduras y heridas. Este uso del nitrato de plata sigue vigente en la actualidad. En la época moderna diversos compuestos de plata se venden en el mercado en forma de suplementos naturales para combatir infecciones. En los hospitales, uno de los compuestos que se usa con frecuencia es el nitrato de plata en soluciones diluidas, el cual se aplica en los ojos de recién nacidos para evitar posibles infecciones.

5.3 Quitosano

La quitina (del griego *tunic*, envoltura) es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza después de la celulosa, su denominación sistemática es β -(1-4)-2-acetamido-2-desoxi-*D*-glucosa. Se encuentra como componente íntegro en el exoesqueleto de algunos insectos así como en sus alas (por ejemplo cucarachas y escarabajos), paredes celulares de varios hongos, levaduras y algas, también podemos encontrar el biopolímero como parte de las conchas de algunos crustáceos [14].

El quitosano también es un polisacárido que en estado natural lo podemos encontrar en las paredes celulares de algunos hongos; sin embargo, su principal fuente de producción es la desacetilación de la quitina (Figuras 5.3.1 y 5.3.2). El proceso se basa prácticamente en el tratamiento de las conchas de diversos tipos de crustáceos como camarones, langostas, cangrejos y krill debido a la facilidad con la que se pueden encontrar estos materiales (principalmente como desecho de las plantas procesadoras de estas especies) [14]. Sin embargo, la extracción del polímero se ve limitada, debido a la escasez del material residual en ciertas temporadas del año o tiempos de veda, por esta razón, se utilizan fuentes de partida no convencionales como los hongos. El micelio de varias especies de hongos, como en el caso de *Mucorrouxii*, *Absidiacoerulea*, *Rhizopusorizae*, y *Aspergillus niger* ha sido empleado como fuente alternativa para la obtención de quitosano [15].



Figuras 5.3.1 y 5.3.2. Proceso de obtención de quitina y de quitosano.

Este biopolímero fue descubierto por Rouget en 1859, quien encontró que al tratar quitina con una solución caliente de hidróxido de potasio (KOH) se obtenía un producto soluble en ácidos orgánicos. Esta “quitina modificada”, como Él la llamó, se tornaba de color violeta en soluciones diluidas de yoduro y ácido, mientras la quitina era verde. Más tarde, en 1894, fue estudiada por Hoppe-Seyler quién la denominó “quitosano” (también se conoce como quitosana en algunos lugares, chitosan en inglés) [17].

Cuando se realiza una desacetilación completa de la quitina se produce un material soluble en medio ácido denominado quitano; sin embargo, una desacetilación parcial de este polímero (desacetilación del grupo amino del carbono 2) forma una mezcla de cadenas que tienen distintas proporciones de unidades β -(1-4)-2-acetamido-2-desoxi-*D*-glucosa y β -(1-4)-2-amino-2-desoxi-*D*-glucosa [16]. Por lo tanto, podemos definir al quitosano como un copolímero formado por cadenas lineales de 2-acetamido-2-desoxy-*D*-glucosa y 2-amino-2-desoxy-*D*-glucosa unidos por enlaces β -(1-4) (Figura 5.3.3) [17].

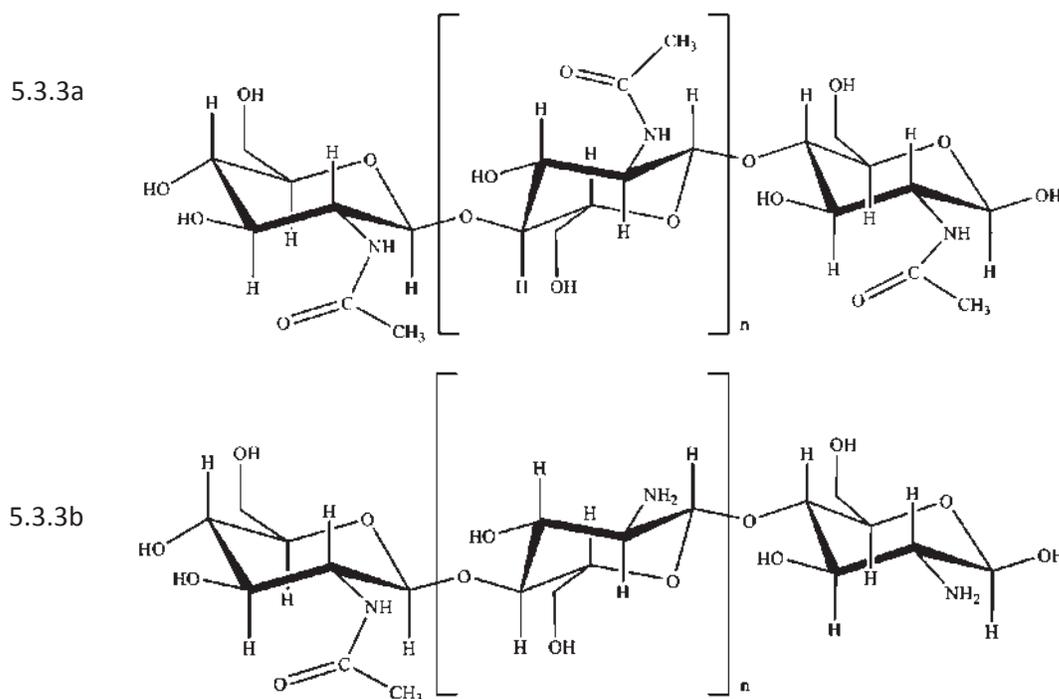


Figura 5.3.3. Estructura de la quitina (5.3.3a) y del quitosano (5.3.3b).

La denominación química, según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC en inglés), es 2-amino-2-desoxi-*D*-glucopiranososa [(*D*-glucosamina (GlcN))] y 2 acetamida-2desoxi-*D*-glucopiranososa *N*-acetil glucosamina.

El método principal de obtención de quitosano es llevado a cabo mediante una *N*-desacetilación alcalina de la quitina en la cual es eliminado como mínimo un 50% de sus grupos acetilo (Figura 5.3.4), (aunque también existe una vía enzimática y otra ácida). Comúnmente se utiliza una solución concentrada de hidróxido de sodio (NaOH) o de potasio (KOH) al 40 o 50 % y con una temperatura de 100 °C o más, consiguiendo así la hidrólisis parcial o completa de los grupos acetilos del polisacárido [18].

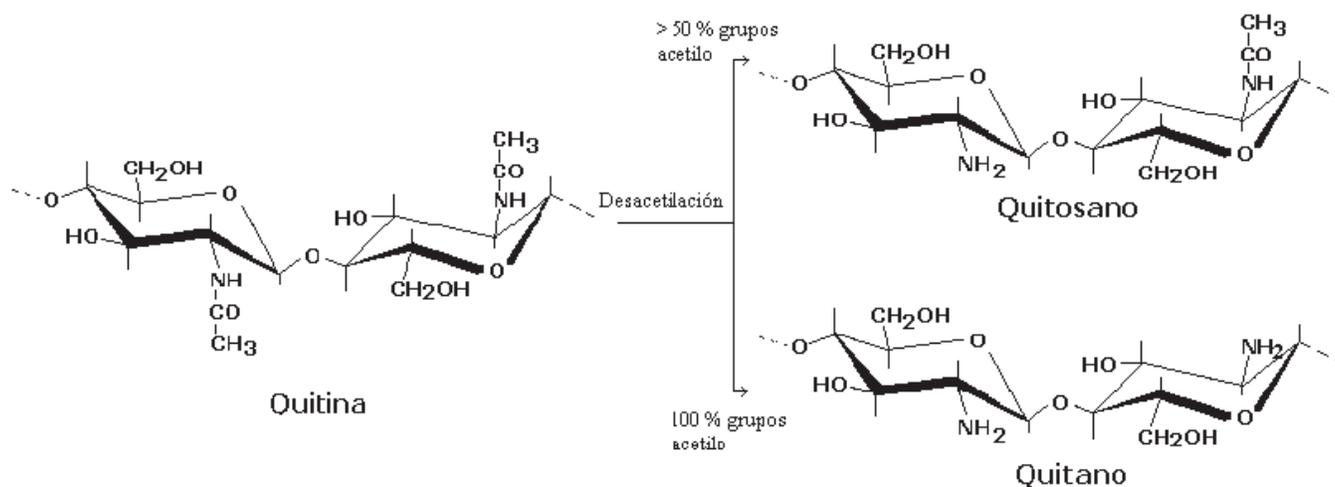


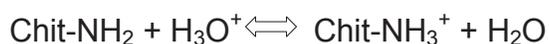
Figura 5.3.4. Formación de quitosano a partir de la desacetilación de la quitina.

5.3.1 Características Físicoquímicas del Quitosano

La fuente y el método de obtención determinan la composición de las cadenas de quitosano y su tamaño. Por este motivo, el grado de desacetilación y el peso molecular promedio son dos parámetros de obligado conocimiento para la caracterización de este polímero (el quitosano es un polímero formado por

unidades repetidas de *D*-glucosamina, por lo que la longitud de la cadena y, por lo tanto, su peso molecular, es una característica importante de la molécula), aunque la cristalinidad, el contenido de agua, cenizas y proteínas también son características físicoquímicas a considerar para la aplicación de un quitosano específico [17]. Una diferencia en las propiedades puede llegar a ser notable, como por ejemplo la distinta solubilidad en medio acuoso que puede llegar a tener el biopolímero.

El quitosano tiene un contenido de nitrógeno (N) mayor al 7% y posee una distribución regular de los grupos aminos libres. El porcentaje de grupos amino que quedan libres en la molécula de quitosano es lo que se denomina grado de desacetilación y está estrechamente vinculado con su solubilidad, estos grupos pueden ser protonados por ciertas soluciones ácidas cargándose positivamente lo que le confiere un comportamiento de policación como podemos observar de acuerdo a la siguiente ecuación [18,19]:



Como consecuencia de la hidrólisis del grupo *N*-acetilo, aumenta la capacidad hidrofílica del quitosano y pasa a ser soluble en soluciones ácidas diluidas (acético, fórmico, clorhídrico, entre otros) ya que el pKa del grupo amino del quitosano es de 6,3 a 7 [20], por lo tanto la solubilidad de la mayoría de las preparaciones de quitosano disminuye bruscamente cuando el pH de la solución se eleva sobre 6,0 a 6,5. La protonación de los grupos amino del quitosano en medio ácido le confiere un carácter altamente reactivo; este hecho permite explicar algunas propiedades del quitosano como son: la habilidad de enlazarse con sustancias cargadas negativamente tales como lípidos, proteínas, colorantes, entre otras; así como su comportamiento como floculante, adherente y adsorbente, adicionales a las reacciones típicas de las aminas. Una propiedad importante del quitosano es su estructura rígida, caracterizada por numerosos enlaces por puentes de hidrógeno, la cual le confiere una buena estabilidad

térmica. El quitosano se descompone aproximadamente a 170 °C y se degrada antes de fundir, lo cual es característico de polisacáridos que poseen muchos enlaces por puentes de hidrógeno.

La distinción entre la quitina y el quitosano es discutida; algunos mantienen que la quitina con más de un 50 % de desacetilación debe ser considerada quitosano mientras otros definen al quitosano como soluble en ácido acético al 1% [19], e incluso algunos investigadores la definen como tal con un grado de desacetilación superior al 60 %. Usualmente en el caso de los quitosanos el grado de desacetilación se encuentra comprendido entre 60-98 %; sin embargo, también se ha reportado que para lograr una mayor actividad biológica, el contenido de los acetilos debe encontrarse alrededor de un 40 % [18].

5.3.2 Propiedades del Quitosano

El quitosano tiene un potencial de aplicación en varias áreas (Figura 5.3.2.1), tanto de la salud como industriales, en la ganadería, cosmética, tratamiento de aguas, alimentos, farmacéutica, biotecnológica, en el medio ambiente, entre otras. Algunas de las propiedades de este material que le han permitido estar dentro de estas áreas son la biodegradabilidad, biocompatibilidad, mucoadhesión, capacidad filmogénica, hemostático, promotor de absorción, actividad antimicrobiana, actividad anticolesterolémica y antioxidante.

En la biomedicina es muy utilizado debido a su actividad inmunoestimuladora, propiedades anticoagulantes, acción antibacteriana y antifúngica así como por su acción como promotor de la cicatrización de heridas.

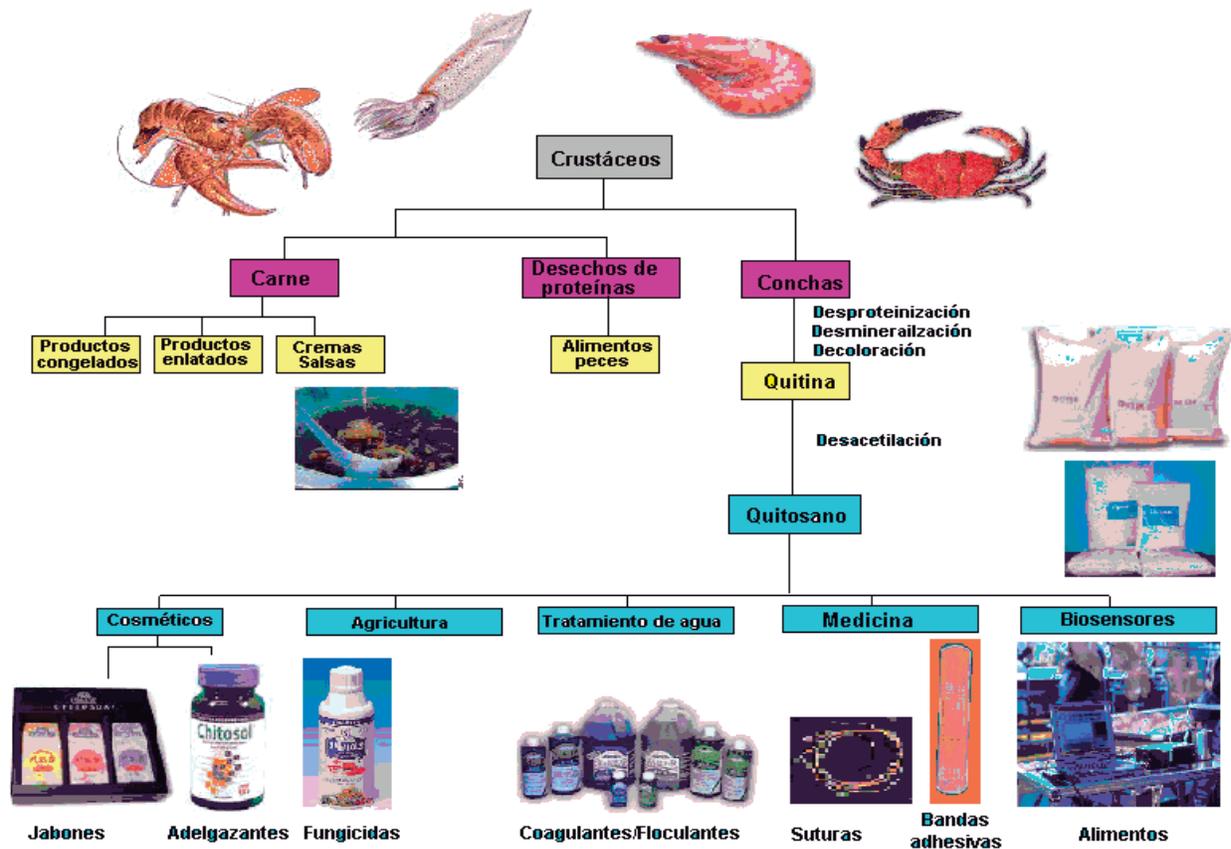


Figura 5.3.2.1. Algunas aplicaciones del quitosano.

