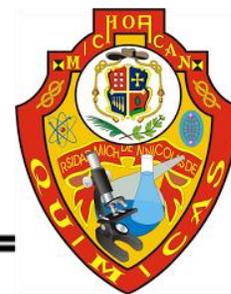




**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE  
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA**

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE BIONANOCOMPUESTOS  
QUITOSANO/AFININA-AgNPs MEDIANTE ELECTROSPINNING**

**T E S I S**

**QUE PRESENTA:  
PERLA EDITH HERNÁNDEZ MARCELO**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICA FARMACOBIOLOGA**

**ASESORA:**

**Doctora en Ciencias JANETT BETZABE GONZÁLEZ CAMPOS**

**CO- ASESOR:**

**Doctor en Química MARIO ARMANDO GÓMEZ HURTADO**

**MORELIA, MICHOACÁN. MARZO 2015.**



## **ABSTRACT**

The present investigation research reports the synthesis of a unique chitosan based nanocomposite as a result of its coupling with the natural product affinin and silver nanoparticles (AgNPs) generated from the chemical reduction of the affinin-AgNO<sub>3</sub> complex. The complex reduction to affinin-AgNPs was carried out into acid aqueous chitosan solutions using the biopolymer itself as reducing, dispersant and stabilizing agent, as well as solar radiation as the energy source to induce the chemical reduction of the starting complex.

The final CTS/affinin-AgNPs composite is presented as nanofibers obtained from the processing of the previously reduced polymer solutions through the Electrospinning process. After several assays, the suitable parameters of the Electrospinning process as well as those of the solutions to generate composite nanofibers of good quality were determined.

The synthesis of AgNPs was confirmed through UV-Vis spectroscopy, the chemical interactions between the polymer and NPs were analyzed via Fourier Transformed Infrared Spectroscopy (FT-IR). The nanoparticles distribution along nanofibers as well as nanofibers' morphology and quality were observed by means of Field Emission Scanning Electron Microscopy (FESEM). Finally, microbiological testing against common bacteria was carried out resulting in enhanced antimicrobial activity.

The proposed methodology allows the successful production of CTS/affinin-AgNPs composites with antibacterial activity. The proposed synthesis process is economic, efficient, fast, easy and ecofriendly.

**Key words:** affinin-AgNO<sub>3</sub> complex, affinin, AgNPs, chitosan, electrospinning.

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación reporta la síntesis de nanocompuestos únicos base quitosano (CTS) como resultado de su acoplamiento con el producto natural afinina y nanopartículas de plata (AgNPs) generadas a partir de la reducción del complejo afinina-AgNO<sub>3</sub>. La reducción del complejo antes mencionado a afinina-AgNPs se llevó a cabo en soluciones acuosas ácidas de quitosano empleando al mismo biopolímero como agente reductor, dispersante y estabilizante, así como radiación solar como fuente de energía para inducir la reducción química del complejo de partida.

El compuesto final CTS/afinina-AgNPs se presenta en forma de nanofibras las cuales fueron obtenidas mediante el procesamiento en un equipo de Electrospinning de las soluciones sometidas previamente a reducción química. Después de varios ensayos, se determinaron los parámetros adecuados tanto del equipo como de las soluciones poliméricas para la generación de nanofibras compuestas de buena calidad.

La síntesis de las AgNPs fue confirmada por medio de Espectroscopia UV-Vis, las interacciones químicas entre el polímero y las nanopartículas metálicas (NPMs) fueron analizadas vía Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR). Por medio de la técnica de Microscopía Electrónica de Barrido por Emisión de Campo (FESEM) se observó la distribución de las nanopartículas a lo largo de las nanofibras de las cuales a su vez se analizó su morfología y calidad. Finalmente, se realizaron ensayos microbiológicos con especies bacterianas comúnmente encontradas en el ambiente, lo que resultó en una actividad antimicrobiana potenciada.

Gracias a la metodología utilizada, se obtuvieron exitosamente nanocompuestos de CTS/afinina-AgNPs con actividad antimicrobiana. El proceso de síntesis propuesto es económico, eficiente, rápido, fácil y sobretodo amigable con el medio ambiente.

**Palabras clave:** complejo afinina-AgNO<sub>3</sub>, afinina, AgNPs, quitosano, electrohilado.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biopolímeros del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la asesoría de la Doctora Janett Betzabe González Campos y en el Laboratorio de Productos Naturales con la co-asesoría del D.Q. Mario Armando Gómez Hurtado. Con el financiamiento de los proyectos CONACYT 150767 y CIC-UMSNH, y como becaria con número de registro 21582 del proyecto CONACYT 150767.

Parte de este trabajo fue presentado en el 3rd US-México Symposium on Advances in Polymer Science y XXX Congreso Nacional de la Sociedad Polimérica de México, celebrado del 3 al 6 de Diciembre de 2014 en Nuevo Vallarta, Nayarit y en el 3er Congreso del Verano Nicolaita, celebrado del 27 al 29 de Agosto de 2014 en Morelia, Michoacán.

## **DEDICATORIA**

A Dios, porque sus tiempos son perfectos, sus decisiones acertadas y a pesar de todos mis errores me ha llevado al camino correcto.

A mis padres, Martín Hernández Ochoa y María Olga Marcelo Huerta por darme la vida, por cuidarme, por amarme y además por brindarme todo el apoyo posible y existente.

A mis hermanos, Olga María Hernández Marcelo, Martín Hernández Marcelo y Diana Laura Bonifacia Hernández Marcelo, por compartir toda clase de experiencias, por tener aficiones similares y otras tantas diferentes.

A mis abuelos, Bonifacia Huerta Lázaro, Jonás Marcelo Rojas, María Asunción Ochoa Piedra, Raymundo Hernández Hernández por defenderme siempre y quererme como nadie más lo haría, como un abuelo a su nieto, y a mi abuelito Filemón Ventura Alonso que donde quiera que esté siempre pienso en él.

A mi familia en general, por brindarme ternura, apoyo y amor todo este tiempo.

A Griselda Popoca Méndez, gracias por todo, por ayudarme a decidirme acerca de aceptar este proyecto y por formar una parte importante durante mi carrera.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco especialmente mis asesores de tesis, la D.C. J. Betzabe González Campos y el D.Q. Mario Armando Gómez Hurtado, por la oportunidad y el placer de trabajar con ellos. Por la confianza depositada, por la paciencia, la ayuda brindada, el apoyo y las propuestas que hicieron posible este proyecto. Gracias por resolver mis dudas, por guiarme en todo momento, por transmitirme sus conocimientos y por adentrarme en este campo hermoso de la investigación.

A mis sinodales, la Dra. Gabriela Rodríguez García, la Dra. Rosa Elva del Río Torres, la Dra. Yliana López Castro, la Dra. Judit Araceli Aviña Verduzco y a la M.C. Melissa Tapia Juárez, por los tips, por compartir conocimientos, por sus consejos y correcciones acertadas.

Al Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH, al D.Q. Juan Pablo García Merinos y al personal de Resonancia Magnética Nuclear por la ayuda y apoyo en las técnicas de caracterización. Al Instituto de Investigaciones Metalúrgicas de la UMSNH, por el apoyo, ayuda y conocimiento brindado en la caracterización de las nanofibras.

Al Laboratorio EDULAB, en especial al Q.F.B. Abel Suárez Castro por permitir el espacio para la realización de las pruebas antimicrobianas y por las facilidades brindadas, el uso de equipos, cepas y material básico. Y al laboratorio Estatal de Salud Pública por contribuir al desarrollo de este trabajo proporcionando la cepa *P. aeruginosa*. Al Hospital de la Mujer, en especial a las químicas Rosario Chávez y Juanis Mendiola por la donación de placas MH, por todos los conocimientos compartidos, por sus enseñanzas, explicaciones y apoyo brindado.

A mis padres y hermanos, porque a pesar de todo seguimos juntos y tengo la dicha de tenerlos a mi lado. Por el gusto de ver crecer a mis nuevos sobrinitos (Cristian y bebé). A todos mis familiares, por la paciencia que me tuvieron todo este tiempo, por mimarme y darme ánimos para seguir adelante en los momentos más agobiantes. Por toda la ayuda económica y emocionalmente.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Biopolímeros y laboratorios vecinos, Fer, Ale, Jessica Steffany, May, Miguel, Ilse y Jessy por guiarme en mis primeros pasos, brindarme su amistad, por los tips y conocimientos transmitidos. Así como a mis amigos Pepe y Basilio por su apoyo moral y ánimos. Finalmente a Gris que con su ayuda indispensable y presencia, el tiempo pasaba volando.

A todos mis maestros, porque cada uno de ellos sentó las bases de mi profesión y sin su enseñanza no estaría mi base de conocimientos completa.

## ÍNDICE GENERAL

<a href="#"><u>ÍNDICE DE FIGURAS.....</u></a>	XI
<a href="#"><u>ÍNDICE DE ESQUEMAS.....</u></a>	XII
<a href="#"><u>ÍNDICE DE TABLAS.....</u></a>	XII
<a href="#"><u>LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS .....</u></a>	XIII
<a href="#"><u>LISTA DE FÓRMULAS QUÍMICAS.....</u></a>	XV
<a href="#"><u>1. INTRODUCCIÓN.....</u></a>	1
<a href="#"><u>2. JUSTIFICACIÓN.....</u></a>	4
<a href="#"><u>3. HIPÓTESIS.....</u></a>	5
<a href="#"><u>4. OBJETIVO GENERAL.....</u></a>	6
<a href="#"><u>4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</u></a>	6
<a href="#"><u>5. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO.....</u></a>	7
<a href="#"><u>5.1 MATERIALES TEXTILES Y NANOPARTÍCULAS (NPS).....</u></a>	7
<a href="#"><u>5.2 NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AGNPS).....</u></a>	8
<a href="#"><u>5.2.1 PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS DE LAS AGNPS.....</u></a>	10
<a href="#"><u>5.3 POLÍMEROS EN LA SÍNTESIS DE AGNPS.....</u></a>	10
<a href="#"><u>5.4 PROPIEDADES DEL QUITOSANO.....</u></a>	12
<a href="#"><u>5.4.1 NANOFIBRAS DE QUITOSANO Y APLICACIONES.....</u></a>	13
<a href="#"><u>5.5 TEORÍA DEL ELECTROSPINNING.....</u></a>	15
<a href="#"><u>5.5.1 PARÁMETROS A CONSIDERAR EN EL PROCESO DE ELECTROSPINNING.....</u></a>	17
<a href="#"><u>5.5.1.1 CONCENTRACIÓN DE LA SOLUCIÓN POLIMÉRICA.....</u></a>	17
<a href="#"><u>5.5.1.2 PESO MOLECULAR Y VISCOSIDAD.....</u></a>	17
<a href="#"><u>5.5.1.3 TENSIÓN SUPERFICIAL.....</u></a>	18
<a href="#"><u>5.5.1.4 CONDUCTIVIDAD (DENSIDAD DE CARGA SUPERFICIAL).....</u></a>	18
<a href="#"><u>5.5.1.5 FUERZA DE EMPUJE, INTENSIDAD DE CAMPO ELÉCTRICO Y LA DISTANCIA PUNTA-COLECTOR.....</u></a>	18
<a href="#"><u>5.5.1.6 COMPOSICIÓN Y LA GEOMETRÍA DEL COLECTOR.....</u></a>	19
<a href="#"><u>5.6 APLICACIONES DE LAS NANOFIBRAS.....</u></a>	19
<a href="#"><u>5.7 PRODUCTOS NATURALES COMPUESTOS A BASE DE NANOFIBRAS.....</u></a>	19
<a href="#"><u>5.7.1 <i>Heliopsis longipes</i>.....</u></a>	20
<a href="#"><u>5.8 USO DE POLÍMEROS Y PRODUCTOS NATURALES.....</u></a>	21
<a href="#"><u>6. MATERIALES Y METODOLOGÍA.....</u></a>	23
<a href="#"><u>6.1 Materiales, equipo y reactivos.....</u></a>	23
<a href="#"><u>6.2 Obtención de la afinina.....</u></a>	23
<a href="#"><u>6.3 Obtención del complejo de coordinación afinina-AgNO<sub>3</sub>.....</u></a>	24
<a href="#"><u>6.4 Preparación de las Soluciones.....</u></a>	24
<a href="#"><u>6.4.1 Solución de CTS 2% en Peso en Ácido Acético 1% en Peso.....</u></a>	24
<a href="#"><u>6.4.2 Solución de CTS con AgNPs (solución reducida).....</u></a>	25
<a href="#"><u>6.4.3 Solución de CTS con afinina.....</u></a>	25
<a href="#"><u>6.4.4 Solución de CTS con AgNPs y afinina.....</u></a>	25

6.4.5 Solución de CTS con complejo de coordinación afinina-AgNO <sub>3</sub> .....	25
6.5 Síntesis de nanofibras.....	26
6.6 Caracterización de las nanofibras y AgNPs.....	26
6.6.1 Espectroscopia Molecular de Absorción UV-Vis.....	26
6.6.2 Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR)..	27
6.6.3 Microscopía Electrónica de Barrido de Emisión de Campo (FESEM)....	27
6.6.4 Pruebas antimicrobianas.....	27
6.6.4.1 Cepas examinadas.....	27
6.6.4.2 Preparación de los inóculos y muestras.....	27
6.6.4.3 Inoculación de las cepas y muestras en los medios.....	28
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
7.1 Obtención de la afinina.....	29
7.2 Obtención del complejo de coordinación afinina-AgNO <sub>3</sub> .....	32
7.3 Reducción de las soluciones y síntesis de AgNPs.....	35
7.4 Preparación de biopelículas de CTS y soluciones listas para electrohilar.....	36
7.5 Síntesis de nanofibras.....	37
7.6 Caracterización de las nanofibras y AgNPs.....	39
7.6.1 Espectroscopia Molecular de Absorción UV-Vis.....	39
7.6.2 Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR)..	41
7.6.3 Microscopía Electrónica de Barrido Emisión de Campo (FESEM)....	44
7.6.4 Determinación de la actividad antimicrobiana.....	47
8. CONCLUSIONES.....	50
9. PERSPECTIVAS.....	51
10. BIBLIOGRAFÍA.....	52

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1</b> <a href="#">Escala comparativa de tamaños en los materiales.....</a>	8
<b>Figura 2</b> <a href="#">Unidad y estructura molecular del CTS.....</a>	12
<b>Figura 3</b> <a href="#">Configuración del proceso de electrohilado.....</a>	16
<b>Figura 4</b> <a href="#">Estructura química de la afinina.....</a>	20
<b>Figura 5</b> <a href="#">Ejemplos de plantas usadas para la síntesis AgNPs.....</a>	22
<b>Figura 6</b> <a href="#">Proceso de obtención de la afinina.....</a>	29
<b>Figura 7</b> <a href="#">Cromatofolios donde se aprecia un <math>R_f=0.35</math> en la polaridad hexanos-AcOEt (7:2).....</a>	29
<b>Figura 8</b> <a href="#">Espectro IR obtenido de la afinina.....</a>	30
<b>Figura 9</b> <a href="#">Espectro de RMN de <math>^1\text{H}</math> a 400 MHz (<math>\text{CDCl}_3</math>) de la afinina y estructura.....</a>	31
<b>Figura 10</b> <a href="#">Obtención del complejo de coordinación afinina-<math>\text{AgNO}_3</math>.....</a>	32
<b>Figura 11</b> <a href="#">Complejo de coordinación afinina-<math>\text{AgNO}_3</math>.....</a>	33
<b>Figura 12</b> <a href="#">IR obtenido del complejo de coordinación afinina-<math>\text{AgNO}_3</math>.....</a>	33
<b>Figura 13</b> <a href="#">Espectro de RMN de <math>^1\text{H}</math> a 400 MHz (<math>\text{DMSO-}d_6</math>) del complejo de coordinación afinina-<math>\text{AgNO}_3</math>.....</a>	34
<b>Figura 14</b> <a href="#">Síntesis de AgNPs.....</a>	36
<b>Figura 15</b> <a href="#">Preparación de la solución a electrohilar.....</a>	37
<b>Figura 16</b> <a href="#">Proceso de electrohilado.....</a>	37
<b>Figura 17</b> <a href="#">Nanofibras obtenidas.....</a>	38
<b>Figura 18</b> <a href="#">Espectros UV-Vis que confirman la producción de AgNPs.....</a>	41
<b>Figura 19</b> <a href="#">Espectros obtenidos IR del compuesto CTS/afinina-AgNPs.....</a>	42
<b>Figura 20</b> <a href="#">Espectros IR de nanofibras de CTS puro, CTS-afinina y CTS/afinina-AgNPs.....</a>	43
<b>Figura 21</b> <a href="#">Micrografías FESEM de las nanofibras sintetizadas.....</a>	44
<b>Figura 22</b> <a href="#">Probables diámetros medidos de AgNPs.....</a>	46
<b>Figura 23</b> <a href="#">Micrografías del análisis elemental de las nanofibras.....</a>	47
<b>Figura 24</b> <a href="#">Pruebas antimicrobianas.....</a>	49

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

	Página
<b>Esquema 1</b> <a href="#">Métodos de síntesis de nanopartículas.....</a>	9
<b>Esquema 2</b> <a href="#">Mecanismos de síntesis de NPs (M<sup>+</sup>= ion metálico).....</a>	11
<b>Esquema 3</b> <a href="#">Preparación de AgNPs por medio de la reducción del AgNO<sub>3</sub> en solución de CTS.....</a>	11
<b>Esquema 4</b> <a href="#">Proceso general de síntesis de nanofibras de CTS/afinina-AgNPs.....</a>	22
<b>Esquema 5</b> <a href="#">Estructuras propuestas en base al patrón de fragmentación y estructura del complejo de coordinación afinina-AgNO<sub>3</sub>.....</a>	35

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
<b>Tabla 1.</b> <a href="#">Muestras analizadas en los ensayos de actividad antimicrobiana.....</a>	28
<b>Tabla 2.</b> <a href="#">Comparación de las condiciones óptimas de electrohilado para las diferentes soluciones.....</a>	38
<b>Tabla 3</b> <a href="#">Halos de inhibición obtenidos en el ensayo microbiológico.....</a>	48

## LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

°C	Grados Celsius
<sup>1</sup> H	De protón
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gamma
$\lambda$	Longitud de onda
$\mu$	Micro
$\mu$ L	Microlitro
$\mu$ m	Micrómetro o micra
$\tilde{\nu}$	Número de onda
%	Porcentaje
®	Marca registrada
+	Signo más
AcOH	Ácido acético
AbC	Antibiótico control
AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AgNPs	Nanopartículas de plata
AINEs	Anti-inflamatorios no esteroideos
ATF	Ácido trifluoroacético
ATR	Reflexión Total Atenuada
BG(-)	Bacilo Gram negativo
CCF	Cromatografía en capa fina
CG(+)	Coco Gram positivo
cm	Centímetro
cm <sup>-1</sup>	1/cm o centímetro inverso
COX-2	Ciclooxigenasa 2
CTS	Quitosano
d	Distancia
DA	Grado de desacetilación
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetil sulfóxido
DL <sub>50</sub>	Dosis letal 50
EC	Extracto crudo
EDS	Espectroscopia de Energía Dispersiva
EGF	Factor de crecimiento de epitelio
FESEM	Microscopía Electrónica de Barrido de Emisión de Campo
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FT-IR	Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier
Fm	Flujo másico

g	Gramos
g/mol	Gramos por mol
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
IR	Infrarrojo
KV	Kilovoltios
KeV	Kiloelectronvolts
M	Molar
M°	Metal
M <sup>+</sup>	Ión metálico
MH	Müller-Hinton
MHz	Megahertz
mL	Mililitro
mL/min	Mililitros por minuto
mM	Milimolar
mm	Milímetro
nm	Nanómetros
NPMs	Nanopartículas metálicas
NPs	Nanopartículas
PEG	Polietilenglicol
pH	Potencial de hidrógeno
PHBV	Poli(hidroxibutirato-co-hidrovalerato)
PM	Peso molecular
PMMA	Polimetil metacrilato
ppm	Partes por millón
PTBAM	Poli [2-( <i>tert</i> -butilaminoetil)metacrilato]
PVA	Alcohol polivinílico
PVP	Polivinil pirrolidona
R <sub>F</sub>	Factor de retención
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
Sol.	Solución
spp.	Sin especie/especies
SPR	Resonancia de Plasmón de Superficie
TGF	Factor de crecimiento transformante
UA	Unidad de absorbancia
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-visible
WV	Peso del vial

## FÓRMULAS QUÍMICAS Y ELEMENTOS

Ag	Plata
Ag <sup>+</sup>	Plata en estado iónico
Ag <sup>0</sup>	Plata metálica
AgNO <sub>3</sub>	Nitrato de plata
Au	Oro
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de calcio
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
CF <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>	Ion trifluoroacetato
C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	Hexano
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
CH <sub>3</sub> CN	Acetonitrilo
CH <sub>3</sub> OH	Metanol
HCOOH	Ácido fórmico
FeCl <sub>3</sub>	Cloruro férrico
H <sub>2</sub> O	Agua
HCl	Ácido clorhídrico
NaCl	Cloruro de sodio
NaBH <sub>4</sub>	Borohidruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NH <sub>2</sub>	Grupo amino
NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	Grupo amino protonado
OH	Grupo hidroxilo
P	Fósforo
S	Azufre

## 1. INTRODUCCIÓN

Los nanocompuestos son compuestos multifásicos donde una de las fases tiene una, dos o tres dimensiones de menos de 100 nm. Su clasificación suele ser en función del tipo de matriz que se emplea por lo que se dividen en: nanocompuestos cerámicos, metálicos o poliméricos. Particularmente, los nanocompuestos poliméricos son materiales obtenidos a partir de la combinación a escala nanométrica de polímeros sintéticos o naturales con componentes tanto orgánicos como inorgánicos; sus propiedades dependen específicamente de sus constituyentes individuales, de su morfología y características interfaciales, y difieren de los compuestos convencionales debido a que éstos presentan una excepcional alta relación entre su superficie y su volumen. Dentro de los polímeros biodegradables de origen natural más utilizados para éste fin se encuentra el quitosano (CTS) [1].