Muchos estudios se han enfocado al análisis de su actividad antibacteriana ya que esta propiedad resulta ser muy atractiva dentro de las áreas ya mencionadas; el quitosano inhibe el crecimiento de una amplia variedad de bacterias. Es un agente antimicrobiano contra un amplio rango de organismos blanco debido a sus propiedades catiónicas que causan un efecto de alteración membranaral [18,21]. Esta actividad varía considerablemente con el tipo de quitosano, el organismo blanco y el medio en el cual es aplicado. Consecuentemente la literatura reporta que la actividad puede variar y es, ocasionalmente, contradictoria. Pero generalmente hablando, las levaduras y los hongos son el grupo más susceptible, seguido por las bacterias Gram positivas y finalmente las Gram negativas.

5.3.3 Películas de Quitosano

El carácter filmogénico del quitosano dio lugar a una de las primeras aplicaciones investigadas de este polímero natural. Es posible formar películas de quitosano con buenas propiedades físicas y mecánicas a partir de sus disoluciones en ácidos diluidos, tales como fórmico, acético o propiónico. Las propiedades filmogénicas del quitosano se deben a la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares entre los grupos amino e hidroxilo de sus cadenas. A pH ácido estos enlaces de hidrógeno se disocian debido a la protonación de los grupos amino y se produce un rápido hinchamiento de la película. En 1974 se plantearon por primera vez dos metodologías generales de trabajo para obtener películas de quitosano [17]; la primera es mediante la evaporación del ácido empleado en la solución de quitosano (método de evaporación de solvente), y la segunda se basa en la preparación directa de quitosano a partir de la película quitinosa de la jibia (molusco cefalópodo). Este último método no resultó eficiente, pues las propiedades mecánicas de las películas obtenidas no fueron las idóneas, por lo cual no es utilizado en la actualidad.

Las posibles aplicaciones de las películas de quitosano se extienden a la medicina, la industria fotográfica, la alimentación y la cosmética. En el campo de la farmacia, las películas de quitosano se han empleado para el recubrimiento de comprimidos y como sistemas de liberación controlada de fármacos. El uso de películas de quitosano para el tratamiento de heridas cutáneas presenta un gran interés puesto que se puede administrar el fármaco de forma localizada y sostenida en el sitio de acción. Se trata de un sistema ventajoso con respecto al uso de cremas, ya que éstas deben ser aplicadas continuamente y son eliminadas con facilidad. Se ha descrito el uso de películas de quitosano para el vendaje de heridas cutáneas y películas con minociclina para el tratamiento de quemaduras en ratas. Las películas de quitosano resultan efectivas porque protegen la herida, absorben el exudado, tienen acción antibacteriana y favorecen la cicatrización de heridas al estimular la proliferación de fibroblastos. Por otro lado, también se han

realizado estudios de citotoxicidad del quitosano en células cutáneas como queratinocitos y fibroblastos, estudios importantes para este tipo de aplicación y se ha comprobado que no presenta citotoxicidad *in vitro*. El carácter hemostático del quitosano ha promovido su utilización en parches y vendajes hemostáticos. Prueba de ellos es la comercialización de varios productos de este tipo a base de quitosano por parte de la empresa *HemCon Medical Technologies INC* [17].

Una película antimicrobial nanocompuesta es particularmente deseable debido a su integridad estructural aceptable y a las propiedades de barrera impartidas por la matriz de nanocompuestos así como las propiedades antimicrobianas aportadas por los agentes antimicrobianos naturales impregnados dentro. Los materiales en el rango de la nanoescala tienen un rango mayor de superficie-volumen en comparación con sus homólogos de la microescala. Esto permite que los nanomateriales sean capaces de atacar más copias de moléculas biológicas, lo cual les confiere una mayor eficiencia [7].

Los nanocompuestos más comunes utilizados en las películas de antimicrobianos se basan en la plata, que es bien conocida por su fuerte toxicidad para una amplia gama de microorganismos, con una temperatura alta estable y baja volatilidad. Algunos mecanismos han sido propuestos para las propiedades antimicrobianas de las nanopartículas de plata (AgnP's) tales como: adhesión a la superficie celular, degradación de lipopolisacáridos y formación de "grietas" en las membranas, aumentando en gran parte la permeabilidad, la penetración en el interior de la célula bacteriana, dañando el ADN, y la liberación de los iones de plata antimicrobianos debido a la disolución de las AgnP's. Otras investigaciones afirman que la actividad antimicrobiana de polímeros basados en plata depende de la liberación de iones plata, que se unen a grupos donantes de electrones en las moléculas biológicas que contienen azufre (S), oxígeno (O) o nitrógeno (N).

5.3.4 Bionanocompuestos

Los materiales complejos constituidos por dos o más fases sólidas reciben comúnmente el nombre de materiales compuestos (compósitos o "composites" en inglés), siendo los más comunes aquellos constituidos por un polímero orgánico que constituye la fase continua (matriz) y un sólido inorgánico como fase dispersa que actúa como agente o carga reforzante del polímero [22]. El resultado de la interacción entre ambos componentes orgánico e inorgánico es un efecto sinérgico que conduce a la mejora de las propiedades del material con respecto a las que muestran los componentes de forma individual. Cuando la fase dispersa presenta al menos una dimensión en la escala nanométrica, estos materiales híbridos de naturaleza orgánico-inorgánica se denominan "nanocomposites ó nanocompuestos". La nanoestructuración de los componentes incrementa el número de interacciones a nivel nanométrico entre el polímero orgánico y el sólido inorgánico, dando lugar a materiales con propiedades estructurales muy superiores a las de los microcompuestos.

Los materiales denominados bio-nanocompuestos constituyen un novedoso grupo de compuestos de naturaleza híbrida orgánico-inorgánica basados en el ensamblaje entre polímeros de origen natural y sólidos inorgánicos a través de interacciones a escala nanométrica entre ambos componentes [22]. Al igual que los nanocompuestos convencionales basados en polímeros sintéticos, poseen interesantes propiedades mecánicas, térmicas y de barrera al paso de gases, incorporando además el carácter biocompatible y biodegradable asociados al biopolímero. Por ello, estos materiales de naturaleza bio-nanohíbrida pueden recibir aplicación como bioplásticos para el envasado de alimentos, como implantes y sistemas dispensadores de fármacos en biomedicina, e incluso como componentes en dispositivos electroquímicos del tipo de los sensores selectivos y los biosensores cuando el material presenta también otras propiedades funcionales adecuadas.

Dependiendo de las propiedades aportadas por el polímero o por el sólido inorgánico, estos materiales híbridos nanoestructurados pueden presentar también propiedades funcionales adecuadas para muy diversas aplicaciones como catalizadores heterogéneos, componentes de sensores químicos y en dispositivos ópticos, opto-electrónicos, magnéticos y electroquímicos.

En el caso de materiales compuestos con CS y AgNP's, las funciones están siendo enfocadas a la creación y aplicación de compuestos capaces de combatir microorganismos patógenos en general y de esta manera proponer medios alternos menos costosos y menos dañinos a la sociedad y al medio ambiente.

5.3.5 Síntesis de Compuestos CS/AgNP's

Generalmente los polímeros con nanopartículas metálicas pueden obtenerse añadiendo el metal precursor a una solución de polímero seguida por la reducción del metal precursor mediante un agente reductor o por termólisis, también se pueden formar nanopartículas si el metal precursor es añadido durante la polimerización con la subsecuente reducción, o la polimerización de un coloide de nanopartículas metálicas en una solución monómerica [23].

Otra propuesta para la síntesis de nanopartículas de Ag cubre tres temas de investigación importantes: 1) la reducción química de los precursores del metal por un agente reductor tal como NaBH_4 , $\text{HOC}(\text{COONa})(\text{CH}_2\text{COONa})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y $\text{C}_6\text{H}_7\text{NaO}_6$. 2) La irradiación de la solución que contiene iones metálicos con luz ultravioleta o visible, la irradiación de microondas y el ultrasonido. 3) La utilización de biomoléculas y organismos, tales como bacterias, proteínas y polisacáridos, para la síntesis de nanopartículas de Ag [24].

Se ha propuesto también una ruta fácil para la síntesis de cristales y nanopartículas de Ag basada en quitosano en condiciones quiescentes (en reposo). Esta es también la primera preparación de nanopartículas de Ag por

reducción de la plata catiónica utilizando al quitosano polisacárido policatiónico. La ruta combina la primera preparación de la mezcla de reacción compuesta del metal precursor (AgNO_3 o HAuCl_4) y CS, y luego se deja en reposo durante la reducción a la temperatura designada. Las nanopartículas Ag resultantes son estables y muestran propiedades estructurales y ópticas controlables [24].

Existen en la actualidad, varias publicaciones las cuales han mostrado como una combinación de quitosano y plata pueden mejorar las propiedades antimicrobianas de ambos compuestos. Por mencionar algunos casos encontramos que Cao *et al.* [25] prepararon nanocompuestos de plata-quitosano los cuales inhibieron el crecimiento de *S. aureus* y *E. coli* y propusieron estos materiales como revestimientos para aplicaciones de ingeniería biomédica y el envasado de alimentos. Díaz-Visurraga *et al.* [25] prepararon películas de plata-quitosano que resultaron eficaces contra *S. aureus*, y las propusieron para el envasado de alimentos. Fu *et al.* [25] prepararon películas multicapa que contienen nanopartículas de plata y quitosano utilizando una construcción alternativa “capa por capa”, y estas películas fueron eficaces para matar *E. coli* y fueron propuestas para el revestimiento de implantes cardiovasculares.

Otros estudios muestran resultados prometedores como los de Franck Furno *et al.* [26] que en el 2004 sintetizaron un biomaterial empleando condiciones supercríticas para impregnar nanopartículas de plata sobre silicona obteniendo nanopartículas de 10 a 100 nm, evaluaron sus propiedades antibacterianas en *S. epidermis* mediante la técnica de la difusión por disco y obtuvieron diámetros de 15 mm de inhibición.

En el 2009, K. Mandhumathi *et al.* [27] prepararon nanofibras de quitina en combinación con nanopartículas de plata y determinaron que el material sintetizado era efectivo contra las bacterias *E. coli* y *S. aureus*. También prepararon hidrogeles de 0.003%, 0.004% y 0.005% de concentración de nanopartículas de plata sobre las nanofibras de quitosano y lograron depositar

nanopartículas de 5 nm. Analizaron la actividad antibacteriana contra *S. aureus* y *E. coli* y obtuvieron diámetros de inhibición de 16 a 18 y de 19 a 21 mm respectivamente [27]. Niu Mei *et al.* [28], reportaron la preparación de compuestos integrados por nanopartículas de plata, óxido de silicio y quitosano, demostrando que eran más resistentes a las bacterias *E. coli* y *S. aureus* en comparación con sus componentes individuales. Rangrong Yoksana *et al.* [29] sintetizaron nanopartículas de plata en una solución de quitosano usando radiación gama, obteniendo tamaños de partícula de 7 a 30 nm y además probaron sus características antibacterianas y encontraron una inhibición por el método de caldo de cultivo de 0.308 al 0.354% en volumen para *E. coli* y de 0.079 a 0.092% en volumen de inhibición para *S. aureus*.

En el 2010, Zofia Modrzejewska y colaboradores [30] describieron la síntesis de nanopartículas de plata en una solución de quitosano tomando ventaja de la habilidad del quitosano de formar acetatos en presencia de iones metálicos, logrando obtener nano partículas de 50 nm a 2µm [30].

En el 2011, el grupo de investigación de Mónica Potara y colaboradores [2] reportaron la síntesis de nanopartículas de plata sobre quitosano con un tamaño de 43 a 55 nm y demostraron que la combinación de quitosano y nanopartículas de plata es más eficiente contra la bacteria *S. aureus* que cada uno de los componentes de forma individual. N. Saifunddin *et al.* [31] prepararon un compuesto integrado por nanopartículas de plata impregnadas sobre una matriz de quitosano usando radiación de microondas logrando remover un 94% del pesticida Atrazina en soluciones acuosas con una concentración de 10 mg/L con este material.

En el 2012, K.S.V. Krishna Rao *et al.* [32] sintetizaron un nanocompuesto integrado de nanopartículas de plata depositadas sobre una matriz de quitosano y poli etilenglicol. Ellos evaluaron la bacteria *E. coli* y encontraron diámetros de inhibición de 8 a 11 mm, mucho mayores que las del quitosano individual. Recientemente Ricardo J.B. Pinto *et al.* [33] sintetizaron un nanocompuesto

integrado por películas de quitosano con nanopartículas de plata, teniendo tamaños de partícula de 16 nm, además evaluaron las propiedades antimicrobianas de este material en *S. aureus*, *K. pneumoniae* y *E. coli*, utilizando concentraciones de 0.47%, 1.1%, 2.58% y 3.94% de nanopartículas de plata encontrando diámetros de inhibición de 0, 1.5, 1.7 y 2 mm respectivamente para las concentraciones evaluadas de todas las bacterias.

Como puede observarse, las investigaciones en torno a bionanocompuestos quitosano/nanopartículas de plata se han centrado en la síntesis y caracterización de su capacidad antibacteriana, sin embargo, es necesario tener una caracterización integral de estos compuestos relacionando su dinámica molecular con el efecto antibacteriano y su comportamiento macroscópico. El análisis del efecto de la inclusión de las nanopartículas de plata al quitosano sobre su dinámica molecular, conductividad y su capacidad de absorción de humedad, puede dar información acerca de su capacidad antibacteriana.

5.3.6 Caracterización de Compuestos CS/AgnP's

Entre los métodos y/o equipos más comunes de identificación y caracterización de compuestos CS/AgnP's reportados podemos mencionar al Microscopio Electrónico de Barrido (SEM), Microscopio Electrónico de Transmisión, Espectroscopía de Absorción Molecular UV-Vis y Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR). Para verificar los cambios estructurales de la partículas se utilizan el Análisis Termogravimétrico (TGA) o la difracción de rayos X (X-RD) y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) [34].

Sin embargo, existen dos métodos de caracterización poco utilizados, los cuales han sido escasamente reportados en el caso de estos compuestos: la Espectroscopía de Impedancia Eléctrica (EIE) y el Análisis Dinámico Mecánico (DMA). Estas técnicas, involucran el estudio de la dinámica molecular de los polímeros y sus compuestos, con lo que es posible establecer relaciones entre la

naturaleza de sus procesos de relajación y las propiedades macroscópicas. De esta forma, es posible conocer más ampliamente el comportamiento de los materiales con la finalidad de predecir o controlar su comportamiento bajo condiciones de temperatura y esfuerzos específicos, y de esta forma optimizar sus parámetros de aplicación y síntesis.

La Espectroscopía de Impedancia Eléctrica (EIE) es una técnica de análisis que permite la caracterización eléctrica de materiales no conductores en relación a su estructura. Estos materiales pueden caracterizarse a través de esta técnica relacionando el movimiento molecular al perturbarse la muestra con un campo eléctrico. También es conocida como Espectroscopía Dieléctrica (DS).

Dentro de sus características tenemos que permite observar las respuestas dieléctricas de eventos moleculares lentos (baja frecuencia) y/o rápidos (alta frecuencia, también permite identificar procesos de relajación tipo α , β , γ , etc.; y los datos dieléctricos se obtienen por medio de los “Espectros Dieléctricos” donde se pueden representar la conductividad (σ), el tiempo de relajación (τ) y otros parámetros útiles para la interpretación de dinámicas moleculares.

Por su parte, el Análisis Dinámico Mecánico (DMA), es una técnica donde una pequeña deformación cíclica es aplicada a una muestra. Es una de las técnicas de análisis térmico más utilizada y más potente para el estudio de la influencia de la estructura molecular sobre las propiedades físicas de los polímeros. Permite estudiar la estructura y propiedades mecánicas de los sólidos y líquidos viscoelásticos a través de su Módulo mecánico y de amortiguamiento. El factor de amortiguamiento ($\tan \delta$) es el parámetro que evalúa la razón de disipación de energía respecto del almacenamiento de la misma por ciclo y se asocia con la pérdida parcial de la estructura polimérica cuando se aplica un esfuerzo dinámico [35].

6. MATERIALES Y METODOLOGÍA

6.1 Preparación de Películas CS/AgnP's

Se empleó quitosano (CS) de peso molecular medio (M_w 150.000 g/mol) y 82% de grado de desacetilación, indicado por el proveedor, Sigma-Aldrich®. El polvo de nanopartículas de plata (AgnP's) recubierto con carbono, 25-nm de tamaño promedio de partícula, se adquirió de Nanotechnologies® y el ácido acético p. eb. 117.9°C de Baker® se utilizó tal y como se recibió. Las películas de CS/AgnP's se obtuvieron mediante la disolución de 1% peso de CS respecto de una solución acuosa al 1% peso de ácido acético. Esta disolución se agitó mecánicamente durante 24 horas para promover la disolución y se vertió en una caja de petri para la evaporación del solvente a 60°C. De esta forma se obtiene una película delgada de CS puro.

Debido a la técnica de preparación, las películas de CS tienen el grupo amino protonado (grupos $R-NH_3^+$) y en este estado, el CS se llama quitosano acetato. Es importante mencionar que estas películas CS/AgnP's se encuentran en su estado no neutralizado. Para neutralizar las películas se emplea una solución acuosa de NaOH 0,2 M en la cual se sumergen las películas por 30 minutos, seguido de varios ciclos de lavado con agua destilada hasta alcanzar un pH de 7. De esta forma se obtienen las películas neutralizadas de quitosano. Es este trabajo se analizaron películas neutralizadas como no neutralizadas para determinar la influencia de los grupos amino protonados sobre su dinámica molecular y la actividad antibacteriana.

La cantidad correspondiente de polvo de AgnP's (1, 3, 5 y 10% en peso respecto al CS base seca) se vertió en una solución acuosa de ácido acético al 1% en peso, se agitó mecánicamente durante 30 minutos y se sonicó a temperatura ambiente durante otros 30 minutos más para obtener la solución homogénea de nanopartículas. Posteriormente, la película de CS puro preparada anteriormente se disolvió mecánicamente en la solución homogénea de AgnP's y se sonicó

durante 10 minutos a temperatura ambiente para eliminar la formación de burbujas. Las películas de CS/AgnP's se prepararon mediante el método de evaporación de solvente vertiendo la solución final en una caja Petri de plástico para posteriormente permitir que el disolvente se evapore durante 24 horas a 60°C.

Las películas de compuestos de CS así como de los compuestos CTS/AgnP's obtenidas por el método de evaporación de solvente, son materiales estables, flexibles con espesores aproximados a 30 μm . La incorporación de diferentes concentraciones de nanopartículas produce cambios de tonalidad que van desde transparente para el quitosano puro (a) hacia gris CS/AgnP's 1% (b), gris oscuro CS/AgnP's 3% (c) y negro CS/AgnP's 10% (d) como se observa en la figura 6.1.1

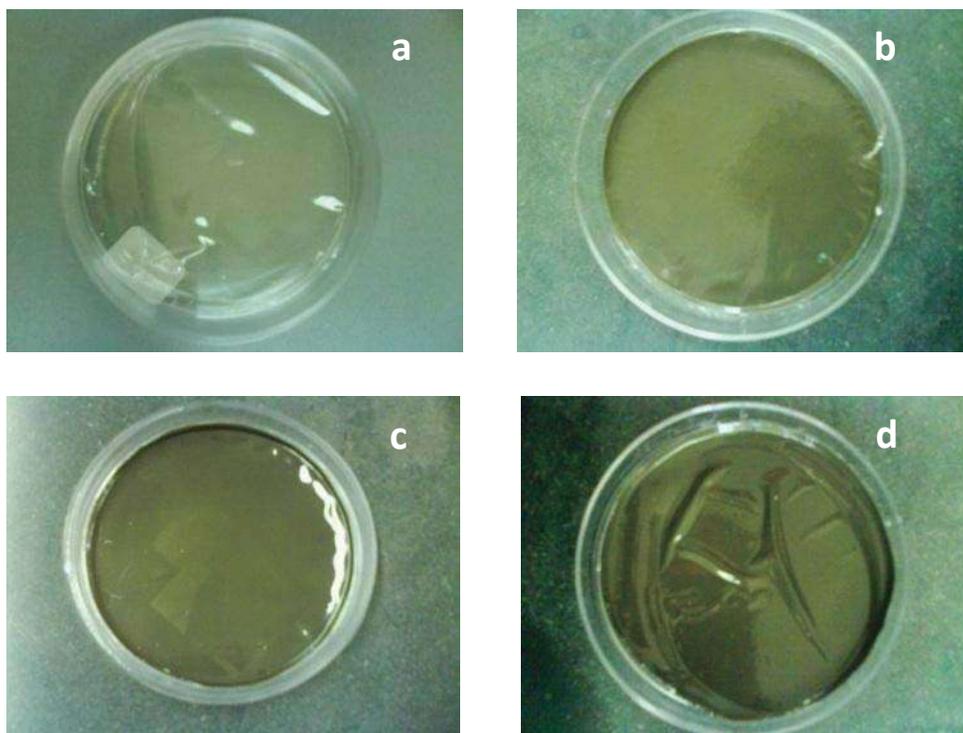


Figura 6.1.1. Tonalidad de las películas respecto a la concentración de AgnP's.

6.2 Análisis Dinámico Mecánico (DMA)

El Análisis Dinámico Mecánico se llevó a cabo en un equipo TA Instruments modelo RSAIII, a una velocidad de calentamiento de 5°C/min y una frecuencia de 0.1 Hz en una atmósfera de aire seco de 20°C a 300°C. Este análisis se realizó sobre películas con dimensiones de 10 cm de largo x 1 cm de ancho aproximadamente

6.3 Espectroscopía Dieléctrica (DS)

Las mediciones dieléctricas se realizaron en un intervalo de frecuencia de 0.1 Hz a 1 MHz empleando un analizador de impedancia Solartron 1260 con una interface de impedancia 1294 de 100 Hz-110MHz y un analizador de impedancia Agilent Precision Impedance Analyzer 4294a. La amplitud de la señal de medición es 100 mV y se emplea una celda en conjunto con un microprocesador Watlow Series 982 con un controlador de rampa de temperatura para las mediciones dieléctricas de 20 a 300°C. Previo a las mediciones dieléctricas se deposita por medio de una técnica de sputtering (deposición al vacío) una película delgada de oro en ambas caras para fungir como contactos y así formar un capacitor. Las mediciones dieléctricas se realizan sobre rectángulos pequeños (4mm x 5mm aproximadamente) de estas películas depositadas cada 5°C y cada muestra permanece a la temperatura de medición durante 3 minutos previo a la medición para asegurar el equilibrio térmico.

6.4 Modulo Dieléctrico

Generalmente en compósitos con inclusiones conductoras, corriente iónica y polarización interfacial, a menudo se pueden ocultar los procesos reales de relajación en la zona de baja frecuencia. Sin embargo, para analizar los procesos dieléctricos a detalle, la permitividad compleja ϵ^* es convertida al Módulo eléctrico complejo por medio de la siguiente ecuación:

$$M^* = 1/\epsilon^* = M' + iM'' = [\epsilon' / (\epsilon'^2 + \epsilon''^2) + i \epsilon'' / (\epsilon'^2 + \epsilon''^2)]$$

Donde M' es la parte real y M'' es la parte imaginaria del Módulo dieléctrico, ϵ' es la parte real y ϵ'' es la parte imaginaria de la permitividad.

La interpretación de los datos experimentales en esta forma es el método más comúnmente empleado en la actualidad para obtener información acerca de los procesos de relajación en materiales con conductividad iónica y compuestos poliméricos con inclusiones de nanopartículas.

En esta representación, la polarización interfacial y las contribuciones de los electrodos no se toman en cuenta ya que está comprobado que estos factores no alteran el Módulo dieléctrico. El máximo del pico de la parte imaginaria M'' depende de la temperatura y este módulo describe los movimientos iónicos traslacionales. A través del valor de la frecuencia en el máximo del pico de la parte imaginaria del Módulo dieléctrico M'' , se puede obtener el correspondiente tiempo de relajación

$$\tau = \frac{1}{2\pi f_p} \text{ donde } f_p \text{ es la frecuencia en el máximo del mencionado pico.}$$

6.5 Determinación del Contenido de Humedad (Análisis TGA)

El quitosano es un biopolímero que se caracteriza por ser hidrofílico por lo que el contenido de humedad es un factor de gran importancia que debe determinarse en cualquier caracterización ya que el porcentaje de humedad puede afectar drásticamente sus propiedades fisicoquímicas. En nuestro caso, el contenido de agua libre en las películas de quitosano y los compuestos se determinó por medio del Análisis Termogravimétrico (TGA).

La cantidad de agua libre puede ser evaluada por la disminución de peso de la muestra durante el análisis termogravimétrico. Las curvas TGA se obtuvieron usando un aparato Mettler Toledo, modelo TGA/SDTA 851e, utilizando aproximadamente 3mg de muestra y un vial de aluminio bajo atmósfera de argón

con una velocidad de flujo de 75 mL/min. La velocidad de calentamiento se ajustó a 10°C/min. El contenido de humedad se determinó para tres diferentes condiciones; muestras *húmedas*, muestras *tratadas térmicamente a 80°C* y muestras *tratadas térmicamente a 120°C*. Estas tres condiciones de humedad fueron emuladas en el TGA de acuerdo al tratamiento térmico realizado durante las mediciones de impedancia eléctrica y DMA. Por lo tanto, de acuerdo al tratamiento térmico, se manejan tres diferentes contenidos de humedad; muestras *húmedas*; las películas de CS puro y compuestos CS/AgnP's que se encuentran a temperatura y condiciones de humedad ambiente (es decir, sin tratamiento térmico previo), muestras *tratadas térmicamente a 80°C*, estas muestras se sometieron a un tratamiento térmico dentro de la celda de medición, es decir se calentaron hasta 80°C en vacío durante 1 hora dentro de la celda experimental de impedancia, seguido de un enfriamiento a 20°C (manteniendo el vacío). Después de este tratamiento térmico, las mediciones de impedancia se llevan a cabo desde 20°C hasta 250°C. Finalmente, se tienen las muestras *tratadas térmicamente a 120°C*, a las cuales se les realizó el mismo ciclo de calentamiento-enfriamiento que las muestras anteriores, pero el primer calentamiento fue a 120°C. A esta temperatura, se presenta la eliminación completa del agua (con lo cuál el contenido de humedad es prácticamente cero), antes de las mediciones de impedancia (etiquetados como películas secas). Después de este acondicionamiento, las mediciones de impedancia se llevan hasta 250°C. Este tiempo y temperatura de calentamiento fueron elegidos debido a que el calentamiento adicional no tiene un cambio significativo en el material de resistividad. Este cambio está relacionado con el contenido de agua obtenido a partir de las mediciones TGA [36], por lo tanto con esto se verifica que el contenido de humedad es cero y la humedad no afecta la respuesta dieléctrica pura del material.

Para las mediciones de DMA, también se realizaron diferentes tratamientos térmicos dentro de la celda experimental bajo flujo de aire seco, con la finalidad de obtener diferentes contenido de humedad; un primer barrido a 80°C (muestras

húmedas llevadas a 80°C), seguido de enfriamiento a 30°C y un segundo barrido a 120°C (muestras del primer barrido llevadas a 120°C y llevadas nuevamente a temperatura ambiente) seguidas de un tercer barrido desde 30°C hasta 350°C. Algunos resultados para muestras de acetato de quitosano (películas húmedas a temperatura ambiente y condiciones de aire) se incluyeron para efectos de comparación.

6.6 Mediciones por Espectroscopía de Infrarrojo y Análisis Morfológico

El análisis químico de compuestos CS/AgnP's se realizó por medio de Espectroscopía Infrarroja Transformada de Fourier (FTIR) en un espectrofotómetro Perkin Elmer utilizando un accesorio de ATR en el intervalo de 4000-650 cm^{-1} , la resolución se ajustó a 4 cm^{-1} y el espectro mostrado tiene una media de 32 barridos.

6.7 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La morfología de las películas CS/AgnP's fue analizada por medio de un Microscopio Electrónico de Barrido de emisión de campo JEOM JSM-7401F.

6.8 Análisis UV-Vis

La detección de nanopartículas metálicas se determinó por medio de un espectrofotómetro UV- Vis Agilent 8453.

6.9 Determinación de la Actividad Antibacteriana de Compuestos CS/AgnP's

Cepas examinadas. Las cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Listeria monocytogenes* (serotipo 4b), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), y *Staphylococcus aureus* (ATCC 8923) resistente a la rifampicina fueron examinadas. Los cultivos madre se mantuvieron a 4°C sobre agar soya-tripticasa (Difco, BectonDickinson, Sparks, MD).

Preparación de los inóculos. Los cultivos fueron transferidos tres veces en intervalos de 24h, previamente, se obtuvieron cultivos de células a partir de 20

h por centrifugación (2g, 15 min, 22°C) y se re-suspendieron en solución salina (0,85% de NaCl).

Inoculación de las películas de nanopartículas de plata. Se obtuvieron asépticamente con un escalpelo esterilizado muestras de pequeños cortes cuadrados de cada película con dimensiones de 1x1 cm. Cada muestra se inoculó con 10 µl (8 log UFC/cuadrado), colocado en el interior de tubos de vidrio estériles, y se incubaron a 22°C durante un máximo de 48h. A las 0, 5, 24 y 48h las películas se retiraron del almacenamiento y se colocaron en tubos que contenían 3 ml de caldo de neutralización Dey-Engley (DE) (pH 7,6; BBL/Difco®) y se homogeneizó utilizando vortex durante 1 min.

Análisis microbiológico. Se analizaron las poblaciones de *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. typhimurium* y *S. aureus* en las películas de CS/AgnP's inoculadas. Las suspensiones celulares se diluyeron en serie en peptona estéril al 0,1% y superficie cubierta (0,1 mL) en agar soya tripticasa suplementado con rifampicina (TSAR, 100 mg/ml). Las placas inoculadas se incubaron a 35°C durante 24h antes de contar las colonias. Se eligieron al azar colonias de cada muestra las cuales se sometieron a una confirmación bioquímica.

7. RESULTADOS

7.1 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Las películas CS/AgnP's obtenidas por el método de evaporación del solvente son estables y flexibles; con un espesor de aproximadamente 30 μm . La Figura 7.1.1 muestra las micrográficas por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM, por sus siglas en inglés) de compuestos CS/AgnP's con 1 y 3% en peso de AgnP's. En ella se puede observar una distribución homogénea de las nanopartículas de plata (partes claras) a lo largo de las películas las cuales se encuentran rodeadas por la matriz biopolimérica. Para las películas de compuestos con 1% en peso de AgnP's (Figura 7.1.1a), no se presentan aglomerados (25 nm, tamaño promedio de partícula), mientras que para las muestras con 3% en peso de AgnP's (Figura 7.1.1b), solo en aproximadamente un 5% en términos de área se pueden observar aglomerados (200 nm, tamaño promedio). Sin embargo, para concentraciones de 5% y 10% en peso de AgnP's, existe una aglomeración significativa produciendo alrededor del 10% y 50% de aglomerados en términos de área con dimensiones de 400 nm y 4000 nm, respectivamente (véase las Figuras 7.1.1c y 7.1.1d). Estos aglomerados podrían afectar drásticamente la dinámica molecular, la conductividad y las propiedades físicas generales del quitosano, en especial su habilidad de absorción del agua, este tema se discute en la siguiente sección.