Los nanocompuestos a base de CTS son efectivos para generar diferentes nanoestructuras con potencial aplicación tecnológica. Este biopolímero en forma de nanofibras (generadas mediante el proceso de Electrospinning o electrohilado) ha tenido un desarrollo prominente debido a su habilidad para formar tejidos o encapsularse, pudiendo cubrir o soportar otras sustancias químicas, lo que lo hace altamente atractivo para su aplicación principalmente en el área biomédica. El CTS es uno de los polímeros naturales más atractivos para la síntesis de nanofibras compuestas usadas para diversas aplicaciones, destacando la ingeniería de tejidos, ya que es biodegradable, económico y no es tóxico. Presenta un potencial e interesante valor económico, debido a sus versátiles actividades biológicas, propiedades mecánicas, aplicaciones químicas y su capacidad de ser combinado con otros compuestos químicos y mejorar así la relación estructura-actividad del nanocompuesto resultante. El CTS, es de gran interés debido a que posee amplias propiedades (entre ellas la biocompatibilidad) altamente deseables para su aplicación en el área biomédica [1, 2].

Actualmente la síntesis de nanocompuestos se inclina al ensamblaje de estructuras de diferente naturaleza, con lo que se esperan mejores resultados que los obtenidos con los componentes individuales [1]. Una alternativa altamente viable para la síntesis de nanofibras compuestas base CTS es su combinación con nanopartículas metálicas (NPMs), en particular con nanopartículas de plata (AgNPs). Se ha demostrado que las AgNPs presentan una alta relación superficie volumen lo que les confiere una importante actividad biológica, y aplicaciones potenciales que incluyen su uso en el ámbito de la biomedicina, electrónica, catálisis, aplicaciones ópticas, entre otras. Esto es debido a que exhiben excelentes propiedades físicas, bactericidas, químicas y biológicas, que son intrínsecas o están estrechamente relacionadas con su tamaño nanométrico [3].

Esta combinación resulta altamente conveniente ya que el CTS puede actuar fácilmente como agente reductor, estabilizante y dispersante en la síntesis de NPMs mediante el método de reducción química a partir de sales precursoras; uno de los métodos más ampliamente utilizado para este fin. Esto resulta en la generación de un material compuesto altamente atractivo y barato con potenciales aplicaciones donde la higiene es un factor clave dado que ambos componentes poseen propiedades antimicrobianas de forma individual y pueden obtenerse materiales con propiedades eléctricas, térmicas, ópticas, mecánicas, farmacológicas, reológicas y de barrera de gases mejoradas [3, 4].

En este mismo sentido, el interés del estudio de nuevas aplicaciones de productos bioactivos de origen natural ha tomado importancia debido a la necesidad de encontrar productos más eficaces, amigables en su producción y con el medio ambiente [1]. El estudio de compuestos activos presentes en las plantas se limita a la caracterización de éstos, a sus propiedades biológicas y los efectos que éstos causan en sistemas biológicos. Sin embargo, la incorporación de un compuesto bioactivo natural a un polímero para la producción de nanofibras poliméricas no ha sido reportada aún, no obstante, es un campo de investigación prometedor y diversos productos naturales podrían ser convenientemente utilizados con este fin.

En un análisis de plantas medicinales mexicanas usadas tradicionalmente, sobresalió la planta del género *Heliopsis longipes* cuyos extractos poseen propiedades biológicas significativas [5]. Esta especie vegetal presenta una gama extensa de propiedades como la anestésica, analgésica, anti-inflamatoria, anti-ulcerosa, insecticida-larvicida, anti-microbiana y cannabi-mimética. Se han atribuido estas propiedades a una amida presente en los extractos de raíces de la planta llamada afinina [5-8]. La afinina (*N*-isobutil-2*E*,6*Z*,8*E*-decatrienamida) es un compuesto bioactivo natural usado como un agente antimicrobiano, analgésico y principal componente picante presente en la planta [5, 9, 10]. De esta forma, la incorporación de afinina a la dupla compuesta por el CTS y las AgNPs para la formación de un material compuesto en forma de nanofibras representa una alternativa viable para la generación de un bionanocompuesto con propiedades biológicas potenciadas y altamente deseables en el área biomédica.

No obstante, la generación de nanofibras de CTS/afinina/AgNPs representa un reto importante debido al alto grado de dificultad en el proceso de electrohilado del CTS a causa de sus propiedades dieléctricas en solución de algunos ácidos, además se desconoce el hecho de que la afinina sea un compuesto electrohilable o si alterará significativamente los parámetros de electrohilado. Sin embargo, el lograr el electrohilado de esta triada resulta en la generación de un biomaterial atractivo [11].

Existen diferentes técnicas para la fabricación de nanofibras, siendo la más utilizada la técnica de Electrospinning (electrohilado), la cual permite obtener fibras continuas (con diámetros dentro del rango de micrones hasta unos pocos nanómetros) con una amplia superficie por unidad de área, una conveniente microporosidad interconectada y un rendimiento mecánico superior, lo cual es ampliamente atractivo a nivel biotecnológico. Por medio de esta técnica es posible procesar una diversidad de materiales, entre los que se incluyen polímeros naturales o sintéticos, cerámicos y materiales compuestos, lo que le confiere a la técnica una elevada versatilidad. Esto permite numerosas aplicaciones tales como: filtrado, catálisis, fibras compuestas para reforzar materiales, óptica y nanocables para aplicaciones en nanoelectrónica y dispositivos biomédicos. Este proceso implica el uso de un alto voltaje para crear un campo electrostático que busca atraer partículas eléctricamente cargadas de una solución o fluido polimérico desde un cono inyector hacia una superficie donde se solidifica formando micro y nanofibras, las cuales a su vez forman tejidos, encapsulando o atrapando moléculas que son liberadas en una reacción química posterior. A partir de la adecuada elección del material a procesar se pueden obtener matrices con una combinación única de una elevada área superficial específica, flexibilidad, tenacidad, y resistencia a la tracción [3].

Debido a todo lo anterior, la incorporación de AgNPs y afinina en una matriz de CTS representa una alternativa viable para la generación de un nanomaterial atractivo, novedoso y con extraordinarias aplicaciones potenciales, sobre todo en el área biomédica, al lograr un efecto sinérgico derivado de las propiedades individuales de los tres componentes propuestos.

De esta forma, en el presente trabajo de tesis se propone la síntesis de un novedoso material con potencial aplicación farmacológica, en donde: el CTS, disuelto en una solución acuosa ácida, actúa como agente reductor, dispersante y estabilizante en la síntesis de las AgNPs obtenidas por fotoreducción (empleando radiación solar como fuente de energía para llevar a cabo la reducción química) a partir de un complejo de coordinación afinina-AgNO<sub>3</sub>. Adicionalmente, se propone la obtención de nanofibras por el método de electrohilado, para la generación del material compuesto CTS/afinina-AgNPs en forma de nanofibras, determinando los parámetros óptimos del proceso de electrohilado para la obtención de nanofibras de buena calidad para esta novedosa combinación entre los que se encuentran parámetros del equipo y de la solución, incluyendo la selección del solvente.

## 2. JUSTIFICACIÓN

La síntesis de nanomateriales representa un área atractiva dentro de la nanociencia, debido a que su tamaño es la característica que les confiere sus potenciales aplicaciones. Adicionalmente, se ha tenido un gran auge en el intento por conservar el medio ambiente y los recursos naturales, siendo más marcada la necesidad de sintetizar materiales prometedores naturales por vías económicas y amigables con el medio ambiente.

La síntesis y caracterización de nanopartículas metálicas (NPMs) constituye una importante área de investigación, en especial si hablamos de las propiedades resultantes al incorporarlas con otros componentes para la formación de compuestos. Se han reportado en la última década una amplia variedad de metodologías que buscan obtener nanopartículas metálicas empleando estrategias de síntesis biológicas en las que se incluye la participación de extractos de plantas o frutos, bacterias o biomasa; sin embargo, estas estrategias han resultado complicadas, además de requerir mucho tiempo y un costo más elevado. Una reacción de acoplamiento entre un compuesto natural como la afinina y el  $\text{AgNO}_3$ , constituye una metodología alterna para la síntesis de AgNPs al llevar a cabo la reducción química del complejo afinina- $\text{AgNO}_3$  en una solución de quitosano (CTS) empleando radiación solar directa para la reducción química y donde el biopolímero pueden actuar como agente reductor, estabilizante y dispersante al mismo tiempo. Estas soluciones pueden ser posteriormente procesadas para la generación de nanofibras compuestas por la triada CTS/afinina-AgNPs.

Debido a lo anterior, este trabajo presenta un método de síntesis fácil, económico, rápido, eficiente y amigable con el medio ambiente al reducir el tiempo de síntesis, el uso excesivo de reactivos, de materiales sintéticos y fuentes energéticas artificiales para la reducción química de la sal precursora de AgNPs. De esta forma es posible obtener un nanocompuesto base CTS en forma de nanofibras incorporando un complejo de coordinación formado entre las AgNPs y la afinina, obteniéndose como resultado un material híbrido biodegradable, atractivo, con actividad biológica importante y con potenciales aplicaciones específicamente en el área biomédica donde la higiene es un factor clave.

### **3. HIPÓTESIS**

Es posible sintetizar nanopartículas de plata (AgNPs) a partir de un complejo de coordinación afinina-AgNO<sub>3</sub> empleando al quitosano (CTS) en solución acuosa ácida, como agente reductor, dispersante y estabilizante, utilizando únicamente la radiación solar como fuente de energía para llevar a cabo la reducción química.

A partir de ésta solución, es posible generar un nanocompuesto homogéneo CTS/afinina-AgNPs por medio del proceso de electrohilado, el cual es innovador, original y puede presentar actividad antimicrobiana potenciada.

#### 4. OBJETIVO GENERAL

Sintetizar y caracterizar bionanocompuestos quitosano (CTS)/afinina-AgNPs en forma de nanofibras por el método de electrohilado a partir de la fotoreducción de soluciones ácidas CTS/afinina-AgNO<sub>3</sub> para la evaluación de su actividad antimicrobiana.

##### 4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener y verificar la obtención de la afinina a partir de las raíces de *H. longipes* mediante Resonancia Magnética Nuclear de Protón (RMN de <sup>1</sup>H) y Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR).
- Obtener y verificar la obtención del complejo de coordinación afinina-AgNO<sub>3</sub> por medio de las técnicas RMN de <sup>1</sup>H y FT-IR.
- Sintetizar nanopartículas de plata (AgNPs) en soluciones de CTS empleando al polímero como agente reductor, dispersante y estabilizante, y radiación solar como fuente de energía para la reducción química, verificando la obtención de las AgNPs empleando Espectroscopia UV-Vis.
- Establecer una metodología adecuada para el electrohilado de las soluciones reducidas, determinando los parámetros óptimos tanto para el equipo como de las soluciones a electrohilar.
- Sintetizar nanofibras por medio de la técnica de electrohilado de compuestos CTS/afinina-AgNPs, CTS/afinina, CTS/AgNPs y CTS con afinina y AgNPs por separado para su comparación, estableciendo las condiciones óptimas para la producción de cada una de ellas.
- Caracterizar las nanofibras obtenidas por las técnicas de Microscopía Electrónica de Barrido por Emisión de Campo (FESEM) y FT-IR.
- Evaluar la actividad antimicrobiana del bionanocompuesto CTS/afinina-AgNPs y sus precursores por separado en diferentes presentaciones utilizando el método de difusión con discos (Prueba de Kirby-Bauer) con tres agentes patógenos representativos.

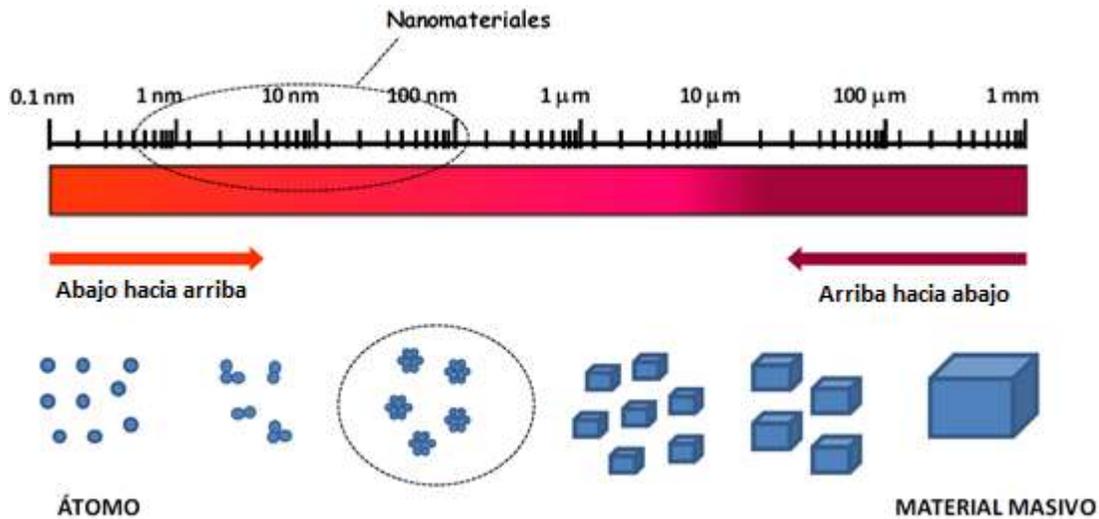
## 5. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO

Debido a que los microorganismos se encuentran en todas partes, incluso en el cuerpo humano, las infecciones producidas por éstos y su prevención han retomado importancia durante los últimos años, sobre todo porque ha habido un aumento de los organismos microbianos resistentes a múltiples antibióticos, teniendo un efecto directo en los costos de atención de la salud. Por esta razón es necesario desarrollar nuevos antimicrobianos eficaces, de amplio espectro y de bajo costo [12, 13].

En el área de textiles biomédicos, los principales agentes antimicrobianos sintéticos para textiles incluyen triclosán, metales y sus sales, compuestos organometálicos, fenoles, compuestos de amonio cuaternario y organosiliconas, entre otros; sin embargo, estos productos químicos son altamente tóxicos o dan lugar a subproductos indeseables. Por ello se ha estado explorando el uso de productos naturales con propiedades antimicrobianas en el tratamiento y producción de materiales textiles. Además, es bien sabido que un único agente antimicrobiano no funciona eficazmente contra una amplia gama de microbios, razón por la cual el desarrollo de materiales compuestos con actividad biológica potenciada (debido a la presencia de varios componentes que sinérgicamente potencian esta propiedad) ha sido de gran interés en esta área del conocimiento durante los últimos años [4].

### 5.1 MATERIALES TEXTILES Y NANOPARTÍCULAS (NPs)

Los materiales textiles han generado un considerable interés en el campo médico, debido a su uso como suturas, vendas, andamios, vendaje de heridas, máscaras, batas quirúrgicas, ropa de cama de hospital, etcétera. En este sentido, la reducción del tamaño de las partículas de los materiales es una herramienta eficaz y fiable para mejorar su biocompatibilidad y actividad biológica (**Figura 1**), ya que comparado con su contraparte macroscópica o a granel, el tamaño, la superficie y morfología de las NPs originan un cambio único en sus propiedades biológicas, físicas (tamaño del área de superficie, carga de superficie, forma, tamaño, paso a través de barreras que se consideraban impermeables, propiedades eléctricas y ópticas) y químicas (solubilidad y reactividad) [14]. Actualmente, están surgiendo nuevas aplicaciones de las NPs dada su alta relación de superficie/ volumen, siendo generalmente empleadas en diferentes campos tales como la medicina, la biología, la biotecnología, la biociencia, la química, la física, la catálisis, la electrónica, la optoelectrónica, el tratamiento de aguas y la conversión de energía, haciendo uso de sus propiedades únicas en las que se incluyen: buena óptica, excelente conductividad eléctrica, buena resistencia química y electromagnetismo [15-17].