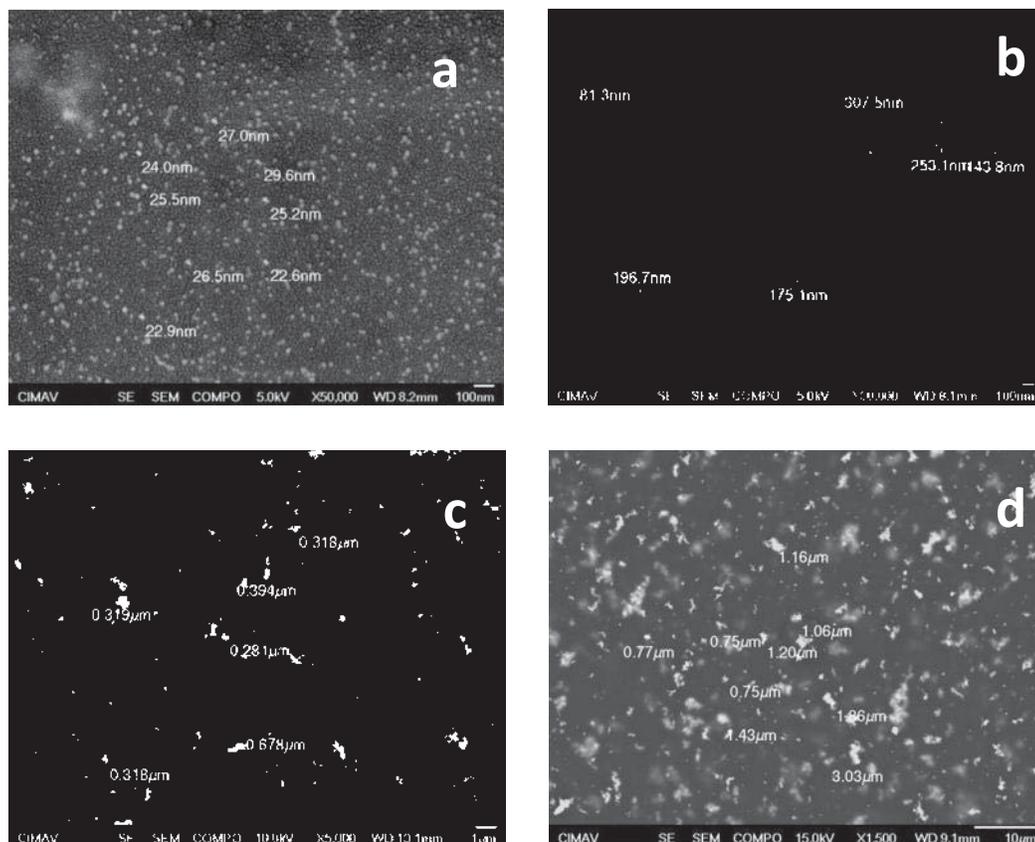


Figura 7.1.1. Tamaño y distribución de AgNP's en las películas de CS.

7.2 Análisis UV-Vis

Los espectros de absorción UV-Vis de películas de CS y películas de compuestos CS/AgNP's se muestran en la Figura 7.2.1. Los picos de absorción de los compuestos CS/AgNP's se obtienen a 407 nm y dependen de la concentración de AgNP's tal y como se puede observar en esta Figura (nótese la ausencia del pico de resonancia de plasmones para el quitosano puro y la perturbación por cargas por encima de 5% en peso de AgNP's). Conforme aumenta el porcentaje en peso de AgNP's, la intensidad del pico de plasmón aumenta y esto se puede observar hasta llevar a un 3% en peso de AgNP's; sin embargo, por arriba de 5% en peso la resonancia de plasmón se distorsiona debido a la presencia de aglomerados, lo que indica que las propiedades de los compuestos CS/AgNP's con concentraciones superiores a 5% en peso de

AgnP's podrían diferir drásticamente de aquellas correspondientes a los compuestos con porcentajes en peso por debajo de este valor debido a que el tamaño de partícula es superior.

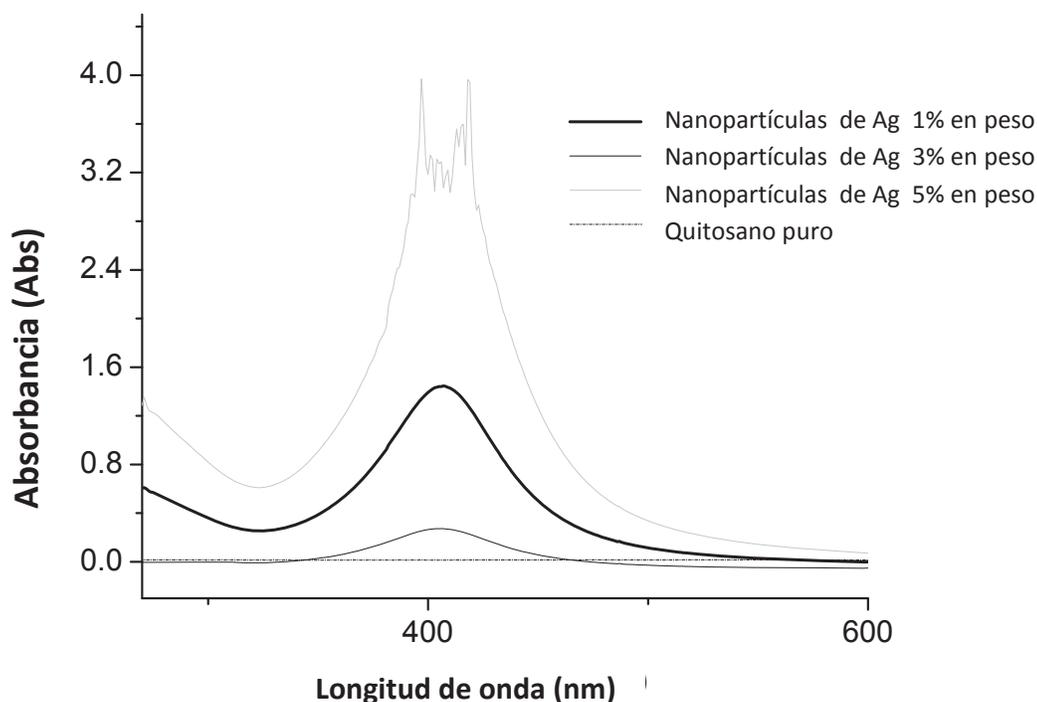


Figura 7.2.1. Espectro UV-Vis para quitosano puro y compuestos CS/AgnP's.

7.3 Interacción Química/Análisis FTIR

El análisis de la interacción química entre el quitosano y las nanopartículas de plata en los compuestos CS/AgnP's fue evaluado por medio de la espectroscopía infrarroja. Los espectros infrarrojos para quitosano puro neutralizado y quitosano no neutralizado así como para compuestos CS/AgnP's 1% en peso y CS/AgnP's 3% de peso se muestran en la Figura 7.3.1. Se puede observar que las vibraciones de estiramiento y flexión correspondientes a los grupos amino e hidroxilo cambian claramente, indicando fuertes interacciones de estos grupos del quitosano con las AgnP's. La banda ancha de vibración a 3000-3500 cm^{-1} corresponde a un estiramiento del grupo OH^- e indica enlaces de hidrógeno intermolecular. En la misma región se superpone la vibración de

estiramiento del grupo -NH_2 . La banda en 1654 cm^{-1} para el grupo amino I, 1594 cm^{-1} para vibraciones de flexión de -NH_2 , 1383 cm^{-1} para el grupo amino III así como las bandas en 1326 y 1261 cm^{-1} para las vibraciones de flexión del grupo OH^- , 1157 cm^{-1} para el estiramiento antisimétrico del puente C-O-C, y finalmente, 1084 y 1028 cm^{-1} para la vibración esquelética de estiramiento del enlace C-O también puede ser identificadas en esta figura. Todas estas bandas tienen cambios significativos de posición, ancho e intensidad, evidenciando que los grupos -NH_2 y -OH del quitosano interactúan con las nanopartículas de plata. Adicionalmente, las bandas en 1654 y 1383 cm^{-1} de los grupos CONH_2 también se desplazan a frecuencias mayores, debido a su interacción con las nanopartículas de plata.

Las interacciones AgnP's- NH_2 , OH^- y CONH_2 implican redistribuciones evidentes de las bandas de vibración de estos grupos. Estas interacciones pueden modificar fuertemente la capacidad de absorción de agua del quitosano y, por lo tanto la T_g del quitosano puro [36].

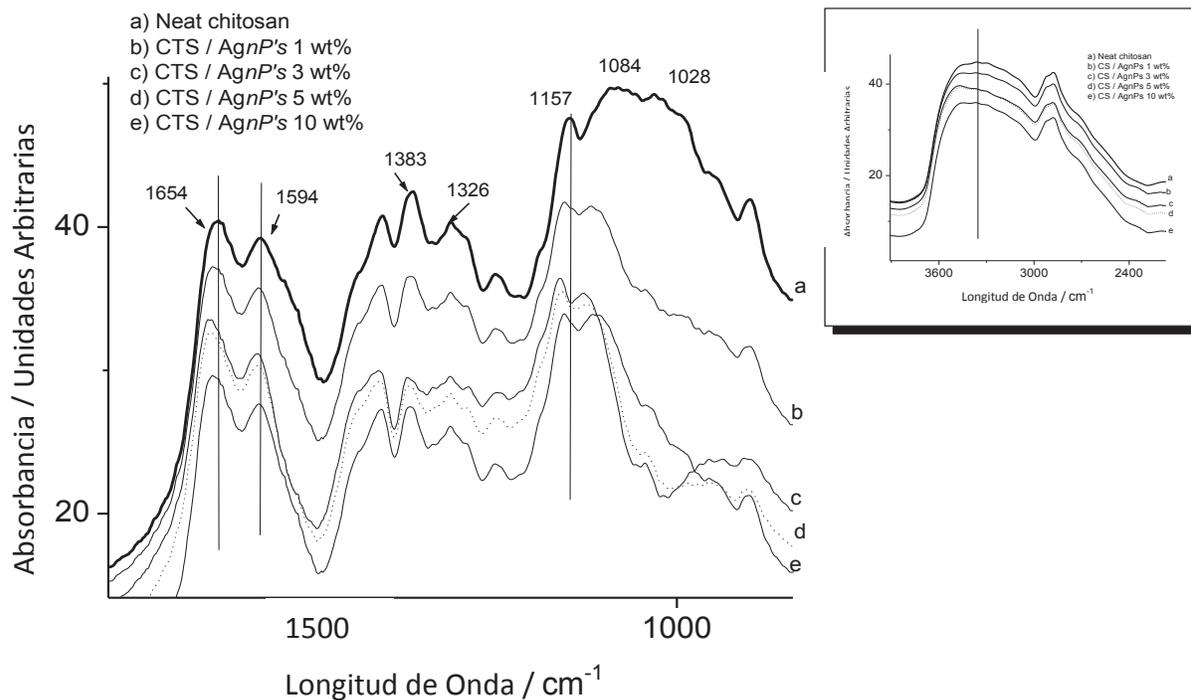


Figura 7.3.1. Espectros IR de quitosano puro y compuestos de CS/AgNP's.

7.4 Mediciones TGA/Contenido de Humedad

El contenido de humedad del CS puro neutralizado y no neutralizado así como el de los compuestos CS/AgNP's fue determinado por el análisis termogravimétrico, descrito anteriormente en la sección 3.5. A las películas *húmedas* (temperatura y humedad ambiente), se les realizó un primer tratamiento térmico desde 20°C hasta 120°C mostrado en la Figura 7.4.1a, manteniendo esta temperatura durante 30 minutos para asegurarla eliminación completa de la humedad. La primera pérdida de peso (línea negra de la Figura 7.4.1a), está relacionada con la evaporación y eliminación de agua, y una vez que se realiza este tratamiento térmico y se enfría la muestra a 30°C (dentro de la celda de medición, bajo flujo constante de aire para evitar la reabsorción de humedad), se puede observar que el segundo barrido prácticamente no registra pérdida de peso

manteniéndose éste constante lo que indica que la humedad es cero y las muestras están totalmente secas (ver línea negra de la Figura 7.4.1a).

Se puede observar en la misma figura, que la pérdida de peso inicial (12,52% en peso) en quitosano puro no neutralizado (NNCS) es ligeramente mayor que la correspondiente al quitosano neutralizado (NCS) (11,6% en peso). Esta pérdida de peso es reconocida y relacionada con un efecto de la evaporación del agua [36], y es un buen indicativo de una mayor capacidad de retención de agua del quitosano en su estado neutralizado [37]. Una mayor interacción entre el NNCS y el agua a través de enlaces por puente de hidrógeno, así como una mayor capacidad de retención de la misma, podría afectar el movimiento molecular de baja temperatura del quitosano [37] y a su vez afectar su actividad antibacteriana [38].

Además se muestra que la estabilidad térmica del NNCS es menor que su contraparte NCS, es decir, la temperatura de degradación del NNCS es inferior aproximadamente en 40°C en comparación con el NCS. En general, se sabe que los enlaces por puente de hidrógeno entre las cadenas del polímero contribuyen a elevar la temperatura de degradación. Como se observó por medio de TGA, el NCS tiene una menor interacción con el agua lo que facilita la formación de enlaces por puente de hidrógeno inter e intramoleculares. Por lo tanto este tipo de quitosano muestra una temperatura de degradación superior a la de NNCS.

En cuanto a los compuestos CS/AgnP's, los resultados del análisis TGA indican que a medida que aumenta el porcentaje en peso de AgnP's, el contenido de humedad disminuye tal y como se muestra en la Figura 7.4.1b. Como se demostró por análisis de FTIR en la sección anterior, los grupos NH₂ y OH⁻ se pueden enlazar con las nanopartículas de plata; permitiendo la formación de una estructura compuesta polímero/nanopartículas [39] disminuyendo la capacidad de absorción de agua al incrementar la concentración de AgnP's en los compósitos. Por otro lado, la segunda pérdida de peso presente arriba de los 250°C esta

relacionada con la degradación térmica [40] como puede observarse en la Figura 7.4.1b. También es de notarse que la estabilidad térmica del quitosano puro se ve claramente afectada por la inclusión de AgnP's, al registrarse por medio del análisis por TGA un aumento evidente de la temperatura de degradación del quitosano puro aproximadamente en 20°C.

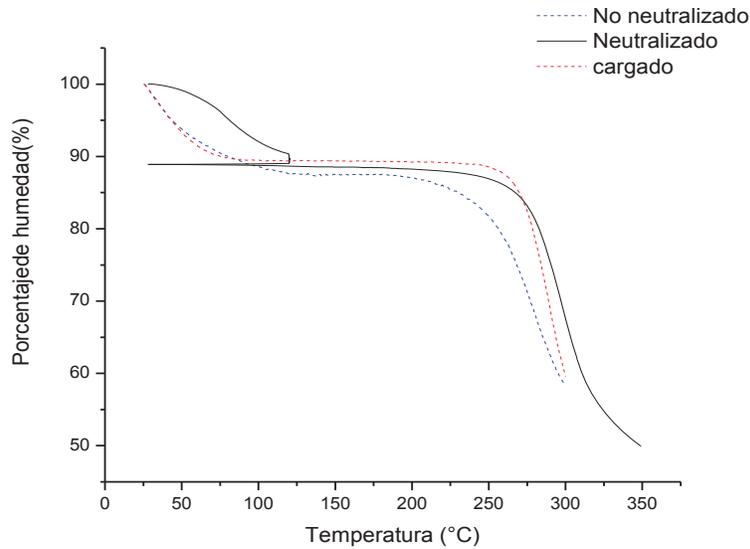


Figura 7.4.1a. Medición del contenido de humedad de CS Y CS/AgnP's.

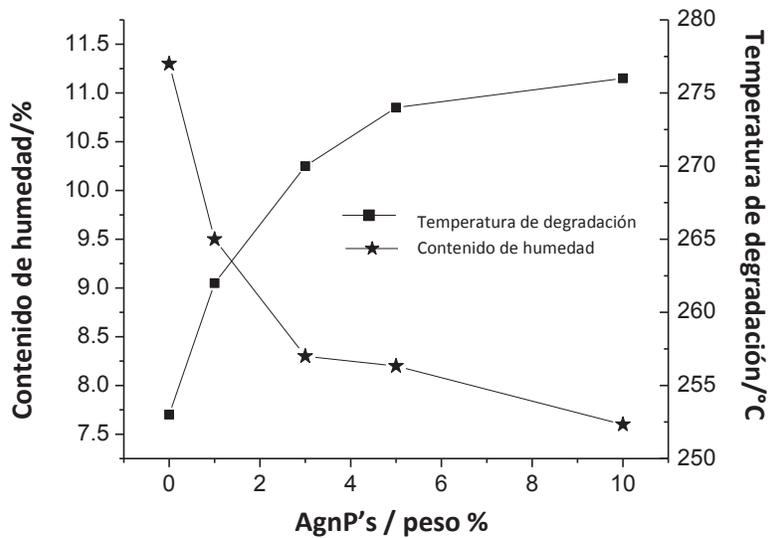


Figura 7.4.1b. Contenido de humedad y temperatura de degradación.

7.5 Análisis Dinámico Mecánico (DMA)

La Figura 7.5.1 muestra el espectro de la $\tan \delta$ para una película de CS/AgnP's (3% en peso) después del tercer barrido dentro de la celda de medición (muestras *tratadas térmicamente a 120°C*, ver apartado 3.5). Un tercer barrido implica un contenido de agua aproximado de 1,3% de humedad (determinado por TGA) durante la medición DMA. En estas muestras “*anhidras*” se pueden observar claramente dos picos de $\tan \delta$ en 177°C y 289°C, también se muestra una ventana insertada: $\tan \delta$ contra la temperatura para la primera y segunda escaneada (8% y 4% de contenido de agua), nótese que un pico ancho de $\tan \delta$ por debajo de 125°C está presente para contenidos de humedad superiores al 1,3%.

Algunos autores han asignado un pico amplio de $\tan \delta$ en el Intervalo de temperatura entre 140°C a 190°C como la relajación tipo α y por consiguiente la transición vítrea del quitosano [36, 37, 40, 41]. Lo que podría hacer pensar que este pico en 177°C es la relajación tipo alfa relacionada a la transición vítrea. Sin embargo, hasta este punto no se cuenta con elementos suficientes para hacer esta afirmación.

Por otro lado, el segundo pico a 289°C está relacionado con el proceso de degradación del biopolímero [36, 41, 42], esta afirmación está apoyada por la medición TGA mostrada en la Figura 7.5.1, es decir, el comienzo de la degradación establece por encima de 170°C y una pérdida de peso importante es notable por encima de 240°C. Santos *et al.* [22] también mostraron la degradación térmica a 250°C con su inicio a 175°C. Mientras que Sakurai *et al.* [43] asignaron este pico (alrededor de 203°C) a la de transición vítrea del quitosano. Sin embargo, como se mencionó anteriormente esta temperatura está muy cerca de la degradación térmica del quitosano. Por otra parte, no hay evidencia de movimiento molecular detectado por debajo de 125°C para las muestras con contenido de humedad 1,3%).

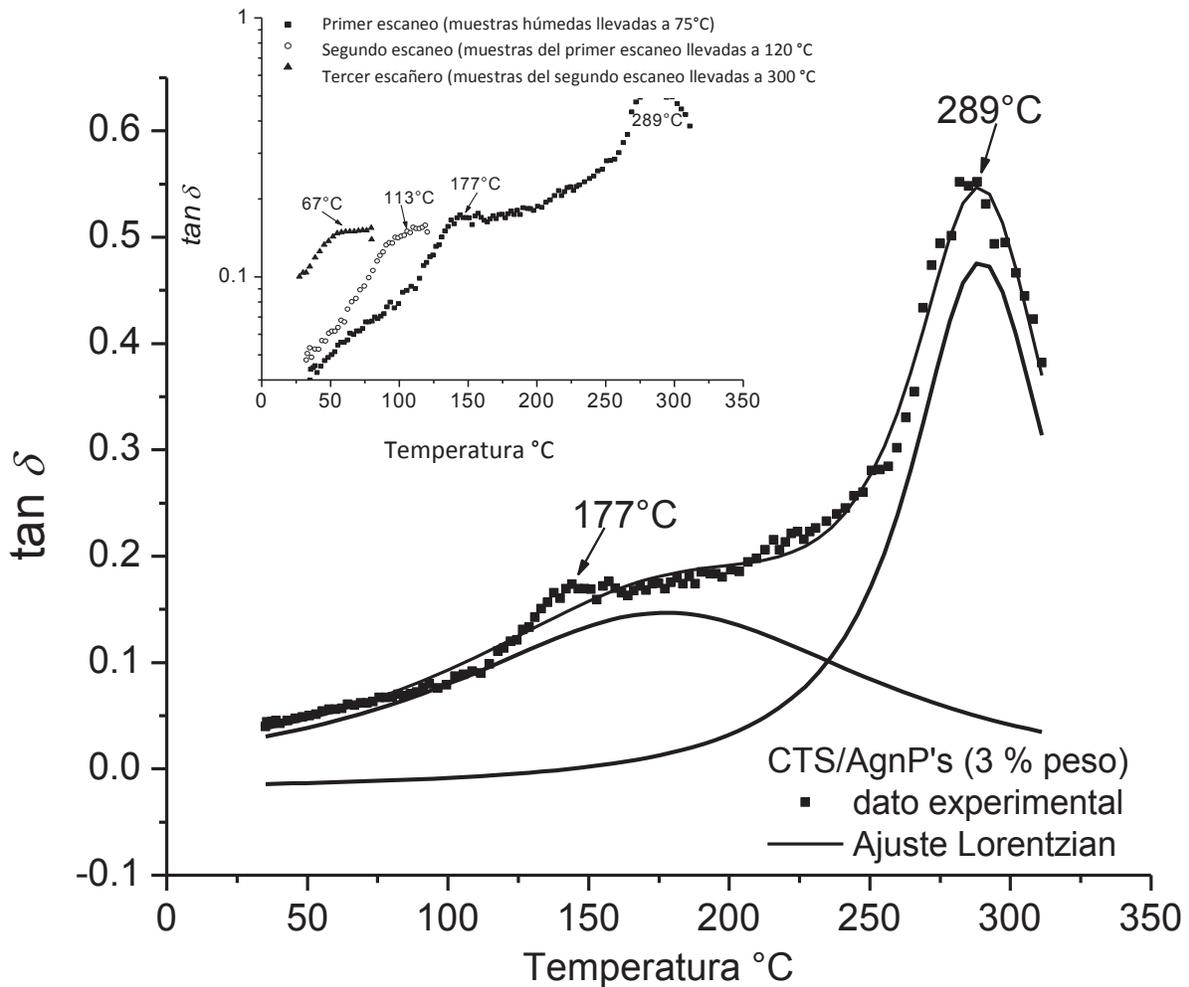


Figura 7.5.1. Espectro DMA para CS/AgnP's (3% en peso).

Las mediciones DMA para películas a las cuales se les realizó un primer y un segundo barrido (8 y 4% de humedad, respectivamente) muestran una relajación a "baja temperatura" por debajo de 125°C como se muestra en la ventana de inserción de la Figura 7.5.1. Es de notar que este movimiento molecular se ve afectado por la presencia de agua, mientras mayor es el contenido de agua, menor es la temperatura de relajación, es decir, el cambio en el pico de la $\tan \delta$ se registra en una menor temperatura cuando el contenido de agua es mayor (67°C para 4% de humedad y 113°C para 8% de humedad). Lazaridou *et al.* [44] observó un efecto similar en el pico del factor de amortiguamiento del quitosano ($\tan \delta$) por debajo de 100°C. Esta relajación fue

asignada como la transición vítrea del quitosano y de mezclas de quitosano (con almidón y pululano), este proceso de relajación se desplaza hacia bajas temperaturas a medida que aumenta el contenido de agua, lo que sugiere un efecto plastificante del agua. Asimismo Quijada-Garrido *et al.* [45], reportaron esta relajación entre 88-99°C (dependiendo de la frecuencia) y la relacionaron con la transición vítrea del quitosano, ellos señalan un efecto plastificante sobre esta relajación con el incremento del contenido de glicerol en mezclas quitosano-glicerol.

En este punto, es difícil hacer una asignación exacta de la naturaleza del procesos de relajación de los picos a 67°C (primer barrido), 113°C (segundo barrido), y 177°C (tercero barrido). Aunque este pico de baja temperatura al parecer esta relacionado con la de transición vítrea del quitosano, se requiere más información para hacer esta afirmación, ya que los dos picos aquí presentados han sido previamente asignados como la transición vítrea del quitosano en otros trabajos como se mencionó anteriormente. Solamente se puede afirmar que el pico de alta temperatura está relacionado con la degradación térmica del material, lo cual ha sido verificado por medio del análisis por TGA.

Así, el Análisis Dieléctrico permitirá dilucidar estos resultados obtenidos por DMA ya que esta técnica proporcionará mayor información, la cual podrá relacionarse con estos resultados obtenidos. De esta forma será posible establecer la naturaleza de cada proceso de relajación. En la siguiente sección, se muestran los resultados dieléctricos, los cuales serán relacionados con estos resultados presentados con DMA.

7.6 Análisis Dieléctrico

Las mediciones de conductividad eléctrica de corriente directa (DC) a temperatura ambiente como una función de AgnP's % en peso muestran se muestran en la Figura 7.6.1. En esta Figura, se puede observar un cambio brusco en la conductividad conforme el porcentaje en peso de las nanopartículas de plata aumenta, y una saturación posterior se observa aproximadamente en un 3% en

peso de las AgnP's. Esta es una característica clara del fenómeno de percolación [46]. Los valores más altos de conductividad DC de las películas CS/AgNP's en comparación con el quitosano puro son atribuidos al movimiento de los portadores de carga libres Ag^+ . Sin embargo, la baja conductividad después del umbral de percolación es atribuida a la presencia de una capa delgada del polímero que coexiste entre las nanopartículas de plata [46]. La presencia de nanopartículas metálicas aumenta considerablemente la conductividad del quitosano lo que es una ventaja en aplicaciones eléctricas de estos compuestos.

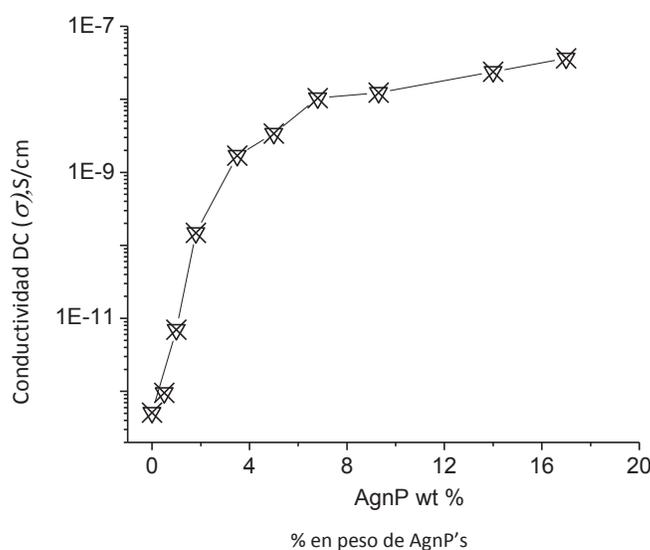


Figura 7.6.1. Conductividad DC vs % en peso de AgNP's en películas anhidras.

Por otro lado, la dependencia de la conductividad DC (σ_{dc}) como una función de la temperatura, puede proporcionar información importante acerca de la naturaleza del movimiento molecular. En este caso, la conductividad DC (σ_{dc}) no puede ser calculada a través del componente real de la conductividad compleja. Por lo tanto, se calculó por medidas dieléctricas mediante la metodología anteriormente descrita (apartado 3.3 y 3.4) [36]. Es decir, la resistencia DC (R_{dc}) se obtuvo a partir de la intersección del semicírculo con el eje de la parte real en el plano de impedancia (en $Z'' = 0$) mostrado en la Figura 7.6.2, por lo tanto la σ_{dc} se puede calcular mediante la siguiente relación: $\sigma_{dc} = d/(R_{dc} \times A)$ donde d es el espesor

y A es el área de la película, respectivamente. De esta dependencia se observó que la muestra de quitosano no neutralizado revela valores de conductividad más altos, debido tanto al mayor número como mayor movilidad de especies $R-NH_3^+$.

También es importante mencionar que existen algunos factores que pueden enmascarar los procesos de relajación es estos compuestos. Además del contenido de humedad, la polarización interfacial y el efecto de los contactos de oro (depositados en ambos lados de las películas para realizar las mediciones de impedancia), son factores que deben eliminarse previo a la interpretación de los resultados. Estos últimos dos efectos se muestran en los espectros de impedancia compleja (Z Vs. Z'') para películas secas de CS/AgnP's en la Figura 7.6.2. La polarización interfacial y los efectos de contactos [26], están bien identificados como un comportamiento casi lineal y como una protuberancia en el semicírculo en el lado de baja frecuencia de los espectros, respectivamente. Para el tratamiento posterior adecuado tanto del quitosano como de los compuestos CS/AgnP's, es importante tener en cuenta sólo el semicírculo mostrado en el lado izquierdo del espectro.

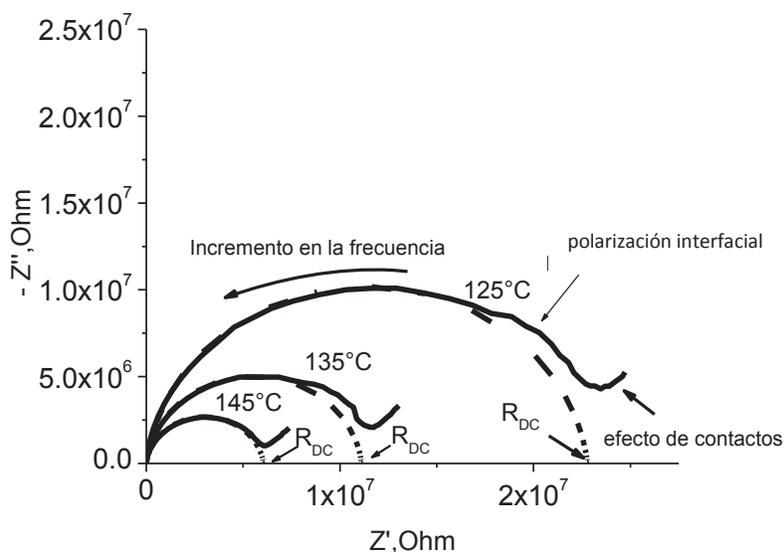


Figura 7.6.2. Espectros de impedancia compleja (Z Vs. Z'') para películas anhidras de CS/AgnP's.

Una vez que se obtienen los valores de resistencia para cada temperatura (cada 5°C desde 20°C hasta 250°C) como se describió anteriormente, se calcula la conductividad (σ_{dc}) para cada temperatura. De esta forma, se obtiene la dependencia de la conductividad DC respecto del inverso de la temperatura absoluta obtenida para una película de CS/AgnP's (1% en peso) tratada térmicamente a 80°C, 100°C y 120°C donde se observa que por debajo de 80°C el efecto plastificante del agua es evidente y en el calentamiento a 80°C y 100°C se observa que la temperatura de Vogel aumenta cuando disminuye la temperatura de calentamiento (Figura 7.6.3). Este mismo comportamiento es general para todos los compuestos analizados. Para una mejor descripción, se pueden identificar dos diferentes intervalos de temperatura; la región de baja temperatura desde 20°C a 80°C y la región de alta temperatura desde 80°C hasta la degradación (arriba de 170°C). En cuanto a la degradación térmica de compuestos CS/AgnP's, es de destacar que se evaluó previamente por TGA en la sección anterior y se observó que la estabilidad térmica de quitosano aumenta aproximadamente 20°C cuando el porcentaje de AgnP's en peso está por encima del 3%.