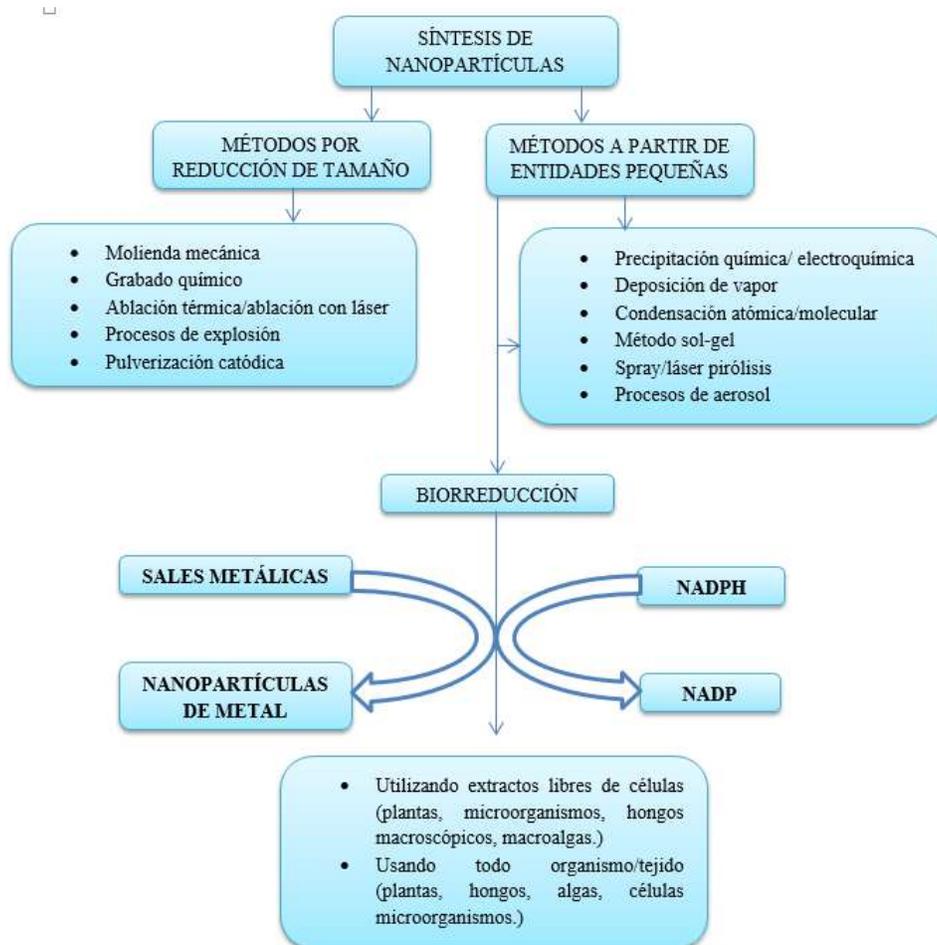
**Figura 1.** Escala comparativa de tamaños en los materiales (modificado de Ledo-Suárez, 2011 [18]).

La investigación actual se dirige a sintetizar nanomateriales compuestos con propiedades antimicrobianas mediante procesos amigables con el medio ambiente, reduciendo la generación de contaminantes no seguros y tóxicos, así como maximizando la eficiencia del proceso [12, 15]. También se busca la incorporación de NPs en la superficie de textiles y prendas de vestir para la producción de superficies altamente activas con una gama de funcionalidades, tales como el bloqueo de rayos UV, actividad antimicrobiana, repelencia al agua y propiedades de auto-limpieza [4]. Por lo tanto, las NPs han sido ampliamente utilizadas como aditivos de productos biomédicos, en las que se incluyen perlas, geles, películas y fibras, con la finalidad de mejorar la capacidad antimicrobiana de los materiales [14].

## 5.2 NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AgNPs)

La plata (Ag) es un metal que posee una de las más altas conductividades eléctricas y térmicas entre todos los metales. Es un agente antimicrobiano con un amplio espectro de actividad usado desde la antigüedad y el reciente resurgimiento del interés por ésta se centra en la creciente amenaza de la resistencia a los antibióticos, causada por el abuso de los mismos. De hecho se sabe que los iones de Ag y compuestos a base de Ag son altamente tóxicos para muchos microorganismos, por ejemplo, muestra fuertes efectos bactericidas sobre diferentes especies de bacterias, incluyendo *E. coli* [4, 13, 16, 19]. Generalmente, la plata no tiene un efecto adverso o negativo en células viables y no provoca fácilmente resistencia microbiana. Por lo tanto, ha sido incorporada en los plásticos en diversas formas (por ejemplo, catéteres, material dental, dispositivos e implantes médicos, y apósitos para quemaduras), en textiles o como aditivos de alimentos para controlar y eliminar el crecimiento microbiano [13, 19].

Existen diversos métodos para la síntesis de NPs, los cuáles se encuentran resumidos en el **Esquema 1**. Uno de los métodos de síntesis de NPs más comúnmente empleados es el de reducción química de una sal metálica empleada como precursora del nanomaterial. Se emplean sales de metales de transición en disolución y el proceso de reducción se lleva a cabo sobre el catión metálico y con el proceso complementario de oxidación del agente reductor [18].



**Esquema 1.** Métodos de síntesis de nanopartículas (modificado de Kumar-Mittal y colaboradores, 2013 [20]).

Dentro de las NPs empleadas en diferentes área tecnológicas, las NPMs han sido objeto de una investigación sustancial en los últimos años. Son de interés para aplicaciones que van desde la catalítica, óptica, antibacteriana, almacenamiento de datos, fotónica, fotografía, tecnológica, pasta de película gruesa y adhesivo para varios componentes electrónicos [16, 21].

En particular, las AgNPs han atraído gran atención en los últimos 15 años debido a que su diminuto tamaño (nanómetro) es el responsable de novedosas propiedades aplicables en muchos campos. Las AgNPs presentan una superficie de dispersión Raman mejorada y juegan un importante papel en el campo de los biomateriales con propiedades magnéticas mejoradas [19, 22, 23]. Además se ha reportado su aplicación en textiles médicos antibacterianos, apósitos para heridas [15] y en dispositivos ópticos dadas sus propiedades ópticas no lineales [17], además de que se busca una nueva técnica de administración de fármacos a través de estas NPs [23]. Se ha reportado que las AgNPs tienen aplicaciones anticancerígenas, antimicrobianas y antivirales [20].

### 5.2.1 PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS DE LAS AgNPs

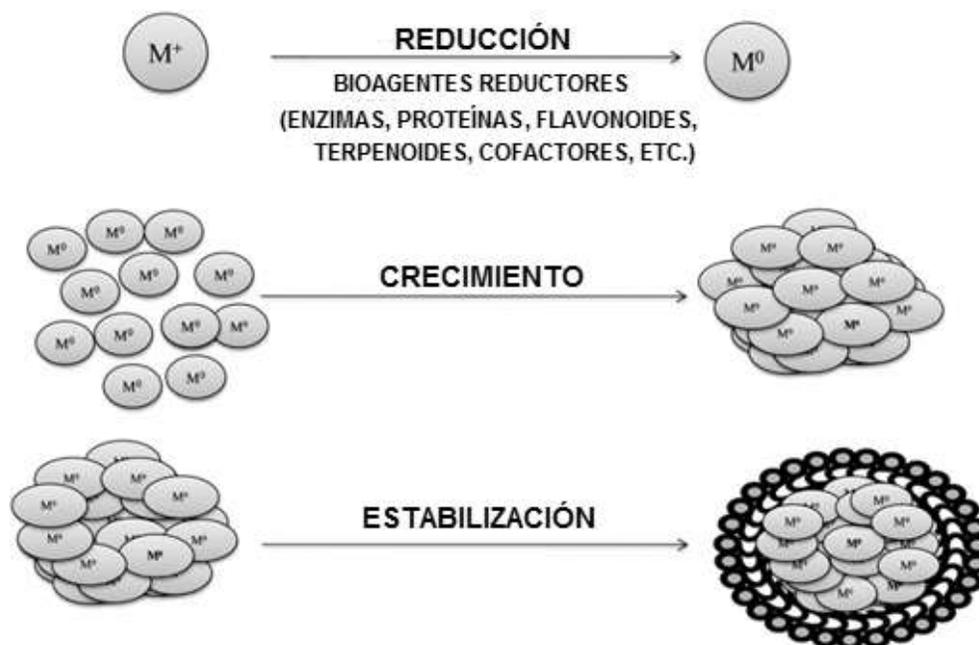
Las AgNPs son conocidas como un antibiótico de amplio espectro con potenciales propiedades antibacterianas. El mecanismo de los efectos inhibidores de las AgNPs sobre los microorganismos se conoce solo parcialmente. Diversas investigaciones indican que los radicales libres se derivan de la superficie de las AgNPs y dañan la estructura de la membrana de las bacterias [13]. Otros estudios indican que se adhieren a la pared celular, alterando su permeabilidad y por ende la respiración celular. También pueden penetrar dentro de la célula causando daños al interactuar con los compuestos de fósforo (P) y azufre (S) contenidos en los componentes tales como el ADN y las proteínas [15]. La carga positiva del ion plata ( $\text{Ag}^+$ ) es crucial para su actividad antimicrobiana a través de la atracción electrostática, es decir, la carga negativa de la membrana celular del microorganismo interactúa con las NPs cargadas positivamente. Se afirma también que la actividad antimicrobiana de las AgNPs sobre las bacterias Gram-negativas es dependiente de su concentración y está estrechamente asociada con la formación de poros en la pared celular de las bacterias, causando alta permeabilidad seguida de la muerte celular [3, 13].

Las AgNPs son generalmente inestables en solución acuosa, ya que se aglomeran rápidamente; sin embargo, al ser estabilizadas por polímeros como el CTS, un polímero natural, presentan un tiempo de vida largo en solución acuosa. Se sugiere que el aumento de la actividad antimicrobiana al incorporar plata (en forma de iones NPs) en CTS se debe a la alta infiltración de la plata resultando en un alto efecto bactericida [19, 24].

### 5.3 POLÍMEROS EN LA SÍNTESIS DE AgNPs

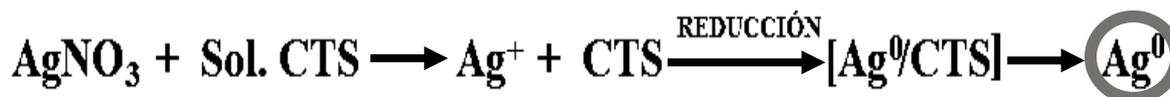
Los polímeros han sido ampliamente utilizados en diferentes áreas debido a sus propiedades únicas. Por lo general, los materiales compuestos con NPMs pueden ser obtenidos eficazmente mediante la adición de los iones metálicos (sales metálicas) en una solución de polímero, para posteriormente llevar a cabo su reducción química con un agente reductor apropiado, siendo el más empleado en este caso el borohidruro de sodio,  $\text{NaBH}_4$ . Los polímeros desempeñan un papel importante en la producción de NPMs por reducción química ya que actúan como agente dispersante evitando la aglomeración de las NPs, debido a que la generación de éstas pasa por tres etapas: reducción, crecimiento y estabilización como se describe en el **Esquema 2** [17].

Las NPs se encuentran incrustadas o encapsuladas en el polímero debido a que son excelentes materiales de acogida para las NPs de metales y semiconductores, produciendo NPs estables y homogéneamente dispersas, con tamaño, forma y distribución controlada. El polímero orgánico también combina sus propiedades intrínsecas con las de las NPMs de tal forma que es posible obtener un nanomaterial compuesto con propiedades sinérgicas únicas otorgadas por la combinación de ambos componentes [15, 16].



**Esquema 2.** Mecanismo de síntesis de NPs ( $M^+$ = ión metálico,  $M^0$ = metal) (modificado de Kumar-Mittal y colaboradores, 2013 [20]).

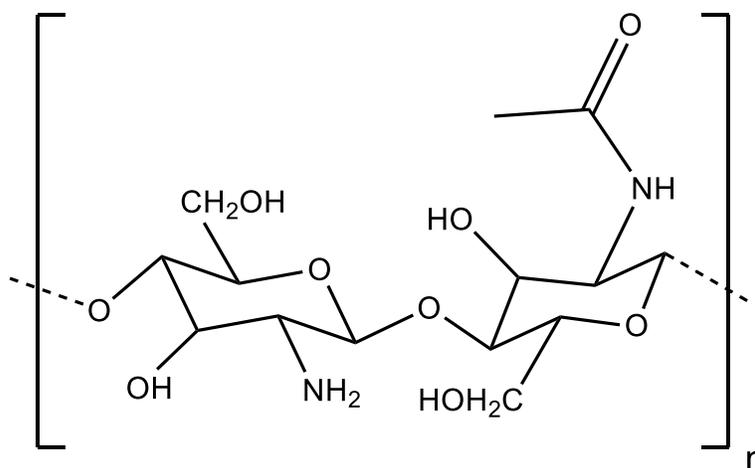
Adicionalmente, los polímeros en solución acuosa también pueden desempeñar el papel de agentes reductores y estabilizantes en la preparación de AgNPs (**Esquema 3**) [3], de esta forma, es posible obtener materiales compuestos polímero/NPMs a través de una metodología más amigable con el ambiente ya que en la síntesis de NPMs por reducción química de una sal metálica en solución polimérica, el polímero puede actuar a la vez el agente reductor, estabilizante, dispersante y finalmente como matriz en el material compuesto. Entre los polímeros que pueden ser empleados para tal fin se encuentran el alcohol polivinílico (PVA), la heparina, el almidón, y particularmente el CTS, un polímero natural biocompatible y biodegradable ampliamente utilizado en el área biomédica dada su actividad biológica [14].



**Esquema 3.** Preparación de AgNPs por medio de la reducción del  $AgNO_3$  en solución de CTS (modificado de Khanna P. y colaboradores, 2005 [16]).

#### 5.4 PROPIEDADES DEL QUITOSANO (CTS)

El CTS es el segundo biopolímero más abundante después de la celulosa. Es un polisacárido derivado de la desacetilación de la quitina (poli  $\beta$ -(1-4)-*N*-acetil-D-glucosamina), un componente encontrado en los caparazones de los crustáceos [4, 17, 19]. El CTS se compone de 2 copolímeros: la 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranososa y la 2-acetamida-2-desoxi-D-glucopiranososa (**Figura 2**). Se caracteriza principalmente por su peso molecular (PM) y el grado de desacetilación (DA). Tanto la quitina como el CTS son polímeros naturales cada vez más importantes debido a su combinación única de propiedades en las que se incluyen biocompatibilidad, bioactividad y biodegradabilidad por diferentes enzimas hidrolíticas. Es accesible, no es tóxico y cuenta además con atractivas propiedades físicas y mecánicas como la flexibilidad, fragilidad y elasticidad [21, 22].



**Figura 2.** Unidad y estructura molecular del CTS (tomado de Bedolla-Cázares [1]).

El CTS se degrada en fragmentos bajo irradiación de rayos  $\gamma$ . Debido a su interacción con los grupos amino ( $\text{NH}_2$ ) presentes en la cadena de CTS, las AgNPs son envueltas por fragmentos de CTS, impidiendo que se aglomeren durante el proceso de irradiación de reducción. Las AgNPs resultantes se dispersan uniforme y densamente en la solución [24]. Es un polímero interesante debido a sus propiedades fisicoquímicas, incluyendo su estructura sólida y la conformación en disolución. En estado sólido, se forman cristales rígidos debido a los grupos hidroxilo (OH) y amino dispuestos regularmente en las posiciones ecuatoriales en la  $\beta$ (1,4)-ligada-D- glucosamina, mientras que en solución, se disuelve debido a la protonación de los grupos amino ( $\text{NH}_3^+$ ), el enlace de hidrógeno conduce a la formación de microfibrillas, dependiendo de la concentración de CTS [25, 26]. Debido a la presencia de estos grupos amino e hidroxilo activos es un polímero único, quelante, y con adecuadas propiedades para la formación de películas. El CTS puede formar compuestos de quelato con iones, principalmente en forma de cationes. Por tanto, es un candidato potencial para la producción rápida y másica de AgNPs, así como de otras NPMs [22].

También presenta una serie de actividades biológicas interesantes, incluyendo la actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, antioxidante y antitumoral, induce resistencia a la enfermedad en las plantas y diversas actividades estimulantes o inhibitorias hacia diferentes tipos de células humanas. Por estas razones, ha sido ampliamente utilizado en muchos campos diferentes, incluyendo la medicina y aplicaciones biomédicas, la alimentación, la ingeniería química, farmacéutica, nutrición y agricultura [16, 26]. Adicionalmente, se sabe que posee actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y negativas, por lo que se ha explotado en una serie de estudios [15]. Sin embargo, su mecanismo de acción contra las bacterias es sólo parcialmente conocida. Algunas hipótesis indican que el CTS policatiónico podría interactuar con los grupos aniónicos en la superficie celular causando con ello un aumento en la permeabilidad de la membrana y probablemente interrumpir y posteriormente facilitar la fuga de proteínas celulares. Otro mecanismo propuesto implica la formación de quelatos de CTS con oligoelementos o nutrientes esenciales que resulta en la inhibición de la actividad de las enzimas [4, 15, 16]. El CTS muestra actividad antimicrobiana sobre sustratos textiles en concentraciones relativamente altas, además, debido a la alta porosidad y el tamaño de poro muy pequeño, las nanofibras hechas a base de este biopolímero tienen una superficie específica mayor que la de películas delgadas, por lo que el CTS en forma de nanofibras representa una alternativa altamente atractiva para su uso en ingeniería de tejidos para el crecimiento celular [4].

#### 5.4.1 NANOFIBRAS DE QUITOSANO Y APLICACIONES

Entre los métodos para la obtención de nanofibras se encuentra el electrohilado, el cual es el método más sencillo y eficiente para producir nanomateriales. Actualmente es posible obtener fibras de buena calidad a bajo costo. Estas nanofibras tienen una amplia gama de usos debido a su alta porosidad y su gran área de superficie resultante. Además, las nanofibras tienen una alta capacidad de carga de productos biológicos y materiales activos como NPs de oro (Au) o plata (Ag). Recientemente, sistemas con AgNPs se han cargado en una variedad de andamios en forma de nanofibras para aplicaciones antimicrobianas. Estos incluyen poli(hidroxibutirato-co-hidroxicaprolactato) (PHBV), polimetilmetacrilato (PMMA), poli[2-(*tert*-butilaminoetil) metacrilato] (PTBAM), polivinilpirrolidona (PVP), y mezclas de materiales como el CTS/alcohol polivinílico (PVA), CTS/polietilenglicol (PEG), CTS/ gelatina. En cuanto a la mezcla de CTS con AgNPs, éstas han sido previamente reportadas de poseer una excelente actividad antimicrobiana. [3, 27].

El nanocompuesto CTS-AgNPs es uno de los materiales compuestos inusuales que tiene capacidad de ser utilizado como un biosensor, así como en el tratamiento contra el cáncer. La ventaja de este nanocompuesto es que es biodegradable, es decir, el CTS puede ser degradado en el cuerpo por enzimas lo cual es apropiado para el tratamiento del cáncer, además de que posee una buena actividad antimicrobiana [28].

Dentro de las aplicaciones de las nanofibras se incluyen fibras delgadas para la filtración, ropa, máscaras de piel, membranas semipermeables, material médico, aplicaciones eléctricas y ópticas, soportes de catalizadores, alfombrillas de fibra que actúan como componente de refuerzo en sistemas compuestos, y las plantillas de fibra para la preparación de nanotubos funcionales. Recientemente, las nanofibras se han aplicado a usos médicos que resultan prometedores, como los sistemas de administración de fármacos (vectores para la liberación de principios activos), andamios de ingeniería de tejidos, matrices para regeneración y/o reparación de tejidos y órganos (injertos vasculares, nervios, piel, cartílago, huesos, músculos cardiacos, córneas, expansión y diferenciación de células madres), dispositivos biomédicos biodegradables para implantes, apósitos biológicos, instrumentación médica, tejido de protección contra agentes infecciosos y medioambientales, aplicaciones dentales y cosméticas [3, 27].

Una de las principales aplicaciones de las nanofibras es el cuidado de heridas. La ventaja de la técnica de electrohilado para fabricar nanofibras, es que antes de ser electrohiladas se le pueden adicionar una serie de compuestos funcionales y terapéuticos para el cuidado de heridas, tales como antimicrobianos, antisépticos, antifúngicos, vasodilatadores [por ejemplo, el minoxidil que promueve la epitelización de heridas y la neurovascularización, y factores de crecimiento como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento de epitelio (EGF) y factor de crecimiento transformante (TGF)]. Lo anterior da como resultado nanofibras con principios activos, y consecuentemente también da origen a los apósitos de nanofibras para múltiples funciones [3].

Sin embargo, el proceso de electrohilado del CTS requiere controlar cada uno de los parámetros del equipo de Electrospinning, así como otros factores a considerar en las soluciones, como la concentración del biopolímero, el tipo de disolvente y su concentración. Por ejemplo, un estudio realizado por Kousaku y colaboradores [25], se centró en el efecto que de las concentraciones del disolvente utilizado y del CTS en la morfología de las nanofibras resultantes. Realizaron ensayos con ácido clorhídrico (HCl) diluido, ácido acético (AcOH), ácido fórmico (HCOOH) y ácido trifluoroacético (ATF) puro. Además también llevaron a cabo ensayos variando la concentración de CTS. Finalmente, llegaron a la conclusión de que la morfología de las nanofibras mejoraba al aumentar la concentración de CTS, es decir, la deposición en el colector cambió de perlas esféricas a fibras homogéneas. En cuanto al disolvente, observaron que al adicionar diclorometano (DCM) a la disolución de CTS-ATF se mejoraba la homogeneidad de las fibras de CTS. Se ha reportado el estudio exhaustivo del mecanismo detallado de electrohilado, incluido el inicio de chorro de inyección, el crecimiento de la inestabilidad de flexión, el alargamiento del chorro y la solidificación del chorro en las nanofibras [25].

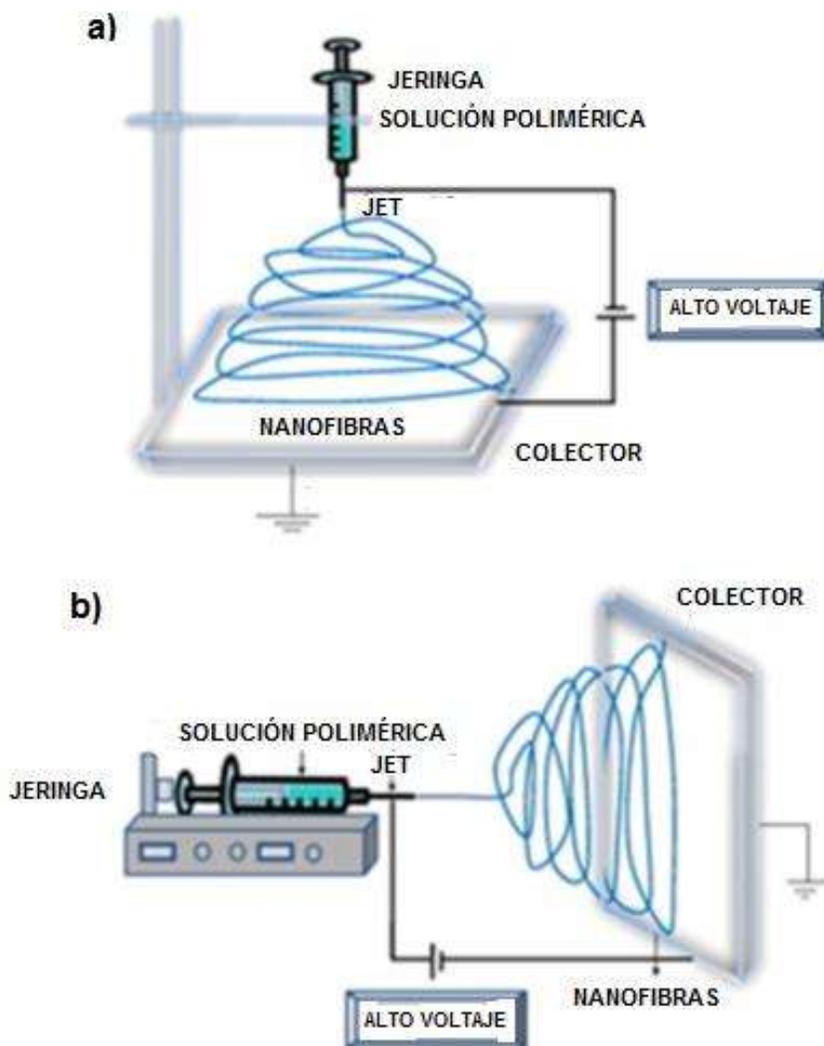
Otros estudios, se han enfocado en la combinación de CTS con otros materiales para mejorar su electrohilado. Abdelgawada y colaboradores [15], observaron que en la combinación CTS con AgNPs, se mejoraba el rendimiento en el proceso de electrohilado al agregarle PVA. Un estudio más concluyó que la concentración ideal para electrohilar CTS con AgNPs es de 12% del biopolímero [11].

## 5.5 TEORÍA DEL ELECTROSPINNING

El término Electrospinning o electrohilado es reciente y es derivado de hilado electrostático; fue empleado por primera vez en 1994. Por lo que, cuando se hilan fibras de manera electroestática, se denomina al proceso como electrohilado [3].

La síntesis de nanofibras de interés actual se centra en ésta técnica, la cual es un método sencillo que permite convenientemente la preparación de materiales fibrosos a base de polímeros con diámetros muy finos (que van desde micras hasta nanómetros), alta porosidad y gran superficie específica. El proceso implica cuestiones básicas e importantes en la ciencia de los polímeros en las que los parámetros viscoelásticos, energía libre superficial (tensión superficial) y conductividad eléctrica son factores críticos para el éxito del hilado de nanofibras [3, 14, 25]. La técnica permite obtener fibras de polímeros naturales y sintéticos, mezclas de polímeros, compuestos de metal o partículas cerámicas, nanocompuestos, así como la obtención de un compuesto con mayor área superficial y una amplia gama de aplicaciones (membranas de filtración, nanofibras catalíticas, sensores fibrosos) [29].

Uno de los mayores atractivos del proceso de electrohilado es que requiere de una configuración sencilla y rentable que implica una jeringa (punta de la aguja), una bomba de alimentación, una fuente de alimentación de alta tensión (campo eléctrico) y un colector de fibra conectado a tierra que es generalmente una placa de metal o un cilindro giratorio. El proceso se lleva a cabo a temperatura ambiente y presión atmosférica, con configuraciones verticales u horizontales [29], como puede ser observado en la **Figura 3**.



**Figura 3.** Configuración del proceso de electrohilado: a) vertical; b) horizontal (modificado de Rogina A., 2014 [29]).

La solución de polímero para ser electrohilada se coloca generalmente en una jeringa conectada al electrodo positivo, mientras que el colector es conectado al electrodo negativo. Posteriormente, se aplica un campo eléctrico o voltaje en donde la punta de la aguja y el colector tienen diferente polaridad, esto provoca una repulsión de cargas que supera la tensión superficial del polímero con la consecuente formación del cono de Taylor (forma cónica que toma la gota al alargarse) [29, 30]. El jet líquido electrificado de la solución polimérica se inestabiliza y se flexiona uniaxialmente a través del campo eléctrico hacia el colector a tierra, neutralizando la carga del jet. El jet se solidifica en el colector tras la evaporación del disolvente, lo que resulta en la deposición de la membrana fibrosa no tejida en el colector o nanofibras. Por lo tanto, el disolvente realiza dos funciones cruciales en el proceso de electrohilado: disolver las moléculas del polímero, listo para formar el jet electrificado y llevar las moléculas de polímero disueltas hacia el colector en forma de fibras de tamaño nanométrico debido a su rápida evaporación [11, 14, 25, 29].

### 5.5.1 PARÁMETROS A CONSIDERAR EN EL PROCESO DE ELECTROSPINNING

El tamaño, la densidad y la morfología de las nanofibras electrohiladas dependen de varios parámetros que se pueden clasificar en:

(1) **Parámetros de la solución:** Se incluyen la viscosidad, concentración, peso molecular, tensión superficial y conductividad.

(2) **Parámetros de procesamiento:** La velocidad de inyección, la intensidad de campo eléctrico, la distancia de la punta de la aguja al colector, la forma de la punta de la aguja, la composición y la geometría del colector.

(3) **Parámetros ambientales:** Estos no se pueden controlar y se incluyen la temperatura, humedad y flujo de aire [29].

#### 5.5.1.1 CONCENTRACIÓN DE LA SOLUCIÓN POLIMÉRICA

La concentración de la solución polimérica es un parámetro importante que influye directamente sobre la morfología de la nanofibra resultante. Una concentración baja de polímero conduce a la interrupción de la formación continua del jet mediante la formación de perlas que representan defectos dentro de las fibras. Además, una mayor cantidad de disolvente puede causar fibras húmedas. Por el contrario, una concentración alta de polímero aumenta el diámetro de la fibra, o bien, podría evitar la formación del jet de eyección, debido a la mayor tensión superficial de polímero. La viscosidad, tensión superficial y reología de la solución polimérica están estrechamente relacionadas con el efecto de la concentración de la solución de polímero; por lo tanto, se debe aplicar una concentración óptima de la solución para obtener nanofibras uniformes. La naturaleza iónica de los polímeros naturales afecta la concentración de la solución, es decir, la capacidad de hilado y morfología de la fibra [3, 29].

#### 5.5.1.2 PESO MOLECULAR Y VISCOSIDAD

El peso molecular del polímero afecta las propiedades de la solución polimérica, tales como la viscosidad, la tensión superficial, la conductividad, la resistencia dieléctrica, y finalmente sobre la morfología de las fibras electrohiladas. Generalmente, un mayor peso molecular del polímero conduce a la viscosidad deseable para la formación de la fibra. Aunque el uso de polímeros con mayor peso molecular no siempre tiene un impacto positivo o un diámetro deseable de la fibra, debido a la interacción entre las macromoléculas del polímero. Junto con la concentración de polímero, la viscosidad juega un papel muy importante en la determinación de tamaño de la fibra y la morfología durante el proceso de electrohilado. El efecto de la viscosidad se produce de la misma manera como pasa con la concentración; una baja viscosidad descarta la formación de fibra continua sin perlas (defectos), mientras que una alta viscosidad provoca el secado de la solución de polímero en la punta de la aguja, evitando la formación de la fibra [3, 29].

### 5.5.1.3 TENSIÓN SUPERFICIAL

La tensión superficial está más relacionada con la naturaleza del solvente en lugar de estarlo con el polímero. Dependiendo de las interacciones y la cantidad de disolvente, la tensión superficial de la solución de polímero se puede variar. La formación de gotas y la incapacidad para que se forme el cono de Taylor se pueden evitar mediante el ajuste de la concentración de la solución con la adición de un disolvente o mezcla de disolventes. Del mismo modo, la disminución de la tensión superficial permite la aplicación un campo eléctrico inferior [29].

### 5.5.1.4 CONDUCTIVIDAD (DENSIDAD DE CARGA SUPERFICIAL)

Diferentes estudios han demostrado que el incremento de la conductividad de la solución conduce a la formación de fibras homogéneas. Una conductividad superior de la solución se puede conseguir con la incorporación de sales inorgánicas (NaCl, CaCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub>), incluso más perlas (defectos) se eliminan dentro de las fibras. Las sales iónicas con diámetro más pequeño poseen mayor densidad de carga y de movilidad de iones en un campo eléctrico mayor, lo que resulta en una mayor fuerza de alargamiento y en una fibra más fina [29].

### 5.5.1.5 FUERZA DE EMPUJE, INTENSIDAD DE CAMPO ELÉCTRICO Y LA DISTANCIA PUNTA-COLECTOR

La alimentación y la tasa de disolución del polímero se correlacionan con el campo eléctrico aplicado, y su correlación es casi específica sobre el sistema de polímero-disolvente. La deformación del jet que se traduce en la formación de perlas (defectos) es resultado de una velocidad de alimentación de solución polimérica mayor. La aplicación de un voltaje más alto podría prevenir la formación de perlas, pero en consecuencia, podría causar la dispersión de la fibra principal y un diámetro de fibra no uniforme. Además, un voltaje más alto acelera las fuerzas electrostáticas de la solución cargada e impide completar el proceso de evaporación del disolvente. Por otro lado, una velocidad de alimentación menor es responsable de la incapacidad para expulsar el jet de la solución del polímero de la punta de la aguja debido a que la gota de la solución polimérica se seca en la punta de la aguja. Se requiere una distancia adecuada de la punta de la aguja al colector para dar suficiente tiempo a las fibras para secarse (o al disolvente para evaporarse) antes de llegar al colector, de lo contrario, con distancias que son demasiado pequeñas o demasiado grandes, se produce la falta de uniformidad de la fibra, alterando a su vez, la morfología de éstas. Naturalmente, la distancia depende de la concentración de la solución del polímero y la tensión aplicada. Se puede concluir que el campo eléctrico aplicado dicta el diámetro de la fibra, pero el nivel de significación varía con la concentración de la solución de polímero y con la distancia punta-colector [3, 29].

### 5.5.1.6 COMPOSICIÓN Y LA GEOMETRÍA DEL COLECTOR

La composición y la geometría del colector son parámetros importantes que afectan la morfología de las fibras electrohiladas. Se han reportado colectores de diferente naturaleza tales como papel de aluminio, papel conductor, tejido conductor, malla de alambre, barras paralelas, barras giratorias y cilindros giratorios [29, 17]. La obtención de fibras uniformes alineadas es la morfología más deseada, debido a la imitación de estas fibras a la de la matriz extracelular. La alineación de las fibras en paralelo se puede conseguir usando la barra paralela o el cilindro giratorio (mandril) como colectores. Naturalmente, la aplicación del cilindro rotatorio también requiere la regulación de la velocidad de rotación para obtener la orientación deseada [3, 29].

### 5.6 APLICACIONES DE LAS NANOFIBRAS

El mayor interés para el proceso de electrohilado se muestra en el campo de la ingeniería de tejidos y la administración de fármacos, debido a la capacidad de hilado de polímeros naturales y biodegradables. Este método ha resultado muy prometedor debido a que es posible imitar la matriz extracelular con el uso de biopolímeros biodegradables o biocompuestos como un reemplazo para el tejido lesionado. Se han reportado nanofibras sintetizadas tanto de polímeros sintéticos como de polímeros naturales, incluyendo proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos. Muchos estudios en ese campo se han centrado en la fabricación nanofibras a base de biocompuestos con un tamaño de diámetro y porosidad uniforme. Aunque el proceso de electrohilado es un método barato y fácil para la formación de la estructura fibrosa, los parámetros del proceso dependen de las propiedades del polímero y son específicos para cada sistema, lo que ha dado lugar a numerosas investigaciones en las últimas dos décadas [3, 25, 29].

### 5.7 PRODUCTOS NATURALES COMPUESTOS A BASE DE NANOFIBRAS

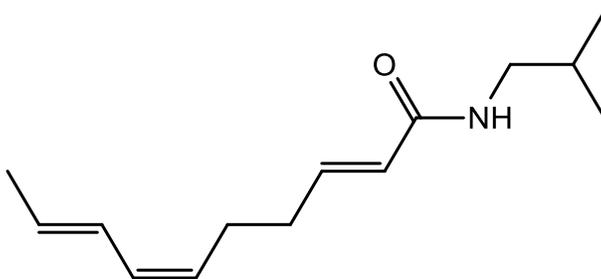
La incorporación de productos naturales en las nanofibras a base de polímeros naturales no ha sido reportada aún, por lo que representa una línea interesante de investigación. Muchos productos naturales como las plantas y sus extractos pueden ser utilizados con este fin.

El efecto de diversos extractos de plantas en contra de las bacterias ha sido estudiado por varios investigadores en el pasado, por ejemplo, las propiedades antibacterianas del aceite de neem en combinación con otros aceites a base de hierbas como el clavo, tulsi y karanga utilizados para impartir propiedades antimicrobianas en textiles de algodón. En un examen general reciente de plantas medicinales mexicanas usadas tradicionalmente, se observó que los extractos de *H. longipes* poseen propiedades significativas en este sentido [4, 5].

### 5.7.1 *Heliopsis longipes*

*Heliopsis longipes*, proveniente de la familia Asteraceae o Compositae, es una especie mexicana ampliamente utilizada, en el Centro y el Sur de América. También se le conoce con el nombre de Chilcuague (del náhuatl “Chilmecatli” que significa hilo debido a lo delgado de las raíces de la planta). Fue utilizada por la civilización Náhuatl como aromatizante en la preparación de alimentos. Los tallos y raíces se utilizan en la medicina tradicional por sus propiedades anestésicas, analgésica en el dolor de muelas, anti-inflamatoria, anti-ulcerosa, insecticida-larvicida, anti-microbiana y cannabi-mimética [6-8].

En el extracto etanólico están presentes una serie de compuestos llamados alcanidas, los cuales ejercen una acción inhibitoria *in vitro* sobre las enzimas ciclooxigenasa y 5-lipoxigenasa. En este extracto se encuentra principalmente la afinina o espilantol (**Figura 4**). La afinina (*N*-isobutil-2*E*,6*Z*,8*E*-decatrienamida) es una alcanida; principal componente bioactivo y picante presente en las raíces de *Heliopsis longipes*. [5, 7, 8,].



**Figura 4.** Estructura química de la afinina.

La actividad analgésica de la afinina (espilantol) se ha atribuido a un aumento en la liberación de GABA: el ácido gamma-aminobutírico; en la corteza cerebral temporal. Se sugiere que el espilantol puede ser un inhibidor útil de mediadores inflamatorios y es un compuesto potencial para la vía ciclooxigenasa 2 (COX-2) de los fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) [8].

Masticar un pedazo de raíz de esta planta produce intensa salivación y un efecto analgésico local. Un experimento realizado con una solución de 10 µg/mL de extracto en diclorometano de esta planta mostró actividad analgésica determinada por medio de la liberación de GABA en rodajas cerebrales de ratones. En ese trabajo de investigación se reportó que la afinina fue el único compuesto activo, por lo que la actividad analgésica de *Heliopsis longipes* podría estar asociada a ésta [6].

En la actualidad hay poco conocimiento sobre el mecanismo neuronal que subyace a la modulación cortical del dolor; sin embargo, la participación del sistema de GABA ha sido bien documentada. De hecho, el aumento de la concentración de GABA en una región de la corteza cerebral produce analgesia duradera mediante la mejora de la inhibición descendente de las neuronas nociceptivas espinales [6].

Se ha reportado que la afinina tiene efectos anti-inflamatorios similares a los de la indometacina y mayores que los de la nimesulida, de acuerdo a la comparación con sus efectos máximos y se ha destacado que posee efectos antimicrobianos contra el crecimiento de *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* además de inhibir el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* a concentraciones bajas (25 µg/mL) y en contraste, se necesitan mayores concentraciones para inhibir el crecimiento de *Pseudomonas solanacearum* [5, 7]. En experimentos *in vitro* se ha mostrado que el extracto crudo (EC) de la raíz de *H. longipes* tiene actividad fungicida contra *Colletotrichum lindemuthianum*, ya que inhibe su crecimiento micelial y la germinación de sus esporas [31].

## 5.8 USO DE POLÍMEROS Y PRODUCTOS NATURALES PARA LA FABRICACIÓN DE MATERIALES COMPUESTOS

Durante los últimos años se ha optado por la síntesis verde, no tóxica y libre de contaminantes a partir de compuestos naturales, por lo que las investigaciones se han enfocado principalmente en la síntesis de compuestos a base de polímeros o productos naturales, en específico, extractos de plantas. Muy pocos trabajos reportan el uso de polímeros con compuestos naturales. Se ha reportado que muchos extractos de plantas presentan actividad contra una amplia gama de hongos. Jitareerat y colaboradores [32] evaluaron la actividad antifúngica *in vitro* de los extractos de canela, pimienta y ajo utilizando diferentes concentraciones en contra de las especies *Colletotrichum musae*, *Fusarium spp.* y *Lasiodiplodia theobromae*. Como resultado de este trabajo, los autores mostraron que los extractos inhibieron la germinación de conidios y el crecimiento micelial de los patógenos. Por otro lado, Bautista y colaboradores [33] reportaron que el CTS (3% y 4% peso) con extractos acuosos de hojas de chirimoya, hojas de papaya y semillas de papaya presentan un efecto fungicida *in vitro* en el desarrollo de *Colletotrichum gloeosporioides*, afectando el crecimiento micelial, la esporulación y la morfología conidial.