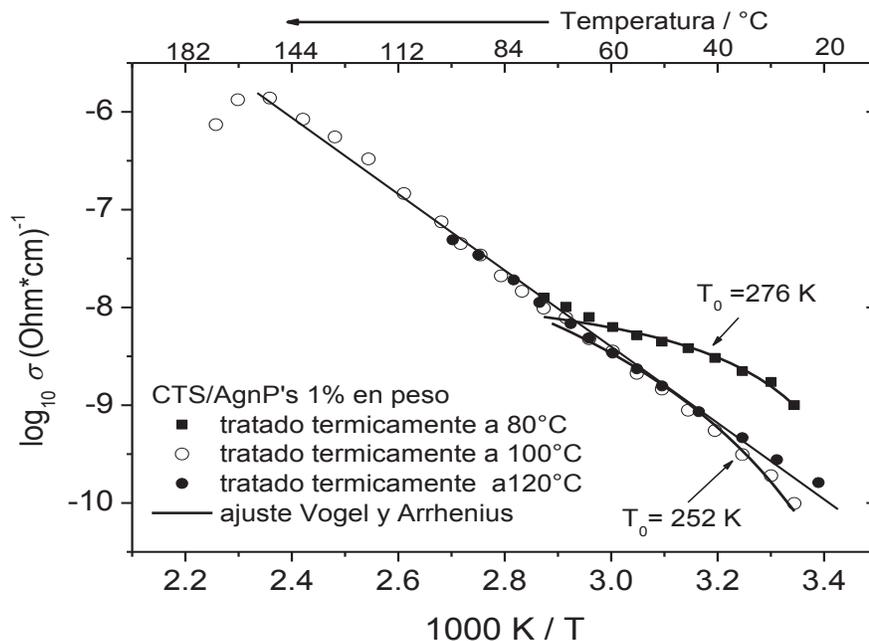


Figura 7.6.3. Log de conductividad DC (σ_{dc}) contra 1000 K/T para compuestos CS/AgnP's.

Por otro lado, centrándose en el intervalo de temperatura 20-80°C; las películas tratadas térmicamente a 80 y 100°C muestran un comportamiento no lineal bien descrito por la relación Vogel-Fulcher-Tammann (VFT) [47]; $\sigma = \sigma_0 \exp(-D/T - T_0)$ donde σ_0 es el factor pre-exponencial, D es una constante del material y T_0 es la llamada temperatura de Vogel. A partir de estos datos experimentales es posible calcular la temperatura de Vogel (T_0) y por ende, es posible asignar una temperatura de transición vítrea (T_g) con la premisa de que la temperatura de Vogel es la temperatura de activación aparente de la relajación α y que en muchos polímeros T_0 es usualmente 50 K inferior a la T_g [47].

Es importante hacer notar el efecto de la humedad sobre el proceso de baja temperatura (20°C-80°C). Esto se puede observar claramente en los datos experimentales de compuestos CS/AgnP's (1% en peso) con diferentes tratamientos térmicos mostrados en la Figura 7.6.4. El tiempo de relajación (calculado para cada temperatura como se describe en el apartado 3.4) frente a la dependencia $1/T$ muestra la característica no lineal del comportamiento VFT evidente a la relajación α y por lo tanto el fenómeno de transición vítrea. El efecto plastificante del agua se pone de manifiesto por el cambio de la temperatura de transición vítrea; los valores son más altos a medida que disminuye el contenido de humedad. Figura 7.6.4 al igual que en la figura mostrada anteriormente para la conductividad. Se observa que cuando se realiza un tratamiento térmico a 80°C previo la medición, se presenta un comportamiento no-lineal con una curvatura muy evidente, mientras que si se realiza un tratamiento térmico previo a 100°C, esta curvatura disminuye.

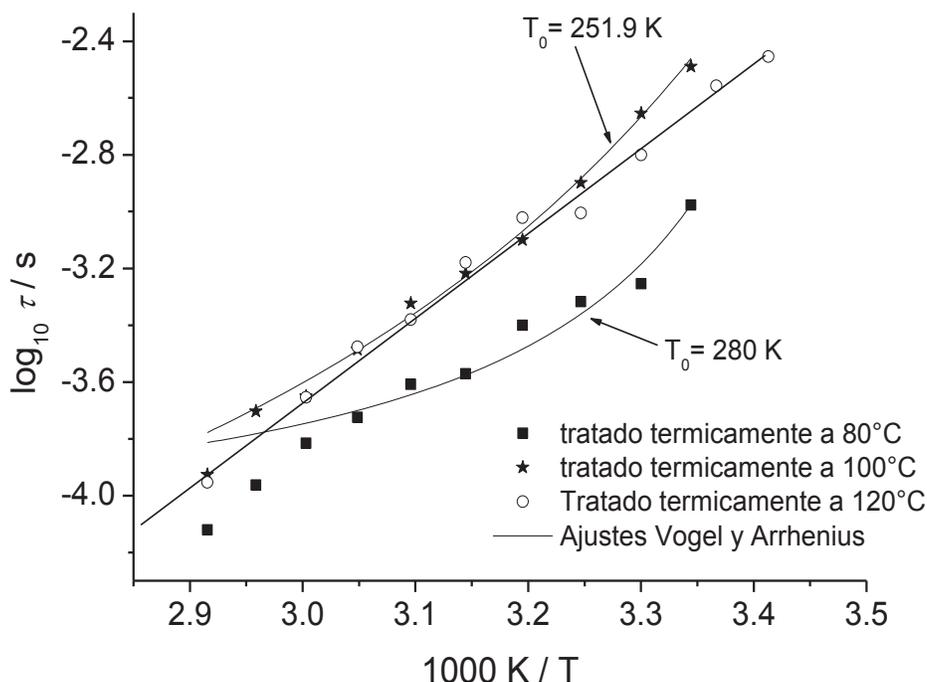


Figura 7.6.4. CS/AgnP's 1% en peso a diferentes temperaturas de calentamiento.

Sin embargo, después de obtener el contenido mínimo de humedad (0,08% en peso) este comportamiento no lineal se desvanece después de la evaporación del agua por calentamiento a 120°C, véase el tratamiento térmico a 120°C de la película, (apartado 3.5). Se evidencia así el efecto plastificante del agua sobre esta relajación de baja temperatura, y a temperatura de Vogel (o la T_g) disminuye al aumentar el contenido de humedad. El efecto de la humedad cambia drásticamente el comportamiento dieléctrico de estos compuestos y por lo tanto sus propiedades físicas, al cambiar la T_g .

En este punto, es posible observar un cambio en el intervalo de baja temperatura desde un comportamiento no-lineal tipo Vogel hacia un comportamiento lineal iniciando incluso desde los 2°C hasta el comienzo de la degradación (ver Figuras 7.6.3 y 7.6.4, muestras “secas”), y puede ser bien descrito por la ecuación de Arrhenius, $\sigma = \sigma_0 \exp(-E_{a\sigma} / RT)$ donde $E_{a\sigma}$ es la

energía de activación. Es decir, las muestras totalmente secas (contenido de humedad muy cercano a cero), presentan un comportamiento tipo Arrhenius en todo el intervalo de temperatura analizado (2°C-250°C). Este cambio en las películas húmedas con un comportamiento tipo VFT hacia un comportamiento tipo Arrhenius para películas tratadas térmicamente a 120°C se observó tanto en NCS, NNCS como en las películas CS/AgnP's y es una evidencia clara del efecto plastificante de agua en las películas húmedas. Este hecho conlleva a que, en las películas húmedas, debido a un efecto plastificante del agua se experimenta una transición vítrea.

Por otro lado, en el rango de alta temperatura (por encima de 80°C), este comportamiento lineal se observa también en películas tratadas térmicamente a 80°C y 100°C demostrando que después de la evaporación del agua el efecto plastificante no está presente. Este proceso de relajación lineal está relacionado con el movimiento de iones y se denomina proceso de relajación- σ [48] y esta presente en todas las muestras. Es decir, arriba de 80°C todas ellas presentan este proceso de relajación lineal tipo σ .

Para películas de NCS, NNCS y compuestos CS/AgnP's tratadas térmicamente a 120°C, las energías de activación de este proceso calculadas a partir de la ecuación de Arrhenius mostrada arriba (contenido de humedad \approx 0,08% en peso) se encuentran entre 79 a 86 kJ/mol (véase la Figura 7.6.5 y su ventana insertada). Esta Figura muestra la tendencia de la energía de activación de esta relajación tipo σ como una función del contenido de AgnP's, y también incluye los valores correspondientes para NCS y NNCS. Se debe tener en cuenta que las películas no neutralizadas presentan una menor energía de activación que las neutralizadas. Ya que esta relajación está relacionada con el movimiento de protones [48], esto indica un exceso de número de protones en las películas no neutralizadas (hay presencia de grupos $R-NH_3^+$). Como se mencionó anteriormente, esta relajación lineal está relacionada con el movimiento de iones y

valores bajos de la energía de activación implican un mayor número de estas especies presentes en el sistema, lo que facilita este proceso de relajación, dando lugar a estos valores más bajos de energía de activación. En los compuestos CS/AgnP's esta tendencia continúa hasta un 3% en peso de nanopartículas. La obtención de una energía de activación menor en esta relajación, se puede deber a un efecto sinérgico de la combinación de la presencia de un mayor número de grupos $R-NH_3^+$ y de la movilidad de los iones Ag^+ que también conduce a valores de conductividad más altos.

Por otra parte, para los contenidos de AgnP's superiores al 5% en peso, la energía de activación para este proceso aumenta, esto puede atribuir a la formación de aglomerados para concentraciones de 5% en peso y superiores, como se explicó por las imágenes SEM (véanse los resultados SEM en la Figura 7.1.1), en consecuencia estos aglomerados dificultan el movimiento de iones a lo largo de los compuestos lo que afecta directamente al proceso de relajación- σ (el movimiento de iones). De lo anterior se concluye que el tamaño de partícula de las AgnP's afecta directamente a la conductividad y el movimiento de iones en los materiales compuestos (por encima de 3% en peso de AgnP's la energía de activación aumenta como consecuencia de la formación de aglomerados de nanopartículas de plata), lo que a su vez puede afectar a su actividad antibacteriana, lo cual se discutirá más adelante.

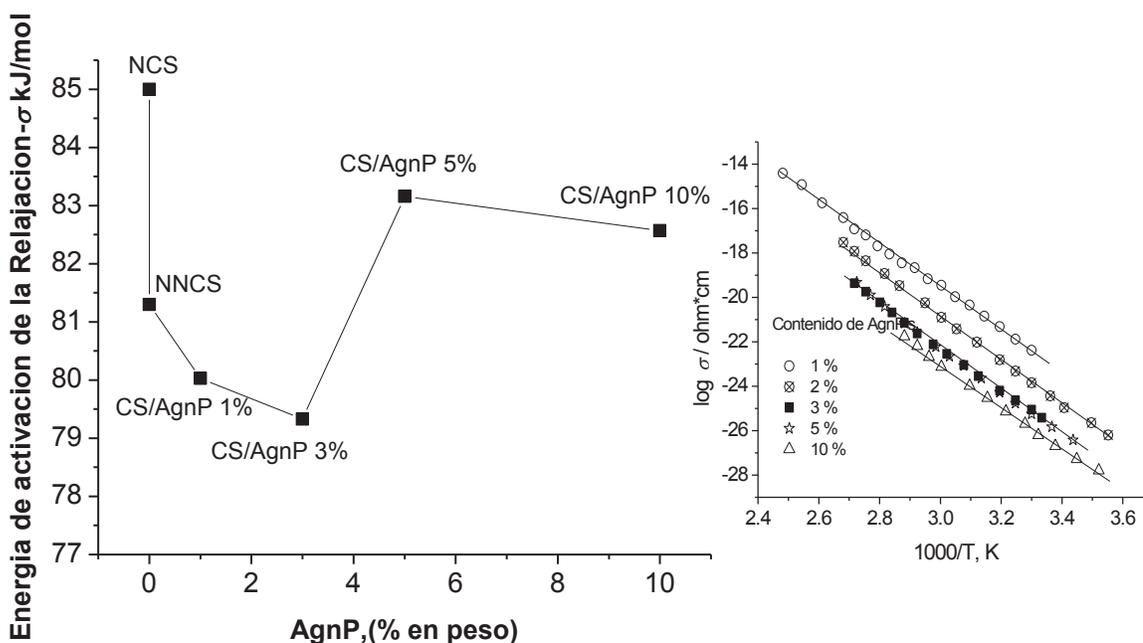


Figura 7.6.5. Energía de activación para el proceso de relajación- σ

La temperatura de transición vítrea se calculó a partir del ajuste de los datos experimentales de las dependencias del tiempo de relajación y conductividad (Figuras 7.6.3 y 7.6.4) al modelo VFT, en la zona de baja temperatura para las muestras con comportamientos no-lineales. Ambas predicciones mostraron que la T_g disminuye al aumentar el porcentaje en peso de las AgnP's [40]. Un posible escenario para esta observación es propuesto: las AgnP's se unen a los grupos amino primarios o posiblemente a los grupos hidroxilo, afectando las interacciones intermoleculares fuertes quitosano-quitosano, facilitando así la movilidad de la cadena principal lo que resulta en una disminución de la T_g . Otro factor que afecta a la T_g en estos compuestos es el contenido de humedad ya que, como se muestra en los resultados por TGA (ver Figura 7.3.1), a mayor contenido de AgnP's, menor es el contenido de agua. De esta manera, el efecto de plastificación del agua también contribuye a presentar valores de T_g mayores en materiales compuestos con menores contenidos de AgnP's.

El análisis del cambio en la temperatura de transición vítrea del quitosano puro respecto de los compuestos CS/AgnP's, es de gran importancia en el área de ingeniería de polímeros, ya que este valor determina directamente la posibilidad de emplear el material en una aplicación dada. De esta forma, tal y como se puede observar a partir de los resultados anteriores, la inclusión de nanopartículas metálicas al quitosano, afecta la transición vítrea y por ende sus propiedades macroscópicas, lo que da información relevante que puede ser aplicada en su procesamiento y aplicación.

De los resultados dieléctricos, en este punto es posible afirmar, que la relajación por debajo de 177°C, detectada por DMA efectivamente corresponde a la transición vítrea del quitosano y sus compuestos. Y ésta es también afectada por el efecto de la humedad. Es decir, también es posible observar el efecto plastificante del agua sobre la transición vítrea del quitosano y sus compuestos. Al disminuir el contenido de humedad, la T_g aumenta.

De esta forma se verifica la eficacia de la combinación de ambas técnicas en la caracterización de la dinámica molecular de compuestos base polimérica.

7.7 Análisis Antibacteriano

El análisis antibacteriano contra *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. typhimurium* y *S.aureus* para películas de quitosano neutralizadas y no neutralizadas sin nanopartículas de plata (es decir, 0% en peso de AgnP's) se muestra en la Figura 7.7.1. Este análisis se llevó a cabo para cuatro tiempos diferentes; 0, 5, 24 y 48 h. Como se observa en la Figura 7.7.1, el tiempo de exposición al quitosano tiene un efecto importante, lo que muestra que, independientemente del tipo de microorganismo el número de células inactivadas aumenta cuando el tiempo de exposición se prolonga. Después de 48 horas de contacto la población de los cuatro microorganismos se redujo aproximadamente a 3,78 Log UFC/cm². La dispersión de los datos incrementó conforme el tiempo de contacto transcurrió.