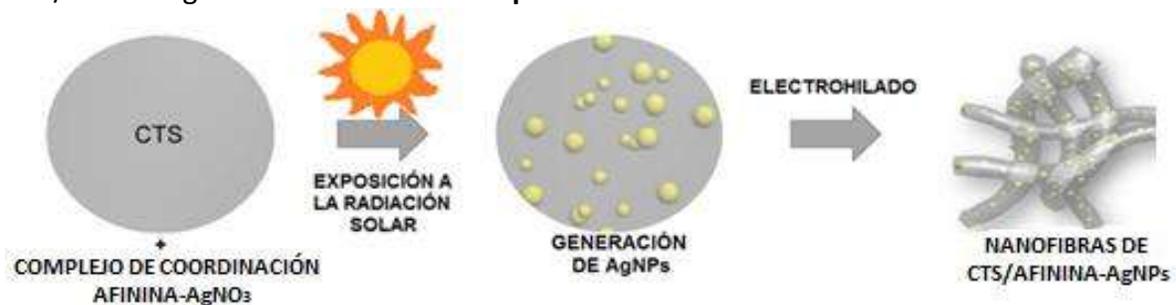
Suwantong y colaboradores [34] fabricaron exitosamente por primera vez fibras de acetato de celulosa ultrafina conteniendo curcumina, una sustancia proveniente de la planta *Curcuma longa L.* Incluso, se ha reportado la síntesis de AgNPs a partir de extractos de distintas plantas, por ejemplo: *Coriandrum sativum*, *Vitex nagundo*, *Argemone mexicana*, *Aloe vera*, *Azadiracta indica*, *Medicago sativa*, entre otras (**Figura 5**) [35], mientras que Kushwaha y colaboradores [35] describieron por primera vez la síntesis de AgNPs a partir del extracto crudo del tallo y hojas de la especie *Verbesina encelioides*.



**Figura 5.** Ejemplos de plantas usadas para la síntesis de AgNPs (modificado de Kumar-Mittal y colaboradores, 2013 [20]).

Recientemente, el uso de polímeros en el área agrícola ha tomado cierta importancia, por ejemplo el CTS ha sido utilizado para mantener la calidad de las frutas y hortalizas. Al ser usado como un revestimiento en los plátanos después de infectarse, muestra un retraso en el desarrollo de la enfermedad y en la maduración de los plátanos, así como actividad antifúngica contra varios hongos [32]. Además, el CTS se considera un producto natural para el control de enfermedades de postcosecha de la papaya [33].

Debido a todo lo anterior, puede observarse que la generación de un material compuesto en forma de nanofibras resultado de la combinación entre el CTS, la afinina y las AgNPs resulta muy atractiva y viable. Además, el compuesto resultante presentaría propiedades diferentes y prometedoras a las de los compuestos de partida. La incorporación de estos tres componentes daría lugar a un material con extraordinario potencial y diversas aplicaciones, sobre todo en el área biomédica, al potenciar sus propiedades antimicrobianas. El proceso general propuesto para la síntesis del compuesto CTS/afinina-AgNPs se muestra en el **Esquema 4**.



**Esquema 4.** Proceso general de síntesis de nanofibras CTS/afinina-AgNPs (modificado de Ching-Wen L. y colaboradores, 2014 [12]).

## 6. MATERIALES Y METODOLOGÍA

### 6.1 Materiales, equipo y reactivos:

Las especificaciones de los reactivos y materiales empleados son las siguientes:

- Quitosano (CTS) en hojuelas con un grado de desacetilación (DA)  $\geq 75$  % de Sigma-Aldrich®.
- Nitrato de Plata de Sigma-Aldrich®, 99+% y PM= 20.913 g/mol.
- Ácido trifluoroacético de Sigma-Aldrich®, PM 114.02 g/mol.
- Ácido Acético de J. T. Baker®, PM 60.05 g/mol.
- Agua Destilada de J. T. Baker®, PM 18 g/mol.
- Hidróxido de Sodio de J. T. Baker®, perlas y PM 40.00 g/mol.
- Hexanos, químicamente puro (potchteca, materias primas).
- Acetato de etilo (AcOEt), químicamente puro (potchteca, materias primas).
- Acetonitrilo de Fermont®, 99.9 % y PM 41.05 g/mol.
- Metanol, químicamente puro (potchteca, materias primas).
- Diclorometano de J. T. Baker®, 99.9 % y PM 84.93 g/mol.
- Cromatofolios Merck de gel de sílice 60 F<sub>254</sub> de 2.5 x 5 cm x 10  $\mu$ m

Los equipos empleados para la síntesis y caracterización de los bionanocompuestos se enlistan a continuación:

- Equipo de Resonancia Magnética Nuclear Varian Mercury Plus de 400 MHz.
- Espectrofotómetro Ultravioleta GENESYS 10S UV-Vis (Thermo SCIENTIFIC).
- Equipo Electrospinning marca NaBond Technologies Co., China, con una Bomba de inyección kdScientific.
- Espectrofotómetro de Infrarrojo Thermo Scientific modelo Nicolet iS10.
- Microscopio Electrónico de Barrido por Emisión de Campo JOEM JSM 6400.

### 6.2 Obtención de la afinina:

Las raíces de *H. longipes*, también conocida como Chilcuague, fueron pesadas (43.167 g), escindidas y molidas. Se le realizaron macerados durante tres días con hexanos. El sobrenadante se filtró con ayuda de papel filtro y algodón. El filtrado se llevó al rotavapor IKA® RV 10 Basic para concentrarlo. El extracto impuro presentó un peso de 0.843 g.

El extracto impuro se redisolvió en hexanos, se mezcló con 1.686 g de gel sílice y diclorometano hasta obtener un polvo fino homogéneo. Se montó una columna de gel sílice a la que se le agregó una mezcla de hexanos-AcOEt en una proporción de 7:2.

Posteriormente, se adicionó el extracto hexánico impregnado en gel de sílice y se eluyó la cromatografía. Se pesó un vial ( $W_v = 13.559$  g) limpio y seco para recuperar la afinina purificada. De la columna se recuperaron 0.159 g de afinina, su presencia se verificó por Resonancia Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  a 400 MHz en cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) y Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR) empleando la técnica ATR (reflexión total atenuada). Empleando una muestra auténtica, también se verificó por la técnica de Cromatografía en Placa Fina.

### 6.3 Obtención del complejo de coordinación afinina- $\text{AgNO}_3$ :

La reacción de acomplejamiento del  $\text{AgNO}_3$  y la afinina se realizó en una proporción 2:1 por lo que se pesaron 0.077 g y 0.050 g respectivamente. Se colocó el  $\text{AgNO}_3$  en un matraz balón que se cubrió con aluminio para evitar cualquier oxidación previa y se le adicionaron 5 mL de Acetonitrilo ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ), para ser sometido a reflujo con agitación a 80 °C durante una hora, esto con el fin de activar la plata. Transcurrido ese lapso de tiempo, se adicionaron los correspondientes equivalentes de afinina, previamente disuelta en 3 mL de  $\text{CH}_3\text{CN}$ . La reacción continuó por 24 horas.

Posteriormente, se retiró el matraz balón del sistema de reflujo y tras ser concentrado en el rotavapor, se le realizaron lavados por triplicado con hexanos ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ ), diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) y metanol ( $\text{CH}_4\text{O}$ ) para remover la materia de partida. Se obtuvieron 0.024 g de complejo de coordinación afinina- $\text{AgNO}_3$ . La obtención del complejo de coordinación afinina- $\text{AgNO}_3$  fue verificada por Resonancia Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  en dimetil sulfóxido, por Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR) empleando la técnica ATR (reflexión total atenuada) y por su punto de fusión. Cabe mencionar que el complejo obtenido se comparó con el obtenido anteriormente por Bedolla-Cázares [1].

### 6.4 Preparación de las soluciones:

Se prepararon 5 soluciones distintas a base de CTS las cuales se describen a detalle a continuación:

#### 3.4.1 Solución de CTS 2% en peso en ácido acético (AcOH) 1% en peso

Se pesó la cantidad necesaria de CTS y se le adicionó AcOH de manera que quedaran en una concentración final de 2% peso y 1% peso, respectivamente. Finalmente se aforó la solución con agua destilada y se dejó en agitación el tiempo necesario para la disolución completa del CTS para obtener una solución homogénea.

### 3.4.2 Solución de CTS con AgNPs (solución reducida)

A la solución anterior de CTS 2% peso en AcOH 1% peso, se le adicionó la cantidad necesaria de  $\text{AgNO}_3$  para obtener una concentración final igual a 5 mM. Posteriormente, la solución se cubrió con aluminio para evitar una reducción previa al entrar en contacto con la luz solar y se mantuvo en agitación durante 20 minutos. Pasado el tiempo de agitación se retiró el aluminio y la solución se expuso a radiación solar directa durante 30 minutos, esto con el fin de reducir químicamente el  $\text{AgNO}_3$  para la síntesis de AgNPs. Después de este lapso, la solución se mantuvo en agitación durante 20 minutos más para volver a homogenizarla. Se le midió la absorbancia UV-Vis para verificar la presencia de plata en forma de NPs. A las soluciones resultantes de este paso se les llamará en adelante “soluciones reducidas con AgNPs”.

### 6.4.3 Solución de CTS con afinina

La solución acuosa ácida de CTS 2% peso en AcOH 1% peso, se vertió en cajas de Petri para formar películas, se dejaron en la estufa durante 24 horas para eliminar el solvente. Después, las películas se escindieron en fragmentos muy reducidos. A partir del dato  $DL_{50\text{afinina}} = 75 \mu\text{g/mL}$  [1], se pesaron 0.0015 g de afinina y se disolvieron en 20 mL de una mezcla ácido trifluoroacético/diclorometano ATF/DCM (7:3). Se pesó la cantidad necesaria de películas de manera que el CTS representara el 10% en peso/volumen (la alta viscosidad del CTS no permite que la solución pueda ser electrohilada) y se disolvió en la mezcla ATF/DCM 7:3 mencionada anteriormente. La solución se dejó lista para electrohilar. Se reservaron películas para el análisis IR y pruebas antimicrobianas.

### 6.4.4 Solución de CTS con AgNPs y afinina

A partir de las “soluciones reducidas con AgNPs”, se formaron películas en cajas de Petri, se secaron, se escindieron y se pesaron para obtener el peso correspondiente para obtener una concentración final de CTS de 12% peso, se disolvieron en una mezcla de ATF/DCM 7:3 que contenía afinina previamente disuelta. La solución se dejó lista para electrohilar. Se reservaron películas para el análisis IR y las pruebas antimicrobianas.

### 6.4.5 Solución de CTS con complejo de coordinación afinina- $\text{AgNO}_3$ :

A la solución inicial de CTS 2% peso en AcOH 1% peso, se le adicionó el complejo de coordinación Afinina- $\text{AgNO}_3$ , de manera que la concentración final de la afinina correspondiera a su  $DL_{50}$  (75  $\mu\text{g/mL}$ ) [1]. Posteriormente, la solución se cubrió con aluminio para evitar el contacto con la luz solar y se agitó durante 20 minutos. Se retiró el aluminio y se expuso al sol durante 30 minutos para la reducción del  $\text{AgNO}_3$  a NPs.

Finalmente, la solución se mantuvo en agitación durante otros 20 minutos para homogenizarla. Se le midió la absorbancia UV-Vis para verificar la formación de NMPs.

## 6.5 Síntesis de nanofibras.

Las nanofibras se obtuvieron por medio del proceso de electrohilado. A partir de las soluciones acuosas de CTS 2% peso en AcOH 1% peso, las “soluciones reducidas con AgNPs” y de las soluciones de CTS con el complejo afinina-AgNO<sub>3</sub>, se formaron películas, se escindieron en fragmentos muy reducidos, se pesó la cantidad necesaria de películas de manera que el CTS representara el 12% en peso/volumen (Como excepción, la solución que sólo contenía CTS se dejó en una concentración final igual a 10 % peso) y se disolvieron en ATF-DCM (7:3), debido a que esta mezcla de disolventes es la ideal para la producción efectiva de nanofibras de quitosano [1, 26] La solución se dejó lista para electrohilar. Se reservaron películas para el análisis IR y las pruebas antimicrobianas. Las 5 diferentes soluciones fueron procesadas en el equipo de Electrospinning para la obtención de nanofibras. Lotes de 10 mL de cada una de las soluciones fueron colocadas en jeringas de plástico las cuales fueron conectadas a la bomba de inyección para su procesamiento y para la determinación de los parámetros adecuados para la producción de nanofibras de calidad.

En un estudio realizado anteriormente, se determinó que la concentración ideal para el electrohilado de una solución de CTS soportando AgNPs es de 12 % peso [19], además como resultado de una investigación previa, se determinó también que la relación ideal entre los solventes ATF/DCM es de 7:3 [1], por lo que las únicas variables controladas fueron las condiciones del equipo de Electrospinning, es decir, voltaje, velocidad de inyección de la solución, temperatura, distancia de la aguja al colector y tipo de colector. Las condiciones óptimas del proceso para la obtención de nanofibras fueron determinadas para cada una de las soluciones.

## 6.6 Caracterización de las nanofibras y AgNPs.

### 6.6.1 Espectroscopia Molecular de Absorción UV-Vis

Las soluciones expuestas a la radiación solar para la reducción de la sal de plata fueron caracterizadas por su absorbancia UV-Vis después de la exposición a radiación solar y agitación, todos los espectros UV-Vis se obtuvieron en un espectrofotómetro Ultravioleta GENESYS 10S UV-Vis (Thermo SCIENTIFIC) operado en un rango de 350-600 nm.

### 6.6.2 Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR)

Una parte, tanto de las películas como de las fibras, fueron enviadas a Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier para su análisis. Los espectros de infrarrojo (IR) se determinaron en un espectrofotómetro Thermo Scientific modelo Nicolet iS10 empleando la técnica ATR (reflexión total atenuada). Los datos se expresan en números de onda ( $\tilde{\nu}$  cm<sup>-1</sup>) para los máximos principales de absorción.

### 6.6.3 Microscopía Electrónica de Barrido de Emisión de Campo (FESEM)

La morfología de las nanofibras obtenidas a partir de las soluciones “reducidas con AgNPs”, soluciones de CTS con complejo afinina-AgNO<sub>3</sub> y soluciones de CTS con AgNPs y afinina (adicionadas por separado y no como complejo) fueron analizadas por medio de un Microscopio Electrónico de Barrido JOEM JSM 6400.

### 6.6.4 Pruebas antimicrobianas

El ensayo microbiológico se realizó en el Laboratorio Privado EDULAB. Se determinó la actividad antimicrobiana de las fibras, las películas y las soluciones utilizando el método de Kirby-Bauer.

#### 6.6.4.1 Cepas examinadas

Las cepas referenciadas a examinar fueron las siguientes:

*Escherichia coli* (BG-) ATCC 25922

*Staphylococcus aureus* (CG+) ATCC 25923

*Pseudomonas aeruginosa* (BG-) ATCC 25619

#### 6.6.4.2 Preparación de los inóculos y muestras:

Las cepas referenciadas fueron proporcionadas por el laboratorio EDULAB y por el Laboratorio Estatal de Salud Pública. Los tres microorganismos fueron inoculados en condiciones estériles en caldo Müller-Hinton, de manera que la turbidez de los inóculos correspondiera al 0.5 de la escala turbidimétrica de McFarland, la cual es equivalente a 10<sup>8</sup> UFC por mL [3]. Se empleó el agar Müller-Hinton (MH) y el caldo estándar MH, preparado previamente y proporcionado por el laboratorio EDULAB y el Hospital de la Mujer, para hacer la comparación turbidimétrica y llevar a cabo la difusión del microorganismo. Se realizaron ensayos sobre las muestras indicadas en la **Tabla 1**.

**Tabla 1.** Muestras analizadas en los ensayos de actividad antimicrobiana.

TIPO DE MUESTRA	#	COMPONENTES						
		CTS 2%	CTS 2% en AcOH 1%	CTS 10%	CTS 12%	afinina	AgNPs	Complejo afinina-AgNO <sub>3</sub>
<i>FIBRA</i>	1			X				
	2			X		X		
	3				X		X	
	4				X	X	X	
	5				X			X
<i>PELÍCULA</i>	1	X						
	2	X				X		
	3	X					X	
	4	X				X	X	
	5	X						X
<i>SOLUCIÓN</i>	1		X					
	2		X			X		
	3		X				X	
	4		X			X	X	
	5		X					X

Previo a las pruebas antimicrobianas, las muestras fueron preparadas de la siguiente manera:

- **Soluciones:** Se recortaron, con ayuda de una perforadora, círculos de papel filtro (5mm) y se esterilizaron previamente, con el fin de formar sensidiscos. Después se impregnaron los sensidiscos con 100  $\mu$ L de cada solución respectivamente.
- **Películas y fibras:** Tanto las películas como las fibras fueron neutralizadas previamente para eliminar el exceso de ácido. Las fibras se dejaron durante una semana para eliminar y evaporar todo el remanente del ATF. Las películas fueron tratadas inicialmente con una solución de NaOH 1 M y posteriores lavados con H<sub>2</sub>O destilada hasta alcanzar un pH neutro. Las películas y fibras se recortaron en forma circular, fueron pesadas y utilizadas en una concentración igual a la utilizada en forma de solución.

#### 6.6.4.3 Inoculación de las cepas y muestras en los medios:

Se introdujo un hisopo estéril en cada caldo estandarizado con el microorganismo correspondiente y se realizó un estriado cargado por cuadrantes sobre el agar Müller-Hinton, medio estándar para antibiogramas, para cada inóculo en condiciones estériles. Una vez inoculadas las bacterias, se procedió a colocar las películas, fibras, sensidiscos y el antibiótico control, el cual fue el Meropenem 10  $\mu$ g (con amplio espectro antimicrobiano), sobre el estriado y se incubaron las placas durante 24 horas a 37 °C. Al finalizar el periodo de incubación, se realizaron las mediciones de los halos de inhibición de cada muestra y se compararon con el halo del antibiótico de control (Meropenem).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

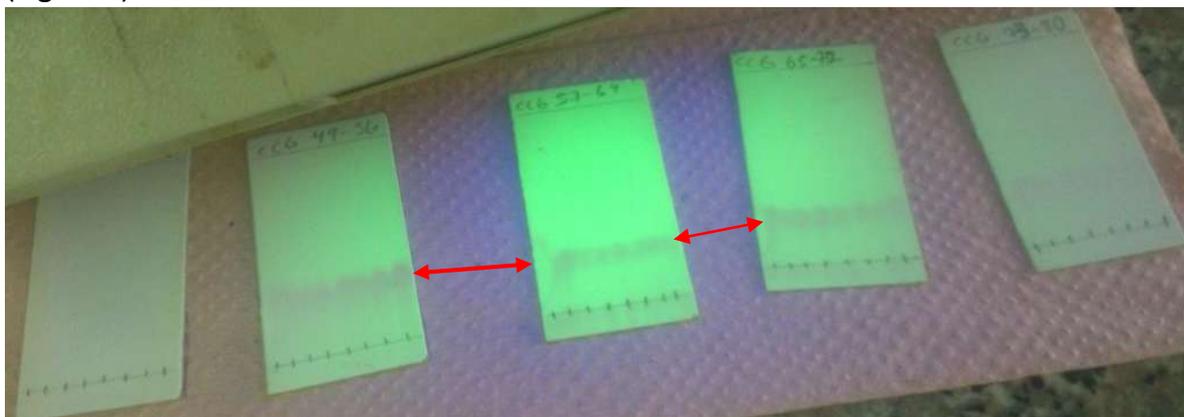
### 7.1 Obtención de la afinina:

El proceso de obtención de la afinina consta de varias etapas las cuales se describen gráficamente en la **Figura 6**. Como se observa en la figura, las raíces de *Heliopsis longipes* son filiformes y de color café claro. Inicialmente, éstas son trituradas y puestas a maceración con hexanos durante tres días. Posteriormente, el extracto es concentrado en rotavapor para obtener una sustancia viscosa verde oscuro de olor característico. Dicho extracto es sometido a separación cromatográfica para aislar a la afinina como un aceite viscoso color naranja, tal y como se muestra en la fotografía del extremo derecho de la **Figura 6**.



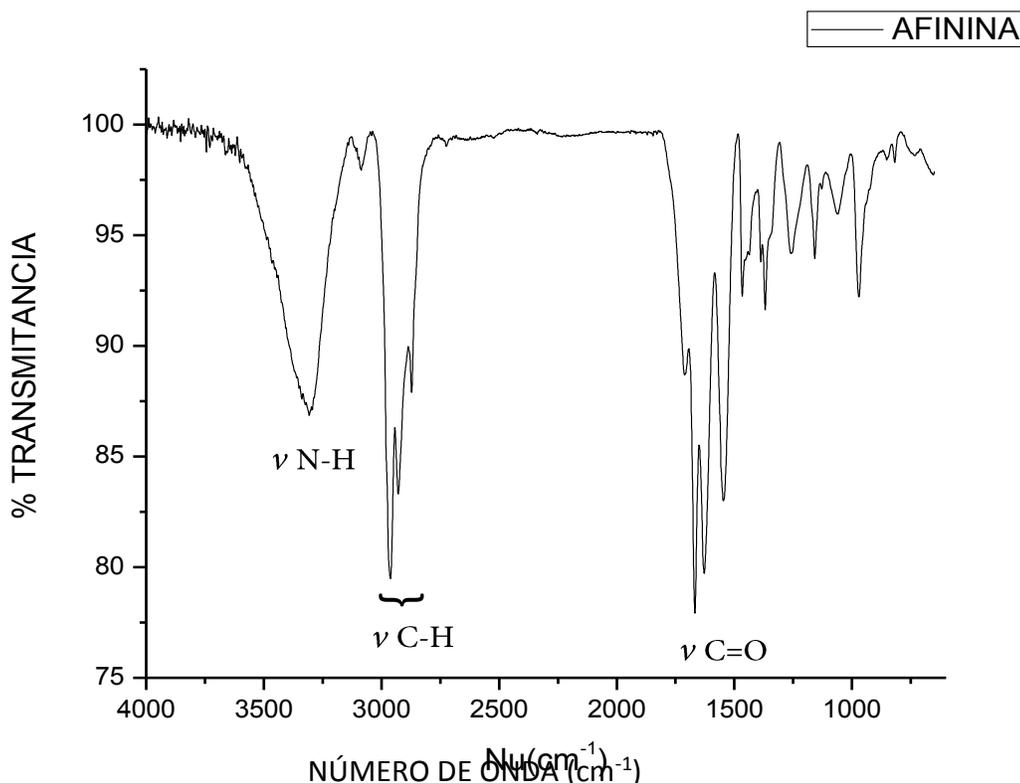
**Figura 6.** Proceso de obtención de la afinina. De izquierda a derecha: Raíces de *H. longipes*, filtración del macerado hexánico, extracto hexánico, purificación de la afinina y afinina.

Se obtuvieron 0.159 g de afinina a partir de 0.843 g de extracto hexánico. Durante la purificación de la afinina se realizaron cromatografías en capa fina (CCF) para comprobar la fracción en la que se empieza a obtener la afinina, así como su pureza (**Figura 7**).



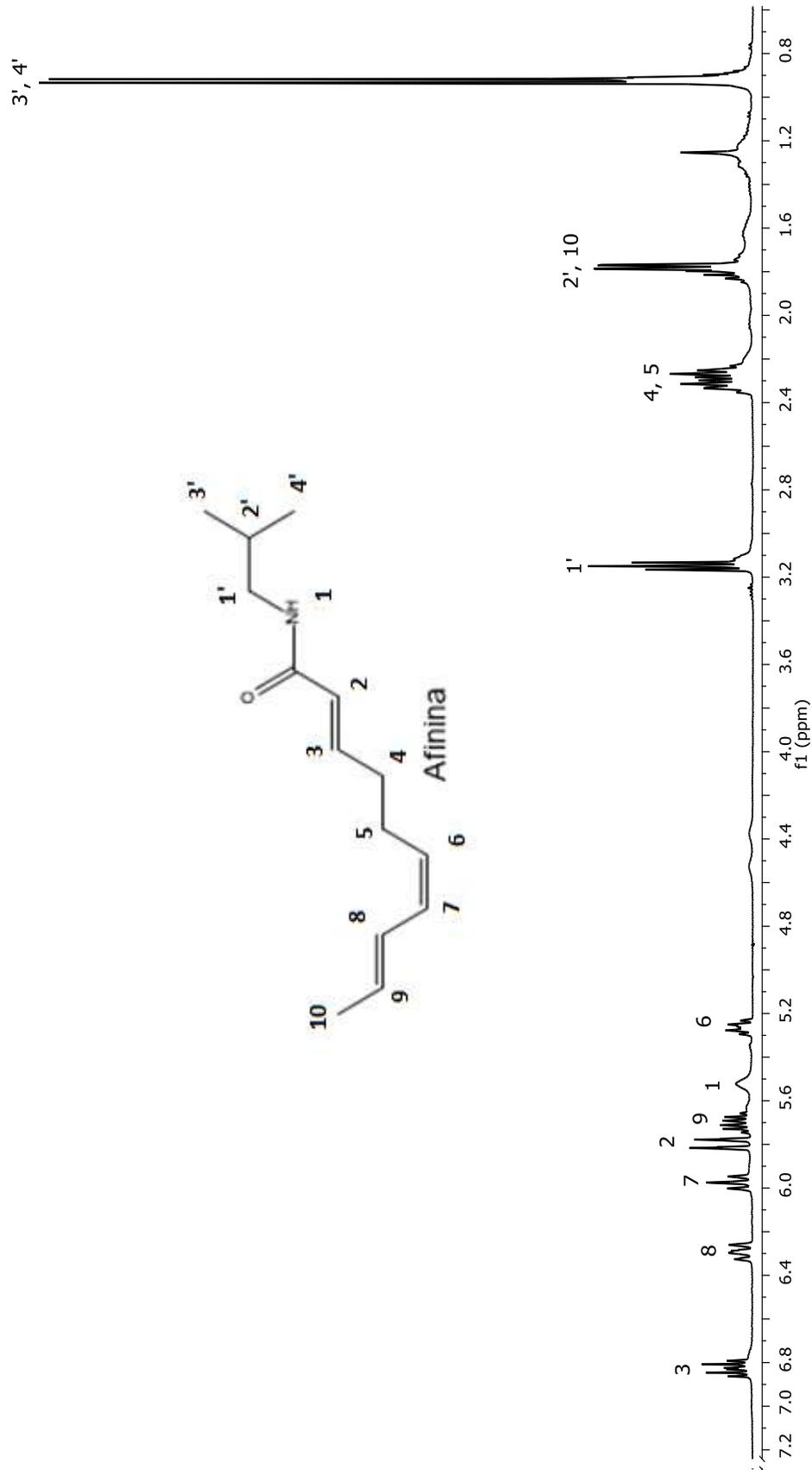
**Figura 7.** Cromatofolios donde se aprecia un  $R_f = 0.35$  en la polaridad hexanos-AcOEt (7:2).

En el espectro de IR mostrado en la **Figura 8** se observa, la vibración del enlace amida aproximadamente en  $3300\text{ cm}^{-1}$  así como la vibración C-H cerca de los  $2900\text{ cm}^{-1}$  y finalmente la vibración del enlace carbonilo a  $1700\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 8.** Espectro IR obtenido de la afinina.

Por medio de la técnica de Resonancia Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  a 400 MHz [usando como solvente el cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ )] se confirmó la presencia de la afinina purificada como producto mayoritario en el extracto hexánico y su espectro se muestra en la **Figura 9**. Se observó el patrón de señales descritas anteriormente para la afinina [36]: se apreciaron protones vinílicos entre 6.83 y 5.26 ppm; de igual manera se observó una señal para el protón base de amida en 5.5 ppm; se encontraron señales múltiples para los protones de metilenos y de un metino en 3.15, 2.29 ppm y 1.81 ppm, respectivamente; así como de los protones de grupos metilos en 1.77 y 0.92 ppm.



**Figura 9.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H a 400 MHz (CDCl<sub>3</sub>) de la afinina y estructura.

## 7.2 Obtención del complejo de coordinación Afinina-AgNO<sub>3</sub>:

La técnica para la obtención del complejo afinina- AgNO<sub>3</sub> ha sido bien establecida en el grupo de trabajo por Bedolla-Cázares [1], los pasos requeridos para su obtención se representan en la **Figura 10**. Para la reacción de acomplejamiento se empleó una relación molar 2:1 de AgNO<sub>3</sub> y afinina, respectivamente; esta relación permite obtener el complejo de coordinación con un rendimiento cerca del 50% [1]. El matraz de reacción se cubrió con papel aluminio para crear un ambiente en ausencia de luz debido a que el AgNO<sub>3</sub> es un compuesto químico fotosensible, y por lo tanto es necesario evitar cualquier oxidación previa. El acetonitrilo, fue el solvente de elección ya que disuelve a los dos componentes de partida (AgNO<sub>3</sub> y afinina), y permite activar la plata para la reacción.



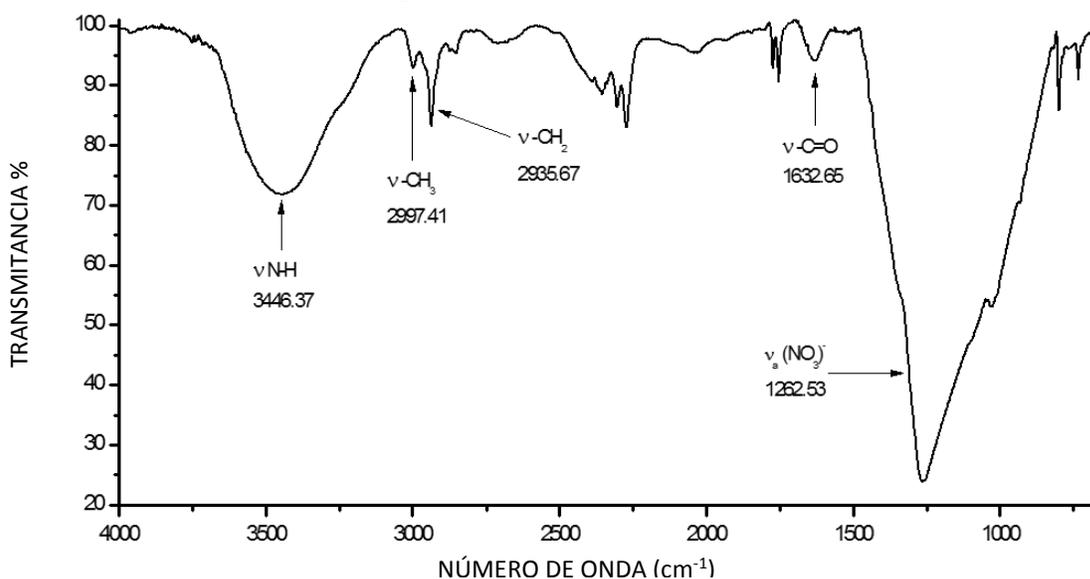
**Figura 10.** Obtención del complejo de coordinación afinina-AgNO<sub>3</sub>. De izquierda a derecha: Disolución de la afinina en acetonitrilo, reacción y equipo de reflujo en proceso para activación de la Plata, complejo de coordinación inicial (viscoso) y lavados con solventes para eliminar materia de partida.

Se obtuvieron 0.024 g de complejo de coordinación afinina-AgNO<sub>3</sub> (**Figura 11**) en forma de un polvo color café oscuro con un punto de fusión entre 263-265 °C. Al realizar los lavados, se observó que el complejo obtenido es insoluble en hexanos y diclorometano y solo es soluble en metanol (**Figura 11**). El complejo también se analizó por medio de RMN de <sup>1</sup>H en dimetil sulfóxido (DMSO-*d*<sub>6</sub>) a 400 MHz y por FT-IR (**Figura 12**).



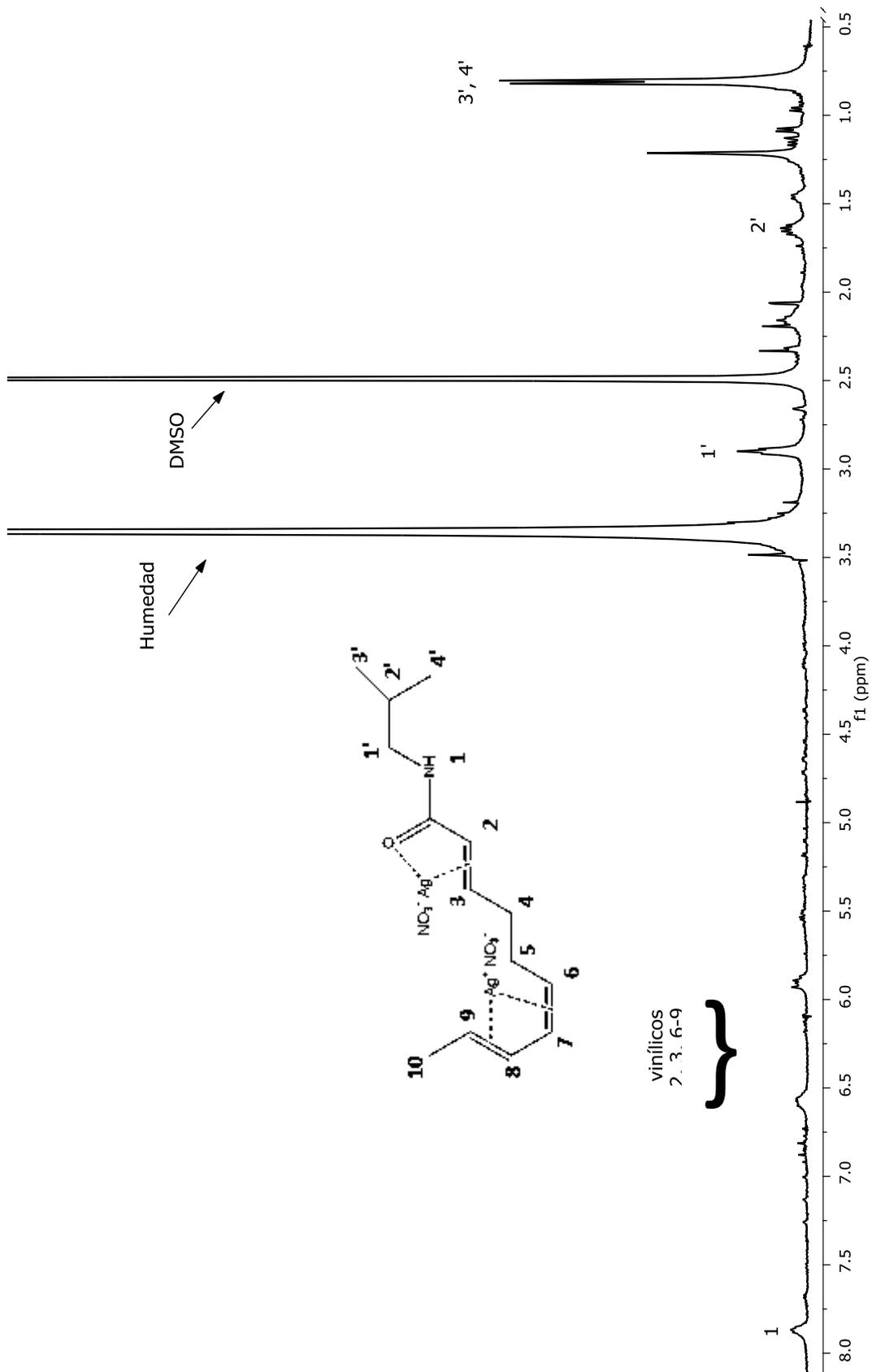
**Figura 11.** Complejo de coordinación afinina- $\text{AgNO}_3$ . Se muestra el complejo resultante después de los lavados, y la determinación de su punto de fusión.

En el espectro de Infrarrojo del producto de reacción (**Figura 12**), se puede observar el desplazamiento a frecuencias mayores de las bandas en  $3446\text{ cm}^{-1}$  de la vibración del grupo amino, en  $2997\text{ cm}^{-1}$  y en  $2936\text{ cm}^{-1}$  se observan las vibraciones de los metilos y metilenos, respectivamente; el aumento del porcentaje de transmitancia de las bandas de tensión del grupo carbonilo en  $1633\text{ cm}^{-1}$ , así como la aparición de las bandas características del ion nitrato en  $1263\text{ cm}^{-1}$ . Debido a lo anterior, se propone la presencia de los componentes afinina y  $\text{AgNO}_3$  en el producto de reacción formado.



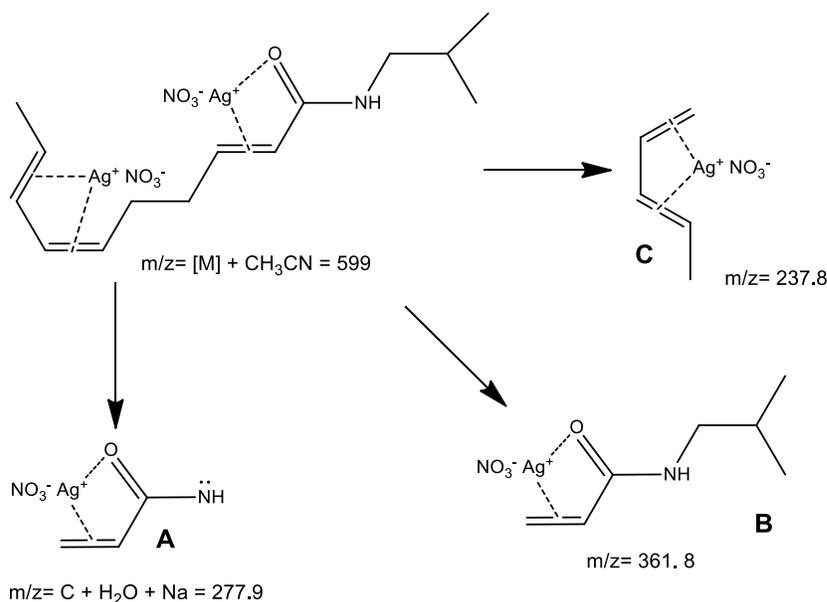
**Figura 12.** IR obtenido del complejo de coordinación afinina- $\text{AgNO}_3$ .

Por otro lado, el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  400 MHz en  $\text{DMSO-}d_6$  del complejo de coordinación afinina- $\text{AgNO}_3$  (**Figura 13**), solo mostró un patrón de señales anchas guardando poca relación con el espectro de la afinina; pudiendo distinguir la señal del protón de amida en 7.8 ppm, además de dos señales anchas en 6.60 y 5.80 ppm atribuidas a protones vinílicos, así como el patrón de señales del residuo isobutilo de la afinina en 0.9 ppm y 1.65 ppm. Cabe destacar que las señales del resto de los protones de la afinina no pudieron ser asignados debido a la complejidad del espectro, aunque es evidente que se trata de otro compuesto distinto a la afinina del espectro de la **Figura 9**.