Hay una clara diferencia entre la actividad antibacteriana del NNCS y NCS sobre las bacterias probadas, ya que en las películas de NNCS se muestra una mayor actividad antibacteriana sobre las bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas en comparación con las películas de NCS. Y a su vez, en el estado NNCS, hay una mayor actividad frente a bacterias Gram positivas, especialmente a las 48h. El análisis antibacteriano realizado por Fernandez-Saiz *et al.* [49] mostró que las películas de quitosano neutralizado no inactivan a la bacteria *S. aureus*, y el desempeño óptimo lo observaron cuando los grupos amino se encuentran protonados, es decir, ellos atribuyen que el ión acetato, las condiciones ácidas o una combinación de ambos factores son los responsables del efecto letal. Sin embargo, estos mismos autores también encontraron que al realizar pruebas con soluciones de ácido acético (sin quitosano) con el mismo pH que la solución ácida de quitosano con una mayor inhibición, no se mostró ningún efecto inhibitorio, comprobando de esta forma que la presencia del ácido acético no afecta la naturaleza inhibitoria del quitosano y solamente los grupos amino protonados son los responsables del efecto antibacteriano lo que concuerda con los resultados encontrados en este trabajo; i.e. el quitosano no neutralizado muestra una mayor actividad contra el crecimiento bacteriano. El Log UFC/cm² en función del tiempo para el quitosano neutralizado y no neutralizado en diferentes tiempos de exposición se muestra enseguida, nótese que la actividad antibacteriana del quitosano no neutralizado frente a todas las bacterias analizadas es mayor que su contraparte el quitosano neutralizado.

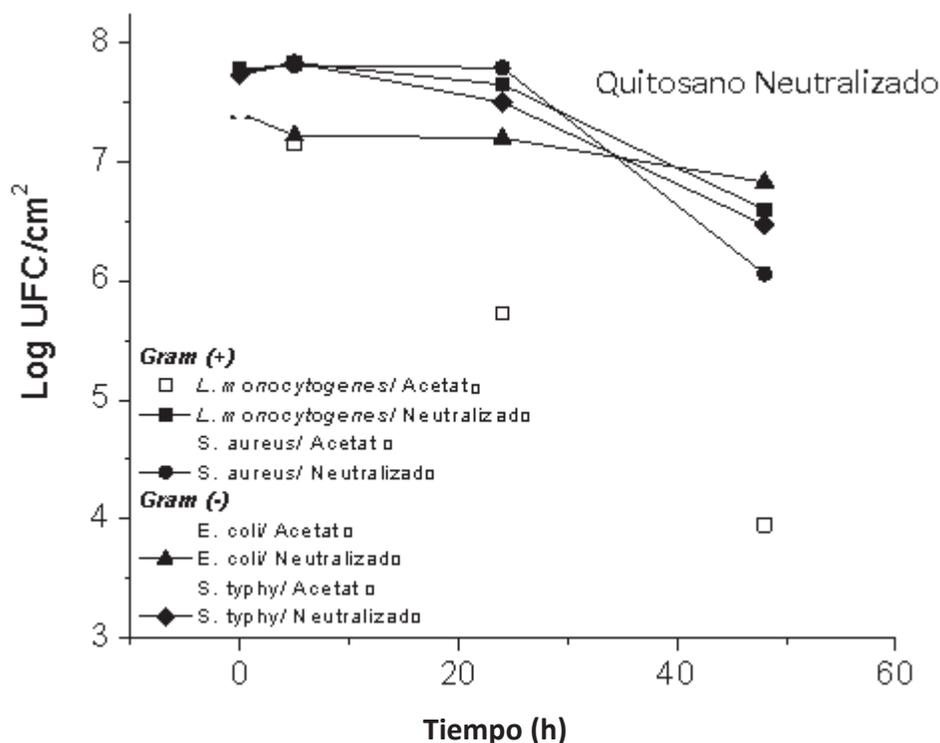


Figura 7.7.1. Log UFC/cm² vs tiempo para compuestos NCS y NNCS

El mecanismo de toxicidad del quitosano contra bacterias Gram negativas y Gram positivas, ha sido parcialmente resuelto. Algunas hipótesis indican que el quitosano policatiónico puede interactuar con grupos aniónicos en la superficie celular provocando un aumento de permeabilidad de la membrana, seguido de su alteración y una subsecuente fuga de las proteínas celulares [50]. La unión de las células al quitosano se atribuye principalmente a las interacciones electrostáticas entre los sitios catiónicos del quitosano, proporcionados por los grupos $R-NH_3^+$ de las unidades de glucosamina y los grupos cargados negativamente de carboxilato y sulfato encontrados en los proteoglicanos de la superficie celular [51, 52]. Mientras que otros mecanismos sugieren la formación de quelatos de quitosano con nutrientes esenciales resultando en la inhibición de la actividad de las enzimas [53].

Los resultados dieléctricos mostraron que el NNCS posee un mayor número de grupos $R-NH_3^+$ en comparación el NCS (ver sección 7.6, energía de activación proceso de relajación tipo σ), ofreciendo una mayor actividad antibacteriana). Estos resultados, refuerzan la teoría sobre las interacciones electrostáticas entre los grupos $R-NH_3^+$ y los grupos cargados negativamente en la superficie celular de las bacterias [51, 52]. Como la unión celular se atribuye a las interacciones electrostáticas entre estos sitios catiónicos del quitosano y los grupos carboxilato y sulfato en los proteoglicanos de la superficie celular cargados negativamente, en este caso se muestra que las bacterias Gram positivas son más susceptibles a establecer interacciones electrostáticas con estos compuestos antimicrobianos, ya que poseen grupos fosfato con carga negativa que da lugar a una pared más electronegativa. Esto concuerda con la hipótesis de una interacción electrostática entre el quitosano y la pared celular antes mencionada.

La actividad antibacteriana del quitosano es altamente dependiente del pH, ya que se presenta una mayor actividad a pH más bajo como se muestra para el NNCS. La fisiología de la célula es más susceptible de sufrir daños a pH más bajo, por lo que, los grupos carboxilo y fosfato de la superficie bacteriana son aniónicos y proporcionan sitios potenciales para la unión electrostática del quitosano a pH más bajos [54]. Como se mencionó anteriormente, en este caso se empleó ácido acético para disolver o dispersar al quitosano, éste ácido resulta ser uno de los agentes antimicrobianos orgánicos más adecuados [54]. Otro factor importante que influye en la actividad antibacteriana, independientemente de la forma o la cantidad es que requiere agua para la actividad, por lo que las muestras totalmente secas son virtualmente incapaces de liberar la energía almacenada en los enlaces químicos para iniciar la reacción [38]. En este aspecto, como se demostró en el análisis de TGA; que el NNCS tienen mayor habilidad de almacenamiento de agua (humedad) que el NCS, por lo tanto, un mayor contenido de agua está presente en la forma NNCS lo que contribuye a mejorar su actividad antibacteriana, tal y como se ha demostrado.

Por otro lado, se ha incrementado el interés en torno al descubrimiento de que las nanopartículas de plata son agentes antibacterianos considerablemente más eficientes en términos de la concentración mínima inhibitoria de los iones Ag^+ [55, 56, 57]. El análisis antibacteriano en películas de los compuestos CS/AgnP's neutralizadas y no neutralizadas a diferentes concentraciones de AgnP's después de 48 h se muestra en las Figuras 7.7.2a y 7.7.2b. Se puede observar que el efecto antibacteriano se ve reducido en películas con concentraciones de AgnP's por encima del 5% y que con la inclusión de las nanopartículas de plata el efecto antibacteriano del quitosano puro es considerablemente mejorado, especialmente en las películas de quitosano neutralizado. En este caso, tanto las películas neutralizadas como las no neutralizadas muestran el mayor efecto inhibitorio contra *S. typhimurium*, y el organismo más resistente parece ser *S. aureus*.

Los resultados bacteriológicos concuerdan con los anteriormente reportados por Morones y colaboradores [58], es decir, 1) las partículas de mayor tamaño relacionado con la formación de aglomerados se adhieren a la superficie de la membrana celular y perturban su función, tales como la permeabilidad y la respiración (concentraciones arriba de 3% de AgnP's) y 2) partículas de menor tamaño (0.5 y 1% de AgnP's) tendrán una interacción directa con la membrana celular de tal forma que pueden penetrar en la celular y causar un daño mayor.

De acuerdo con los resultados dieléctricos mostrados anteriormente, los compuestos CS/AgnP's neutralizados muestran un comportamiento muy particular contra las bacterias Gram negativas en tiempos de contacto de 48 horas; 3% en peso de nanopartículas de plata parece ser una concentración de gran cambio tal y como se encontró con las otras técnicas de caracterización, es decir debajo de esta concentración el efecto antibacteriano es más efectivo al incrementar la concentración de AgnP's, mientras que arriba de 3% en peso la efectividad disminuye. El mismo comportamiento se observa sobre las bacterias Gram positivas arriba de 5% en peso; sin embargo, esto no aplica para la concentración de 10%. La disminución en la actividad antibacteriana de películas al incrementar la concentración de AgnP's puede ser atribuida a la presencia de aglomerados

arriba de 3% en peso (ver micrografías SEM en la 7.1.1), esto es debido a que el efecto inhibitorio de las AgnP's depende del tamaño de partícula, a menor tamaño de partícula mayor inhibición [58].

Por otro lado, el contenido de humedad también puede estar jugando un papel importante en este proceso y afectar la capacidad antibacteriana de los compuestos. Dado que el análisis por TGA mostró que el contenido de humedad disminuye al incrementar el contenido de AgnP's (ver Figura 7.4.1). Nuevamente, 3% en peso de AgnP's es una concentración clave en el contenido de humedad ya que no se observa un cambio significativo del mismo para concentraciones superiores a este valor. Ya que las bacterias requieren de la presencia de humedad para su proliferación, en este caso, los compuestos CS/AgnP's con un mayor contenido de humedad (concentraciones de AgnP's menores a 3% peso) muestran una mayor inhibición del crecimiento de bacterias Gram negativas, observándose claramente un efecto sinérgico entre la concentración, el tamaño de partícula y el contenido de humedad.

Figura 7.6.2 (a)

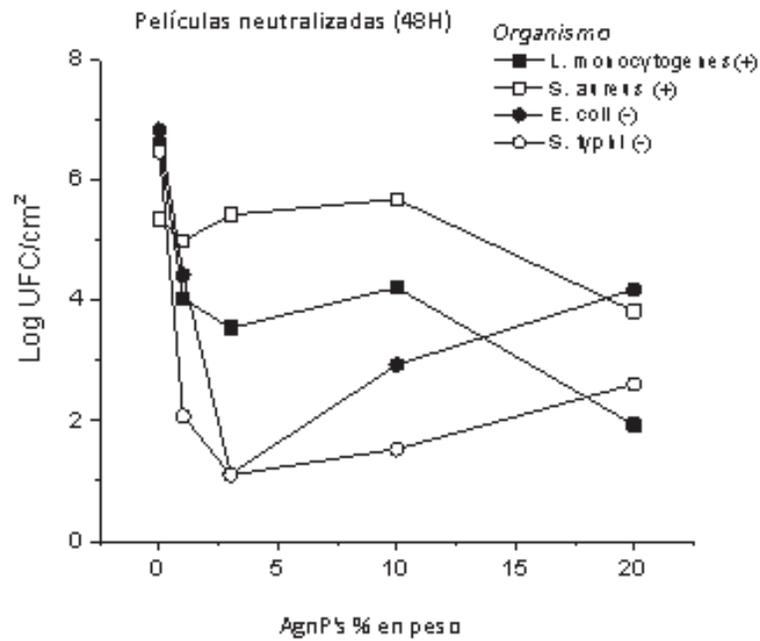


Figura 7.6.2 (b)

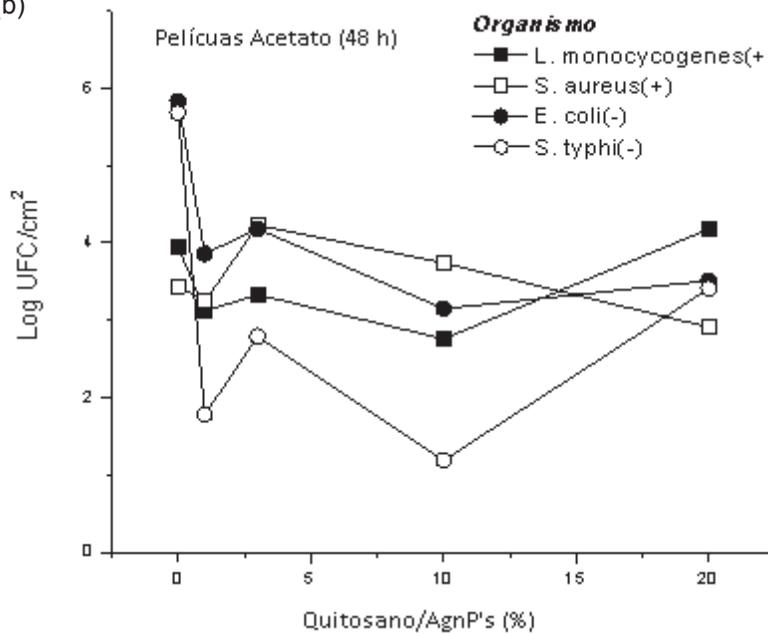


Figura 7.6.2. Análisis antibacteriano (a) y (b) para compuestos CS/AgNP's.

En el caso de los compuestos CS/AgnP's no neutralizados, no se observa una tendencia clara de acuerdo a la naturaleza de la bacteria. Sin embargo, al igual que en las películas neutralizadas de compuestos CS/AgnP's el mayor efecto inhibitorio fue sobre *S. typhimurium*. En este caso, en todas las bacterias el mayor efecto inhibitorio se observó en concentraciones de 10% en peso de AgnP's. En contraste con los resultados obtenidos en quitosano puro neutralizado y no neutralizado el efecto antibacteriano de los compuestos CS/AgnP's no neutralizados tienen un efecto menor comparados con los neutralizados. Al parecer, el proceso de neutralización en los compuestos CS/AgnP's origina un mayor número de grupos $-NH_2$, lo que da pie a una mayor interacción entre el quitosano y las AgnP's (ver resultados FTIR) y por ende un mayor número de nanopartículas de menor tamaño presentes en el sistema. Esto puede disminuir el número y/o tamaño de los aglomerados al aumentar la concentración lo cual afecta directamente a la actividad antibacteriana y es por esta razón que comparado con la concentración más efectiva en quitosano puro (3% en peso) en los compuestos CS/AgnP's esta concentración aumenta a 10% en peso.

Estos resultados llevan a la conclusión de que el proceso de neutralización en los compuestos CS/AgnP's favorece la inhibición, y el tamaño de partícula es el parámetro de mayor importancia que afecta la actividad antibacteriana de los compuestos.

8. CONCLUSIONES

Las películas de bionanocompuestos CS/AgnP's obtenidas en este trabajo fueron estables, y los resultados obtenidos a partir de su caracterización fisicoquímica brindaron información importante sobre su estabilidad y su capacidad antibacteriana. En este sentido es necesario señalar la importancia del Análisis Dinámico Mecánico (DMA), de la Espectroscopía Dieléctrica (DS) y del Análisis Termogravimétrico (TGA) con los cuales fue posible determinar la temperatura de transición vítrea T_g del quitosano y sus compuestos. Esta temperatura es de gran importancia para estudiar la naturaleza de los procesos de relajación de bio-nanocompuestos y que a su vez ayuda a entender el comportamiento macroscópico de dichos compuestos.

Por medio de la Espectroscopía de Impedancia Eléctrica fue posible reforzar la teoría de que los grupos amino protonados son los responsables del efecto bactericida; A través de la EIE es posible determinar un menor o mayor número de grupos $R-NH_3^+$ con el cálculo de la energía de activación de la relajación tipo σ , relacionada con el movimiento de iones.