**Figura 13.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz ( $\text{DMSO}-d_6$ ) del complejo de coordinación afinina- $\text{AgNO}_3$  y estructura.

Anteriormente, por medio de la técnica de Espectrometría de Masas de Baja Resolución fue posible identificar la estructura del complejo de coordinación [1]. A partir del patrón de fragmentación de las especies generadas en el espectro de masas, Bedolla-Cázares, propuso algunas estructuras que se ajustan a sus pesos moleculares (**Esquema 5**).

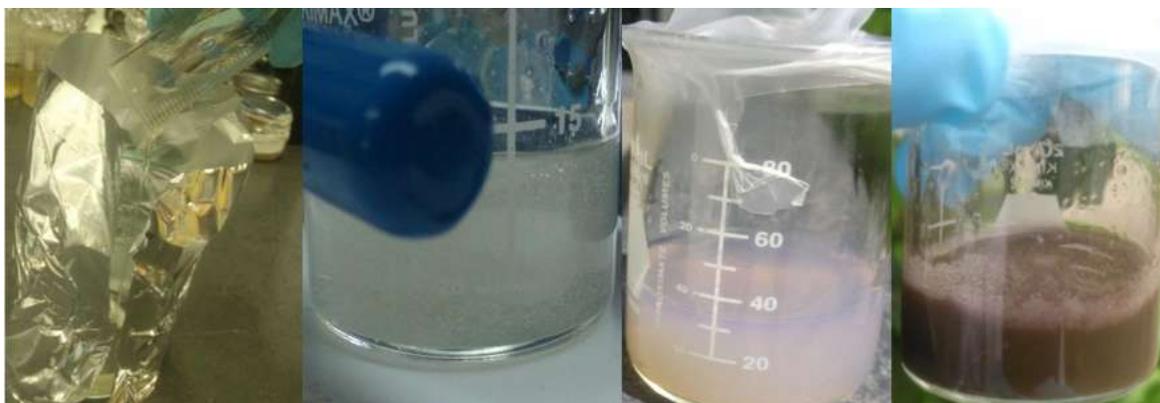


**Esquema 5.** Estructuras propuestas en base al patrón de fragmentación y estructura del complejo de coordinación afinina-AgNO<sub>3</sub> (Bedolla-Cázares [1]).

### 7.3 Reducción de las soluciones y síntesis de AgNPs.

Las soluciones acuosas de CTS al 2% peso en AcOH preparadas como se describió en el apartado 3.4, son viscosas con un color ligeramente amarillo. Una vez adicionado el AgNO<sub>3</sub> estas soluciones cambiaron su tonalidad a un color blanco lechoso, además de que se modificó su viscosidad. Como ya se había mencionado anteriormente, el AgNO<sub>3</sub> se descompone en presencia de luz, por lo que previo a la exposición solar para la reducción de la sal, las soluciones se cubrieron con aluminio. Las soluciones se agitaron mecánicamente antes y después de la reducción para su homogenización.

Al ser expuestas a la radiación solar, las soluciones experimentaron un cambio de color con el paso del tiempo tal y como se muestra en la **Figura 14**; en los primeros minutos pasaron de su color inicial (blanco lechoso) a ser ligeramente moradas, pasando por varias tonalidades para finalmente después de los 30 minutos de reacción obtener una coloración café, la cual permaneció sin cambio aun transcurridos varios días. Esto es un indicativo, más no una prueba, de la formación de AgNPs por medio de la reducción de la sal metálica.



**Figura 14.** Síntesis de AgNPs. De izquierda a derecha: Adición de la solución de CTS 2 % a los cristales de  $\text{AgNO}_3$ , solución sin reducir (color blanquecino), solución a unos minutos de exposición al sol (nótese el cambio de color ligeramente morado) y solución reducida de AgNPs (nótese el color café oscuro, así como la disminución de la viscosidad).

Para la generación de NPs a partir del complejo de coordinación afinina- $\text{AgNO}_3$ , se hicieron los cálculos necesarios a partir de la  $\text{DL}_{50}$  de la afinina, de manera que la cantidad de afinina y AgNPs permanecieran constantes en todos los ensayos para la elaboración de películas y fibras. En la síntesis de AgNPs a partir del complejo de coordinación afinina- $\text{AgNO}_3$ , se manejaron las mismas condiciones descritas anteriormente presentándose los mismos cambios de coloración mencionados previamente.

#### 7.4 Preparación de biopelículas de CTS y soluciones listas para electrohilar.

La preparación de las biopelículas de CTS tiene dos objetivos: La comparación de sus propiedades mecánicas y de su actividad antimicrobiana con las de las nanofibras, y por otro lado, debido a que la síntesis de AgNPs se lleva a cabo en soluciones de  $\text{AcOH}$  1% en peso y al hecho de que la solución de CTS 2% en  $\text{AcOH}$  1% no es electrohilable, la reducción del  $\text{AgNO}_3$  se lleva a cabo en solución de  $\text{AcOH}$  para posteriormente formar películas permitiendo la evaporación del solvente y posteriormente redissolver estas películas conteniendo AgNPs en la mezcla ATF-DCM para su electrohilado. La obtención de biopelículas se hace mediante el método de evaporación del solvente en una estufa a  $60^\circ\text{C}$  durante 24 horas.

El electrohilado de soluciones de CTS no es trivial, de tal forma que existen numerosos reportes al respecto. Se ha encontrado que los mejores resultados para la generación de nanofibras de CTS de buena calidad se obtienen con una mezcla de disolventes; ATF-DCM (7:3) [1]. Sin embargo, en esta mezcla de disolventes el CTS no actúa como agente reductor debido a la formación de sales de trifluoroacetato de quitosano, por lo que para la obtención de nanofibras de CTS con AgNPs es necesario primero realizar la reducción de la sal metálica en soluciones de CTS  $\text{AcOH}$  1% para la posterior formación de biopelículas y su redisolución en un disolvente diferente para producir soluciones electrohilables. El proceso para la obtención de soluciones electrohilables se describe en la **Figura 15**.

Las biopelículas fueron cortadas lo más pequeñas posible para facilitar la disolución de las mismas en el solvente empleado para el proceso de electrohilado; en este caso ATF-DCM. Se dejaron disolviendo y homogenizando en agitación constante durante 24 horas.



**Figura 15.** Preparación de la solución a electrohilar. De izquierda a derecha: Vaciado de la solución a cajas Petri para la evaporación del AcOH a 60°C durante 24 horas, pesado de las biopelículas secas, disolución de las películas escindidas en el solvente, solución lista para electrohilar.

### 7.5 Síntesis de nanofibras.

El equipo de electrospinning para obtener las nanofibras (*Nabond Technologies*), mostrado en la **Figura 16**, cuenta con una capacidad de producción de nanofibras con diámetros entre 20 y 1000 nm, una fuente de alto voltaje con un máximo de 50 KV, una bomba de inyección con un rango de velocidad de 60 nL/min–31 mL/min y diferentes tipos de colector. En este caso los mejores resultados para la obtención de nanofibras base quitosano se han obtenido utilizando un colector rotatorio [1].



**Figura 16.** Proceso de electrohilado. Se observa el equipo de Electrospinning preparándose para electrohilar y en funcionamiento y el aspersor distribuyendo las nanofibras en el colector que gira rápidamente secando y evaporando el disolvente.

Como se mencionó anteriormente, el CTS es insoluble en agua y soluble en soluciones aciduladas, sin embargo, la concentración de ácido en la solución polimérica es un parámetro importante a considerar debido a que puede reducir la tensión superficial de la solución de CTS y al mismo tiempo aumentar la densidad de carga de chorro, pero no tiene efecto significativo sobre la viscosidad [1].

Las condiciones óptimas del proceso de electrohilado para la obtención de nanofibras variaron de acuerdo a las soluciones, ya que cada una de ellas presentó características, componentes y propiedades diferentes, la **Tabla 2** muestra las condiciones óptimas determinadas para cada una de las soluciones.

**Tabla 2.** Comparación de las condiciones óptimas de electrohilado para las diferentes soluciones.

Solución electrohilada	Temperatura	Voltaje (KV)	d (cm)	Fm (mL/min)	Tipo de colector
<i>Sol. CTS 10 %</i>	Ambiente	28-30	18	0.014	Rotatorio
<i>Sol. CTS 12 % con AgNPs</i>	Ambiente	24-26	18	0.025	Rotatorio
<i>Sol. CTS 10 % con afinina</i>	Ambiente	29-30	20	0.009	Rotatorio
<i>Sol. CTS 12 % con AgNPs y afinina</i>	Ambiente	29-30	20	0.04	Rotatorio
<i>Sol. CTS 12 % con complejo afinina-AgNO<sub>3</sub></i>	Ambiente	26-27	15	0.01	Rotatorio

Se obtuvieron fibras de buena calidad a nivel macroscópico, es decir, homogéneas, gruesas y con propiedades mecánicas adecuadas como buena flexibilidad para su manejo (**Figura 17**).



**Figura 17.** Nanofibras obtenidas. Nótese la homogeneidad, flexibilidad y grosor excelentes.

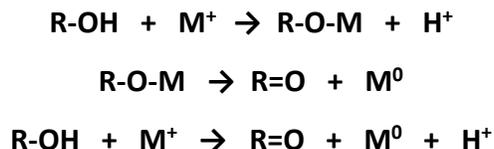
## 7.6 Caracterización de las nanofibras y AgNPs:

### 7.6.1 Espectroscopia Molecular de Absorción UV-Vis

La absorbancia UV-Vis se determinó en un rango de 350-600 nm. La frecuencia característica depende del tamaño de la partícula y del metal. La absorbancia aumenta con el aumento del tiempo de reducción, lo que a su vez se relaciona con el aumento en el número de nanopartículas generadas [3]. Se realizaron varios muestreos para el análisis del cambio de absorbancia y después de los 30 minutos de reducción, no se observaron cambios significativos en las intensidades y las posiciones de las bandas de absorción lo que indica que la reducción se ha llevado a cabo en su totalidad.

La coloración de las soluciones surge de la combinación de la absorción y dispersión de la luz y depende del tamaño de partícula, más específicamente es debido a la resonancia de los electrones libres de la partícula metálica [3]. La línea base utilizada fue una solución acuosa de AcOH 1 %, ya que fue el solvente presente en las soluciones empleadas para la reducción del precursor metálico.

De acuerdo a la literatura, se ha planteado la hipótesis de que la función amina existente en el monómero de cadena del CTS funciona como el centro de anclaje de la NP de metal, permitiendo así una generación selectiva de las NPs de metal a través de su nucleación seguida de su crecimiento [37]. Otra hipótesis existente consiste en que el CTS contiene en su estructura grupos -OH activos capaces de absorber los iones  $\text{Ag}^+$  a través de densidad de cargas y/o atrapamiento estérico. La reacción entre los iones metálicos y el CTS da lugar a la reducción química que se desarrolla *in situ* y puede expresarse en los siguientes términos [3]:



En donde:

R-OH representa un monómero de CTS

$\text{M}^+$  es la especie iónica

$\text{M}^0$  es la especie metálica

R=O representa un monómero de CTS parcialmente oxidado

$\text{H}^+$  es un producto ácido

Como ya se había mencionado anteriormente, la formación de NPs ocurre en tres pasos: reducción o nucleación, crecimiento y estabilización o coagulación [3].

La nucleación es la creación de un núcleo a partir del cual puede ocurrir el crecimiento; es una reacción redox donde la oxidación de los iones OH del CTS produce el agente reductor necesario para el metal, los iones metálicos se coordinan con el agente reductor y cuando se alcanza un punto crítico se origina la reducción del metal produciéndose la nucleación.

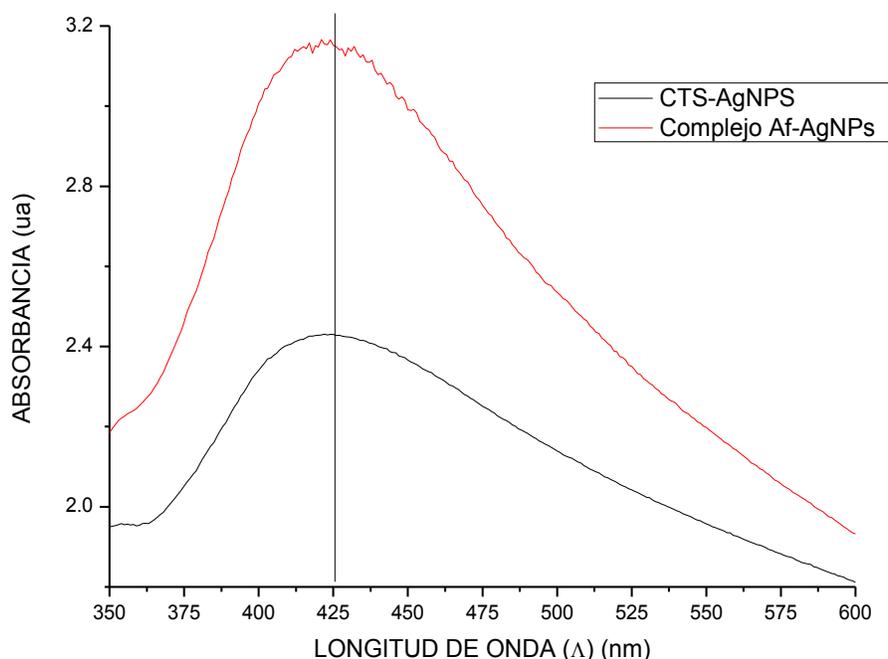
El crecimiento es la adición de más NPs al núcleo existente, y éste se detiene cuando todo el metal ha sido empleado en la reducción. Finalmente, la coagulación es la creación de partículas de mayor tamaño y requiere la aglomeración de NPs.

El control del proceso de coagulación durante la preparación determina el tamaño, la estructura y la distribución de tamaño de NPs, y en este caso, el CTS juega un papel importante en la estabilización y dispersión de la NPs generadas para evitar un aumento en su tamaño [3].

Las propiedades ópticas únicas de las NPMs se originan a partir de las oscilaciones colectivas de los electrones de superficiales, los cuales, cuando son excitados por radiación electromagnética, se denominan resonancias de plasmón de superficie (SPR). La formación de partículas metálicas de tamaño nanométrico origina bandas en el rango UV-Vis del espectro correspondiente a la absorción por resonancia de los plasmones superficiales (SPR), es por ello que es posible confirmar la presencia de NPMs mediante Espectroscopia UV-Vis [3, 37].

Las AgNPs generan bandas de resonancia SPR de fuerte intensidad normalmente a una longitud de onda alrededor de los 420 nm. El ensanchamiento y la asimetría de los picos observados, pueden ser atribuidos a la formación de AgNPs de diferentes tamaños y formas; pero también pueden indicar la agregación de las partículas metálicas de este sistema, esto se observa en el rango 450-600 nm. La posición exacta depende de varios factores, tales como el diámetro, la forma y la distribución de tamaños de las AgNPs formadas [38].

A continuación, la **Figura 18** muestra los espectros obtenidos para la solución reducida de quitosano con  $\text{AgNO}_3$  y la solución reducida a partir del complejo afinina- $\text{AgNO}_3$  después de 30 minutos de exposición a la radiación solar.



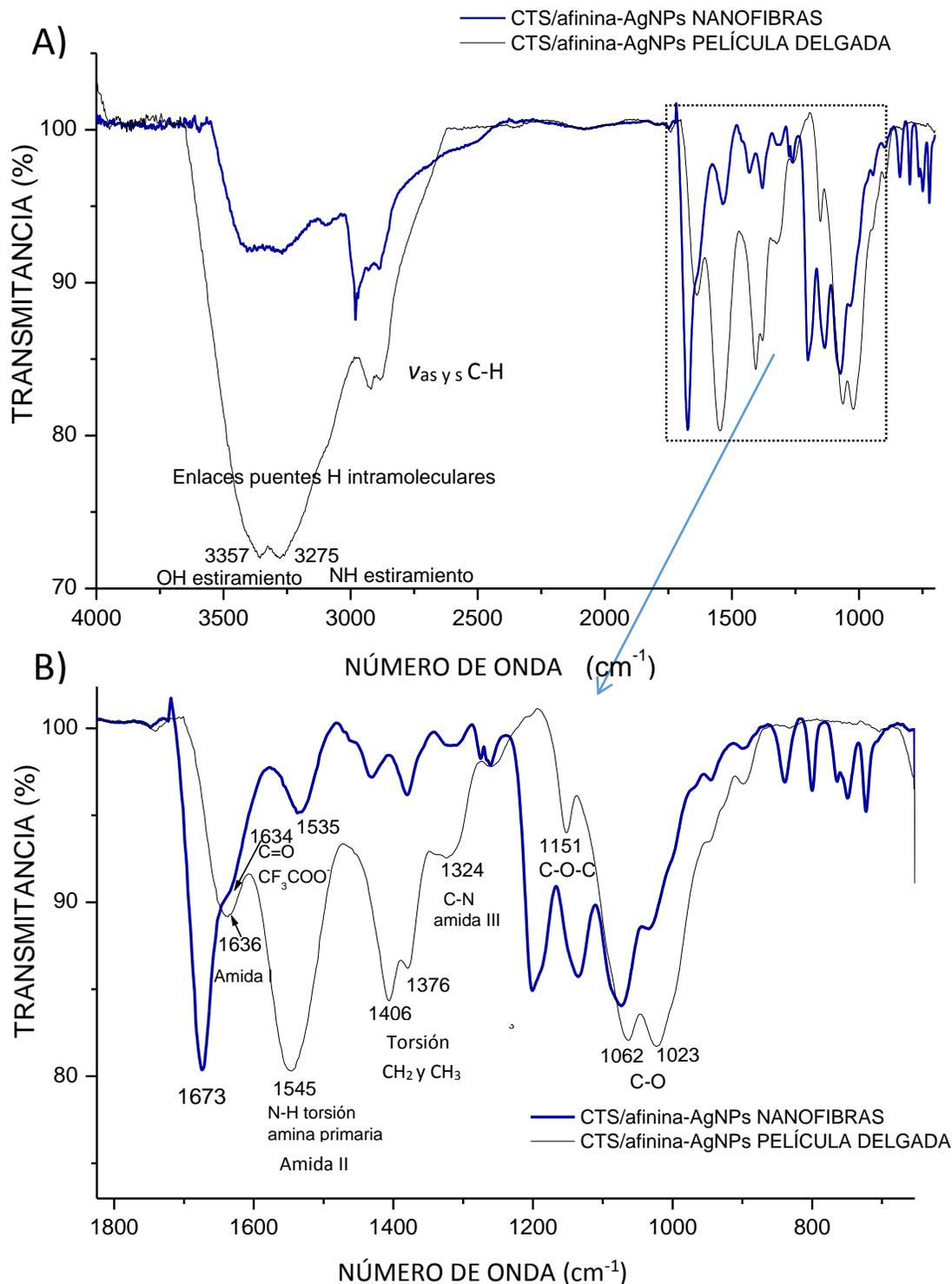
**Figura 18.** Espectros UV-Vis que confirman la producción de AgNPs.

Los espectros UV-Vis mostraron los máximos de los picos aproximadamente en 425 nm, lo que proporciona una fuerte evidencia de la formación y/o presencia de resonancia de plasmón superficial (SPR) de la banda de AgNPs en las soluciones preparadas. La intensidad de la absorbancia está directamente relacionada con la cantidad de nanopartículas generadas [38], de acuerdo a esto, se observa una absorbancia mayor en el compuesto CTS/complejo afinina-AgNPs indicativo de la presencia de una mayor cantidad de nanopartículas respecto del compuesto CTS/AgNPs, derivados del proceso de reducción por radiación solar.