Para el quitosano puro neutralizado (NCS) y no neutralizado (NNCS), resultó evidente que el que el NNCS posee un mayor número de grupos amino protonados y mayor humedad, lo que origina mejores condiciones para que las películas sean más letales para las bacterias, observándose este efecto más marcado en las bacterias Gram positivas las cuales fueron más susceptibles a establecer interacciones electrostáticas con estos compuestos antimicrobianos, ya que poseen grupos fosfato con carga negativa que da lugar a una pared más electronegativa y mayores interacciones con los grupos $R-NH_3^+$ del quitosano.

Por otro lado, en los compuestos CS/AgnP's, la interacción del quitosano con las nanopartículas de plata fue estudiada por medio de la espectroscopía dieléctrica, el análisis infrarrojo y la Microscopía Electrónica de Barrido. El análisis

por Espectroscopía de Infrarrojo brindo información importante acerca de la interacción química de las AgnP's y el quitosano, la cual se establece a través de los grupos $-NH_2$, $-OH$ y $-CONH_2$ del biopolímero; y esto a su vez origina redistribuciones evidentes de las bandas de vibración de IR de estos grupos. Estas interacciones modifican considerablemente la habilidad de absorción de agua del quitosano, lo que a su vez afecta la capacidad antibacteriana de las películas compuestas CS/AgNP's.

A través del análisis morfológico por medio de SEM se observó que por arriba del 3% en peso de AgNP's, el número de aglomerados es significativo, y esto cambia directamente la capacidad de absorción de humedad y la actividad antibacteriana de los bionanocompuestos.

Por su parte, los resultados dieléctricos muestran que las películas de quitosano puro no neutralizado contiene una mayor cantidad de grupos $R-NH_3^+$ en comparación con las películas neutralizadas lo que ofrece una mayor actividad antibacteriana, ya que como se mencionó anteriormente, la interacción quitosano-bacteria se atribuye a las interacciones electrostáticas entre los sitios catiónicos del quitosano proporcionados por estos grupos amino protonados y las zonas de carga negativa de la pared celular además de la presencia de AgNP's las cuales también resultan ser dañinas para los microorganismos. En las películas no neutralizadas el elevado número de grupos $R-NH_3^+$ produce un mayor efecto bactericida.

En el caso de los compuestos CS/AgNP's, el efecto bactericida del quitosano es más pronunciado respecto del quitosano puro, debido a un efecto sinérgico de los grupos amino protonados del quitosano y la AgNP's. Es posible observar una fuerte influencia de tamaño de partícula de AgNP's y los aglomerados dependiendo de la concentración de AgNP's sobre su capacidad antibacteriana. La concentración óptima de AgNP's para la inhibición del crecimiento de microorganismos resultó ser 3% en peso en el caso de las

películas neutralizadas. Esta concentración de AgnP's es un punto de inflexión para todas las propiedades de los bionanocompuestos; la conductividad, la formación de aglomerados y la energía de activación para el movimiento de iones. Este hecho resulta de gran importancia para relacionar el efecto antibacteriano con la conductividad de las películas y de esta forma es posible medir de forma indirecta la capacidad antibacteriana de estos compuestos sin realizar cultivos bacterianos.

Para las películas CS/AgnP's no neutralizadas, un 10% en peso de AgnP's es la concentración óptima para la inhibición, debido a una mayor interacción entre las AgnP's y los grupos $-NH_2$ lo que a su vez afecta el tamaño de partícula.

Finalmente, fue posible demostrar que existe una relación real entre las mediciones dieléctricas y la capacidad antibacteriana del quitosano y sus compuestos lo cual podría ser muy atractivo para aplicaciones en biosensores.

9. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Daeyeon L., Cohen R.E., Rubner M.F., Antibacterial Properties of Ag Nanoparticle Loaded Multilayers and Formation of Magnetically Directed Antibacterial Microparticles. American Chemical Society 2005; 21: 9651-9659.
- [2] Potara M., Jakab E., Damert A., Popescu O., Canpean V., Astilean S., "Synergistic antibacterial activity of chitosan-silver nanocomposites on *Staphylococcus aureus*" Nanotechnology 2010; 22: 1-9.
- [3] Singh M., Singh S., Prasad S., Gambhir I. S., Nanotechnology in medicine and antibacterial effect of silver nanoparticles. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures 2008; 3 (3):115-122.
- [4] Mahendra R., Alka Y., Aniket G., Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. Biotechnology Advances 2009; 27: 76-83.
- [5] González Campos J. Betzabe, del Río Rosa E., Compuestos de quitosano/nanopartículas de Ag: conductividad y mecanismos de relajación y su relación con sus propiedades macroscópicas. Superficies y Vacío 2012; 25 (1): 43-48.
- [6] L'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (Afssaps), Evaluation biologique des dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux. Rapport scientifique 2011; 5: p 10, 13, 14.
- [7] Henriette M.C. de Azeredo, Nanocomposites for food packaging applications. Food Research International 2009; (42): 1240-1253.
- [8] Serena Domingo P. A., Nanociencia y nanotecnología: aspectos generales, Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid pp 1-12.
- [9] Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (afsset). Les nanomatériaux : Évaluation des risques liés aux nanomatériaux pour la population générale et pour l'environnement. Édition scientifique-Agents physiques 2010; p. 35.

[10] Morales J., Morán J., Quintana M., Estrada W., Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata por la ruta sol-gel a partir de nitrato de plata. SocQuím 2009; 75 (2):177-184.

[11] Casañas Pimentel R. G., Síntesis de nanotransportadores poliméricos de nanopartículas de plata: Evaluación de su toxicidad en líneas celulares de origen neoplásico [Tesis de Maestría]. México, D.F.: Centro de investigación en ciencia aplicada y tecnología avanzada, Instituto Politécnico Nacional; 2009.

[12] Aguilar Méndez M. A., Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata: Efecto sobre *Colletotrichum gloeosporioides*. [Tesis Doctoral]. México, D.F.: Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada, Instituto Politécnico Nacional; 2009.

[13] Morones Ramírez R., El uso de la plata en los antibióticos del futuro. Revista Digital Universitaria 2009; 10 (10): 1-13.

[14] Lárez Velásquez C., Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. Avances en Química 2006; 1(2): 15-21.

[15] Balanta D., Grande D.C., Zuluaga F., Extracción, identificación y caracterización de quitosano del micelio de *Aspergillus niger* y sus aplicaciones como material bioadsorbente en el tratamiento de aguas. Revista Iberoamericana de Polímeros 2010; 11(5): 297-316.

[16] Lárez Velásquez C., Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. Revista Iberoamericana de Polímeros 2003; 4(2): 91-109.

[17] Expósito Harris R. Quitosano, un biopolímero con aplicaciones en sistemas de liberación controlada de fármacos. [Tesis Doctoral]. Madrid: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Universidad Complutense de Madrid; 2009.

[18] Rodríguez Pedroso A., Ramírez Arrebato T., Rivero González M.A., Bosquez Molina D., Barrera Necha E., Bautista Baños L. L., Propiedades químico estructurales y actividad biológica de la quitosana en microorganismos fitopatógenos. Revista Chapingo. Serie horticultura 2009; 15 (3): 307-317.

[19] Rhoades J., Rastall B., Chitosan as antimicrobial agent. *Food Technology International*; pp. 31-32.

[20] Chung Y., Su Y., Chen C., Jia G., Wang H., Wu J.C., Lin J., Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacol Sin* 2004; 25 (7): 932-936.

[21] Wei D., Sun W., Qian W., Ye Y., Ma X., The synthesis of chitosan-based silver nanoparticles and their antibacterial activity. *Carbohydrate Research* 2009; 344: 2375-2382.

[22] Darder M., Aranda P., Ruiz Hitzky E., Bio-nanocomposites: nuevos materiales ecológicos, biocompatibles y funcionales. *An. Quím.* 2007; 103 (1): 21-29.

[23] Huang H., Qiang Y., Xiurong Y., Preparation and characterization of metal-chitosan nanocomposites. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2004; 39: 31-37.

[24] Wei D., Qian W., Facile synthesis of Ag and Au nanoparticles utilizing chitosan as a mediator agent. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2008; 62: 136-142.

[25] Liyi H., Dai T., Xuan Y., George P. Tegos, R. Hamblin M., Synergistic Combination of Chitosan Acetate with Nanoparticle Silver as a Topical Antimicrobial: Efficacy against Bacterial Burn Infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2011; 55 (7): 3432-3438.

[26] Furno F., Morley K. S., Wong B., Barry L. S., Polly L. A., Steven M. H., Bayston R., Brown P. D., Winship P.D., Reid H. J., "Silver nanoparticles and polymeric medical devices: a new approach to prevention of infection?". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2004; 254: 1019-1024.

[27] Madhumathi K. P. T., Kumar S. S., Abhilash V., Sreeja H., Tamura K., Manzoor S. V., Jayakumar N. R., "Development of novel chitin/nanosilver composite scaffolds for wound dressing applications". *J Mater Sci: Mater Med.* 2009; 10: 3877.

[28] Mei N., Xuguang L., Jinming D., Husheng J., Liqiao W., Bingshe X., "Antibacterial activity of chitosan coated Ag-loaded nano-SiO₂ composites". *Carbohydrate Polymers.* 2009; 78: 54-59.

[29] Yoksana R., Chirachanchaic S., "Silver nanoparticles dispersing in chitosan solution: Preparation by x-ray irradiation and their antimicrobial activities". *Materials Chemistry and Physics* 2009; 115: 296-302.

[30] Morezejewska Z., Zarzycki R., Sielski J., Synthesis of silver nanoparticles in a chitosan solution. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its derivatives* 2010; 15: 63-72.

[31] Saifuddin N., Nian C. Y., Zhan L. W., Ning K. X., "Chitosan-Silver Nanoparticles Composite as Point- of- use Drinking Water Filtration System for House chold to Remover Pesticides in Water" *Asian J. Biochem.* 2011 6(2): 142-159.

[32] Krishna Raoa K.S.V., Ramasubba Reddya P., Leeb Y., Kimc C., "Synthesis and characterization of chitosan-PEG-Ag nanocomposites for antimicrobial application". *Carbohydrate Polymers* 2012; 87: 920-925.

[33] Pinto R., Fernandes S., Freire C., Sadocco P., Causio J., PascoalNeto C. B., Trindade T., "Antibacterial activity of optically transparent nanocomposite films based on chitosan or its derivatives and silver nanoparticles" *Carbohydrate Research* 2012; 348: 77-83.

[34] Cárdenas G., Díaz J., Preparation and characterization of films based on chitosan-silver complexes. *Acta Microscopica* 2007; 16 (1-2): 152.

[35] Portilla Zea K. G. Estudio integral de las relajaciones térmicas del alcohol polivinílico (PVA). [Tesis de Licenciatura]. México, Morelia Michoacán: Facultad de Ingeniería Química, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; 2011.

[36] González Campos J. B.; Prokhorov E., Luna Bárcenas G., Fonseca García A., Sanchez I.C., Dielectric Relaxations of Chitosan: The Effect of Water on the α -Relaxation and the Glass Transition Temperature. *J PolymSci: PartB: PolymPhys* 2009; 47: 2259.

[37] Viciosa M. T., Dionisio M., Silva R. M., Mano J. F., Molecular motions in chitosan studied by dielectric relaxation spectroscopy. *Biomacromolecules* 2004; 5(5):2073-2078.

[38] Kong M., Chen X. G., Xing K., Park H. J., Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*.2010; 144: 51-63.

[39] Rhim J. W., Hong S. I., Park H. M., Perry, K. W., Preparation and Characterization of Chitosan-Based Nanocomposite Films with Antimicrobial Activity. *Agric Food Chem* 2006; 54: 5814-5822.

[40] González Campos J. B., Prokhorov E., Luna Bárcenas G., Sanchez I. C., Lara Romero J., Mendoza Duarte M. E., Villaseñor F., Guevara Olvera L., Chitosan/Silver Nanoparticles Composite: Molecular Relaxations Investigation by Dynamic Mechanical Analysis and Impedance Spectroscopy. *J Polym Sci:Part B: Polym Phys* 2010; 48:739.

[41] Quemeneur F., Rinaudo M., Pépin Donat B., Influence of Molecular Weight and pH on Adsorption of Chitosan at the Surface of Large and Giant Vesicles. *Biomacromolecules* 2008; 9: 396-402.

[42] Psarras G.C., Hopping conductivity in polymer matrix-metal particles composites. *Compos Part A: ApplSciManuf* 2006; 37: 1545.

[43] Sakurai K., Maegawa T., Takahashi T., Glass transition temperature of chitosan and miscibility of chitosan/poly(N-vinyl pyrrolidone) blends. *Polymer* 2000; 41: 7051-7056.

[44] Lazaridou A., BiliaderisC. G., Thermophysical properties of chitosan, chitosan–starch and chitosan–pullulanfilms near the glass transition. *Carbohydrate Polymers* 2002; 48: 179-190.

[45] Quijada Garrido I., Iglesias Gonzalez V., Mazón Arechederra J. M., Barrales Rienda J. M., The role played by the interactions of small molecules with chitosan and their transition temperatures. Glass-forming liquids: 1, 2, 3-Propantriol (glycerol). *Carbohydr Polym* 2007; 68: 173–186.

[46] Prokhorov E., Luna Bárcenas J. G., González Campos J. B., Sanchez I. C., Conductivity Mechanisms in a Composite of Chitosan-Silver Nanoparticles. *Mol. Cryst. Liq. Cryst* 2011; 536:256-264.

[47] Raju, G. G. Dielectrics in Electrical Fields; Marcel Dekker Inc.: New York, 2003.

[48] Einfeldt J., Meißner D., Kwasniewski A., Contributions to the molecular origin of the dielectric relaxation processes in polysaccharides the high temperature range. *J Non-Cryst Solids* 2003; 320: 40-55.

[49] Fernandez Saiz J., Lagaron J. M., Film-forming process and biocide assessment of high-molecular-weight chitosan as determined by combined ATR-FTIR spectroscopy and antimicrobial assays. *Biopolymers* 2006; 83:577-583.

[50] Qi L., Xu Z., Jiang X., Hu C., Zou X., Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohyd Res* 2004; 339: 2693-2700.

[51] Chatelet C., Damour O., Domard A., Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials* 2001; 22: 261-268.

[52] Amaral I. F., Granja P. L., Barbosa M. A. J., Chemical modification of chitosan by phosphorylation: an XPS, FT-IR and SEM study *Biomater.Sci. Polymer* 2005; 16(12):1575-93.

[53] Rabea E. I., Badawy M. E. T., Stevens C. V., Smagghe G., Steurbaut W., Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules* 2003; 4(6): 1457–1465.

[54] Fernandez Saiz P., Lagaron J. M., Ocio M. J., Optimization of the biocide properties of chitosan for its application in the design of active films of interest in the food area. *Food Hydrocolloids* 2009; 23 (3):913-921.

[55] Lok C. N., Ho C. M., Chen R., He Q. Y., Yu W. Y., Sun H., Tam P. K. H., Chiu J. F., Che C. M., Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *J Proteome Res* 2006; 5:916-924.

[56] Irwin P., Martin J., Ly-Huong N., He Y., Gehring A., Chen C. Y., Antimicrobial activity of spherical silver nanoparticles repared using a biocompatible macromolecular capping agent: evidence for induction of a greatly prolonged bacterial lag phase. *J. of Nanobiotechnology* 2010; 8: p.34.

[57] Matsumura Y., Yoshikata K., Kunisaki S., Tsuchido T., Mode of Bactericidal Action of Silver Zeolite and Its Comparison with That of Silver Nitrate. *ASM Applied and Environmental Microbiology* 2003; 69: 4278-42781.

[58] Morones J. R., Elechiguerra J. L., Camacho A., Holt K., Kouri J. B., Tapia R. J., Yacaman M. J., The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 2005; 16(10): 2346-2353.

[59] Varner, Katrina, State of the Science - Everything Nanosilver and More. EPA August 2010; 95: p11.