### 7.6.1 Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR)

La espectroscopia FT-IR fue empleada para realizar un análisis de posibles interacciones químicas entre el CTS, la afinina y las AgNPs. Esta técnica es esencialmente sensible a la presencia de grupos polares como O-H, C=O, C-O [3]. La **Figura 19** muestra una comparación de los espectros del compuesto CTS/afinina-AgNPs en forma de película delgada y CTS/afinina-AgNPs en forma de nanofibras.

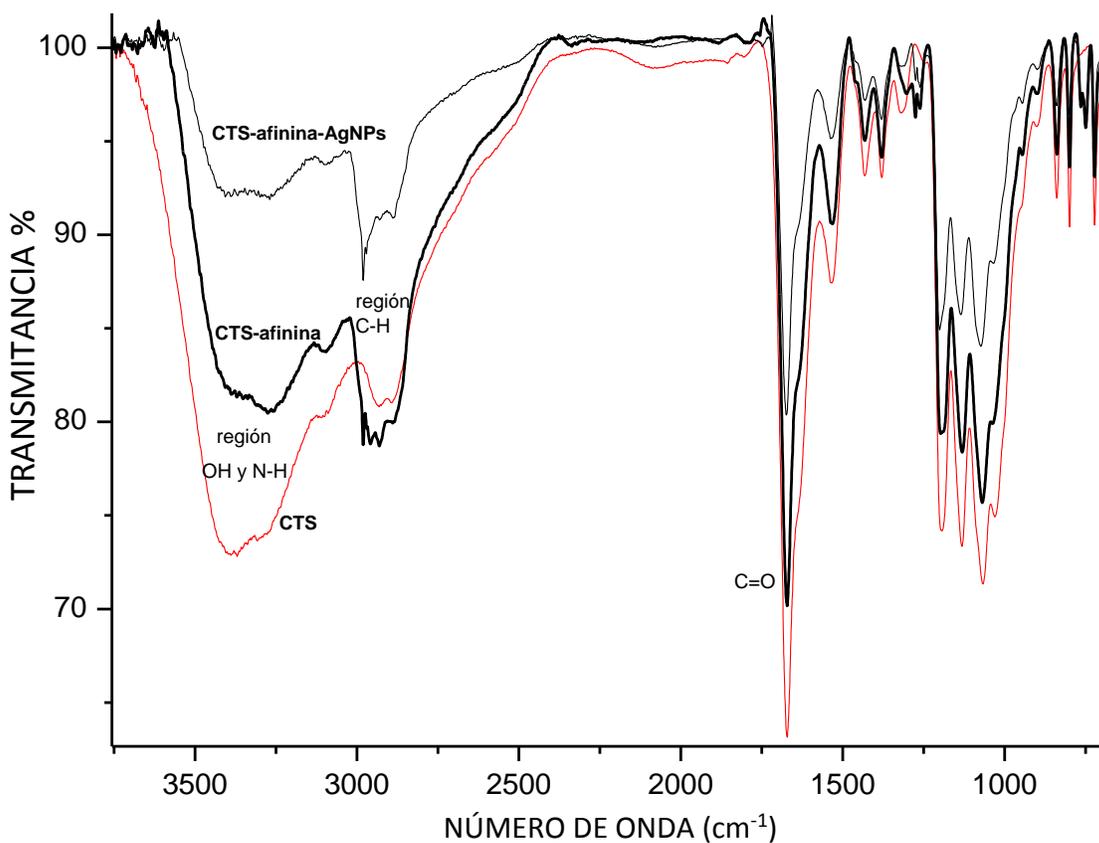
Las vibraciones características de CTS son: entre  $3000\text{ cm}^{-1}$  y  $3500\text{ cm}^{-1}$ , vibraciones de estiramiento de los grupos N-H y O-H, las cuales están expresadas como un pico muy ancho debido a la presencia de enlaces por puente de hidrógeno intramoleculares, entre  $2800\text{ cm}^{-1}$  y  $2900\text{ cm}^{-1}$  vibraciones de estiramiento C-H, alrededor de  $1636\text{ cm}^{-1}$  y  $1545\text{ cm}^{-1}$  vibraciones de torsión del grupo amida I y  $\text{NH}_2$  respectivamente, en  $1046\text{ cm}^{-1}$  y  $1376\text{ cm}^{-1}$  vibraciones de torsión C-H, y en  $1151\text{ cm}^{-1}$  y  $893\text{ cm}^{-1}$  vibraciones C-O-C [39].



**Figura 19.** Espectros IR del compuesto CTS/afinina-AgNPs. A) En forma de película delgada y nanofibras. B) Ampliación de la zona 700 a 1800  $\text{cm}^{-1}$ .

En la comparación entre ambos espectros, se evidencia la formación de la sal de trifluoroacetato de CTS en el compuesto en forma de nanofibras; la vibración en  $1673\text{ cm}^{-1}$  (mostrada en la ampliación del espectro en el rango de  $1800\text{-}700\text{ cm}^{-1}$ ), corresponde a vibraciones de estiramiento del grupo carbonilo del N-acetil y trifluoroacetato ( $\text{CF}_3\text{COO}^-$ ), mientras que la banda del ion amonio ( $\text{NH}_3^+$ ) en  $1535\text{ cm}^{-1}$  se ve considerablemente reducida por la formación de la sal [40]. Una evidencia adicional de la formación de la sal de trifluoroacetato se presenta con los tres picos entre  $720\text{ cm}^{-1}$  y  $840\text{ cm}^{-1}$ . Al igual que los tres picos entre  $1073$  y  $1200\text{ cm}^{-1}$  [41].

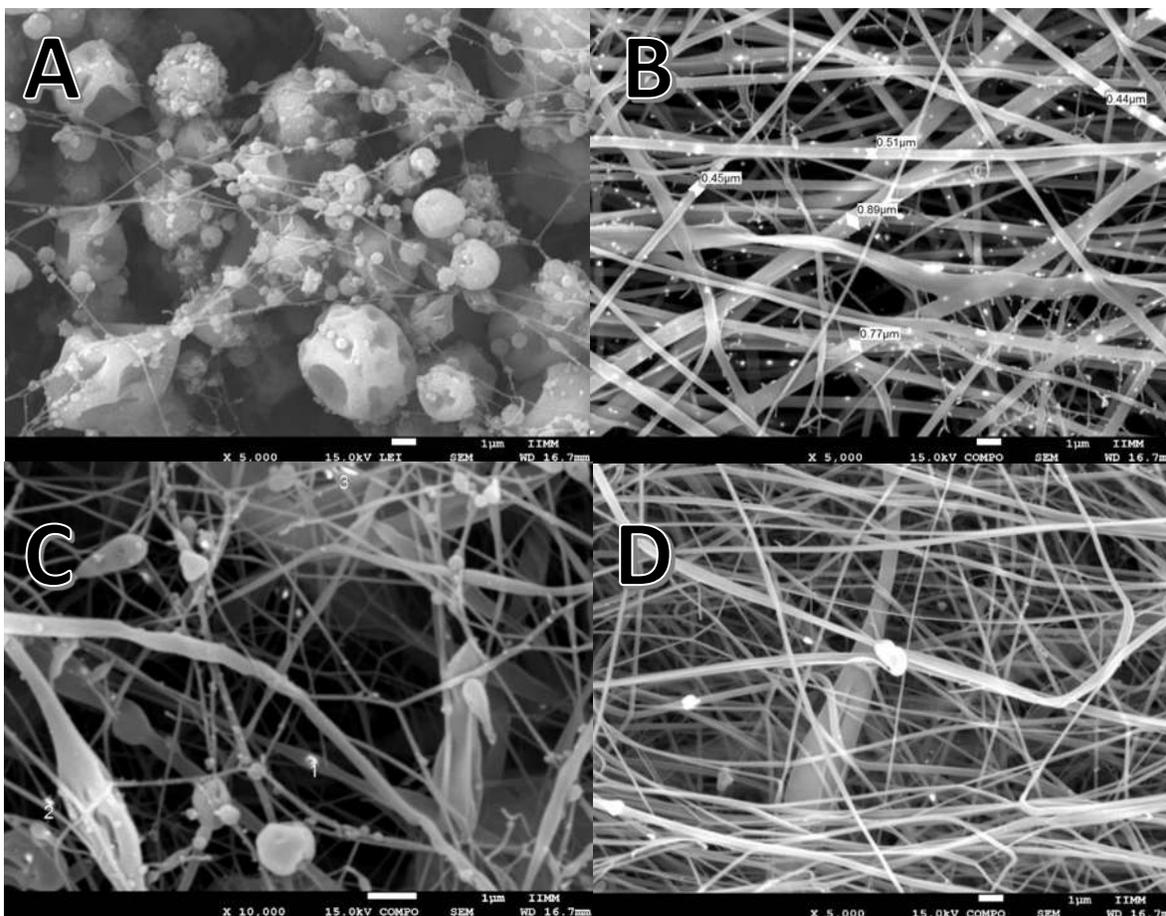
Por su parte, el espectro de la **Figura 20** muestra el comparativo de las nanofibras de CTS puro, CTS-afinina y CTS/afinina-AgNPs. En todos los casos se observan las bandas características del CTS descritas anteriormente, al igual que las vibraciones correspondientes a la formación de la sal de trifluoroacetato. Los cambios más significativos se observan en la región de las vibraciones de los enlaces O-H y N-H; la interacción de la afinina con el CTS origina una disminución en los puentes de hidrógeno intramoleculares de las cadenas del CTS, lo que se evidencia con la definición de los picos de estos dos grupos al ser más claramente distinguibles uno de otro cuando el CTS está combinado con afinina y afinina-AgNPs aunado a una disminución en el ancho del pico (ver **Figura 20**).



**Figura 20.** Espectros IR de nanofibras de CTS puro, CTS-afinina y CTS/afinina-AgNPs.

### 7.6.2 Microscopía Electrónica de Barrido de Emisión de Campo (FESEM)

La morfología de las nanofibras obtenidas a partir de las soluciones de CTS/AgNPs, CTS/afinina, CTS/afinina+AgNPs y CTS/afinina-AgNPs fueron analizadas por medio de Microscopía Electrónica de Barrido de Emisión de Campo (FESEM). Adicionalmente se realizó un análisis elemental (cualitativo y semicuantitativo) por Espectroscopia de Energía Dispersiva (EDS). En la **Figura 21**, se muestran las micrografías FESEM de los bionanocompuestos obtenidos en forma de nanofibras.



**Figura 21.** Micrografías FESEM de las nanofibras sintetizadas. A) Nanofibras de CTS/afinina B) Nanofibras de CTS/AgNPs C) Nanofibras de CTS/afinina+AgNPs D) CTS/afinina-AgNO<sub>3</sub>.

La **Figura 21A** muestra nanofibras de CTS/afinina. Puede observarse una escasa formación de nanofibras con la presencia de grandes aglomerados mayores a 1  $\mu\text{m}$ . Las escasas nanofibras formadas se encuentran dispersas entre los aglomerados los cuales representan una gran cantidad de defectos evidentes. Esto es debido a que la solución presentó cierta resistencia a ser electrohilada, además de que el chorro (jet) no logró estabilizarse y no fue continuo durante el proceso. Podemos atribuir lo anterior a la presencia de afinina libre en las soluciones de CTS. Es posible que la afinina sea un componente no electrohilable, lo que modifica el entorno dieléctrico del quitosano afectando su capacidad de electrohilado originando una gran cantidad de defectos.

La **Figura 21B** muestra la morfología de las nanofibras obtenidas a partir de soluciones de CTS con AgNPs producidas a partir de la reducción de sal metálica precursora ( $\text{AgNO}_3$ ) por exposición a la radiación solar y con el empleo del CTS como agente reductor, estabilizante y dispersante. En este caso, se observan nanofibras de buena calidad, distribuidas aleatoriamente y sin la presencia de defectos (gotas o aglomerados), con tamaños desde 400 nm hasta 900 nm. Esta imagen fue tomada con la técnica de electrones retrodispersados, dicha técnica permite diferenciar los componentes de una muestra a partir de su luminosidad o brillantez de acuerdo al peso atómico; el número de electrones retrodispersados aumenta casi linealmente con el número atómico de modo que los detectores captan mucha más intensidad y, por tanto, transmiten a la pantalla una imagen brillante. Así pues, las áreas donde existan más elementos más pesados se ven más brillantes y donde aparecen elementos más ligeros, menos brillantes. De esta forma en el compuesto CTS/AgNPs (**Figura 21B**), es posible observar la presencia de las AgNPs detectadas como puntos brillantes y distribuidas a lo largo de las nanofibras de CTS.

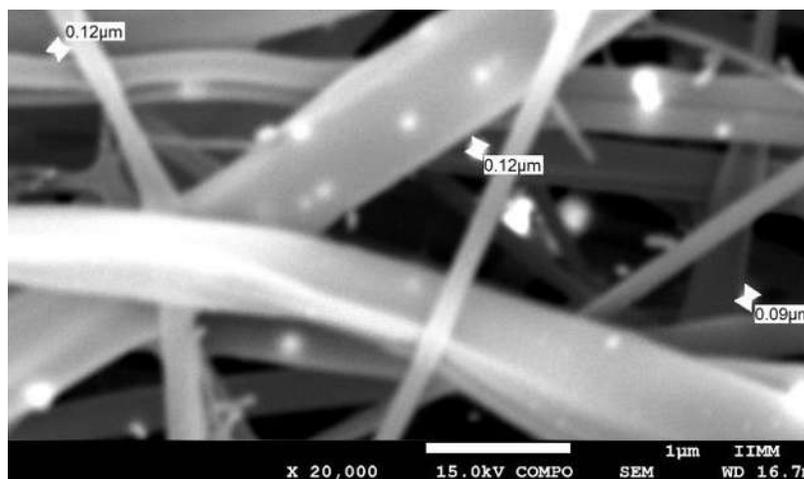
Por otro lado, la **Figura 21C** muestra el resultado del electrohilado de soluciones de CTS a las cuales se les adicionó por separado la afinina y  $\text{AgNO}_3$ , estas soluciones fueron expuestas a radiación solar previamente al proceso de electrohilado. Al igual que las muestras que contienen solamente afinina, es evidente la formación de una gran cantidad de defectos y la formación no-homogénea de nanofibras. Es claro también que el proceso de reducción del  $\text{AgNO}_3$  es fuertemente afectado por la presencia de la afinina en la solución polimérica ya que si bien se observan algunas AgNPs, la cantidad es mínima comparada con las obtenidas en soluciones sin afinina (**Figura 26B**), este resultado es congruente con los resultados presentados por UV-Vis (**Figura 18**). Sin duda se confirma que la presencia de la afinina en las soluciones poliméricas afecta de manera importante la capacidad de electrohilado del CTS.

Finalmente, la **Figura 21D** muestra las nanofibras producto del electrohilado de soluciones de CTS conteniendo el complejo afinina- $\text{AgNO}_3$ , las cuales fueron expuestas a radiación solar previo al proceso de electrohilado. Es importante destacar que aun cuando estas soluciones contienen afinina, el proceso de electrohilado fue exitoso; las nanofibras obtenidas no presentan defectos y tienen una distribución de tamaño relativamente homogéneo, de tal forma que la afinina, formando parte del complejo afinina- $\text{AgNO}_3$ , no altera la capacidad de electrohilado del CTS favoreciéndose la formación de nanofibras de buena calidad para la obtención del compuesto objetivo CTS/afinina-AgNPs.

Sin embargo, como se muestra en la micrografía de la **Figura 21D**, en el nanocompuesto objetivo (CTS/afinina-AgNPs) no es posible observar una gran cantidad de AgNPs dispuestas a lo largo de las nanofibras como fue el caso de la **Figura 21B** correspondiente al compuesto CTS/AgNPs. Este resultado contrasta con los resultados mostrados en el espectro UV-Vis de la **Figura 18**, ya que de acuerdo a la absorbancia registrada por el compuesto CTS/afinina-AgNPs, debería observarse una mayor cantidad de AgNPs en la **Figura 21D** respecto de la **Figura 21B**.

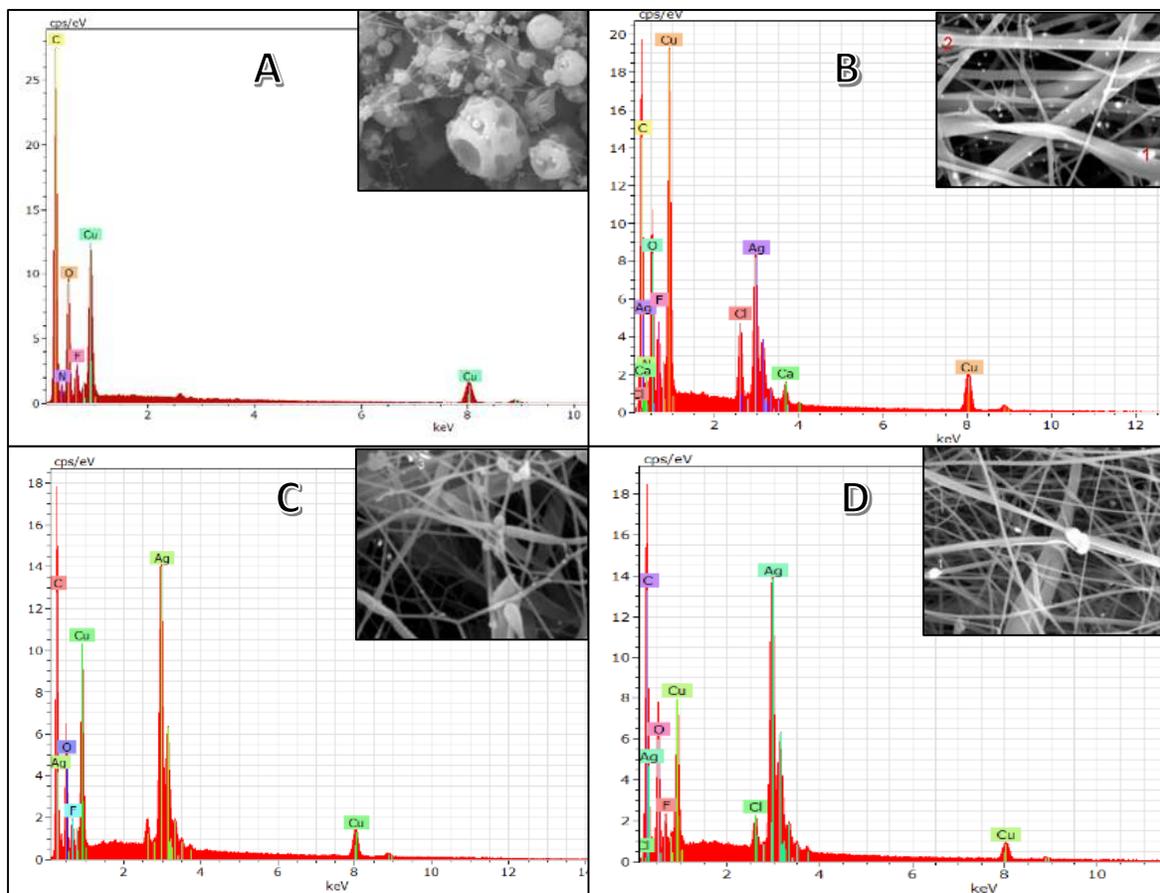
Esto posiblemente se puede explicar de la siguiente manera: siendo el  $\text{AgNO}_3$  parte del complejo, gran parte de las AgNPs generadas se mantienen ligadas a la afinina, la cual en forma de complejo también forma parte de las nanofibras generadas y está inmersa completamente en la estructura de las mismas. Esto se sustenta al observar detalladamente la **Figura 21D**, ya que existen zonas mucho más brillantes de algunas nanofibras lo que evidencia la presencia de AgNPs integradas a la estructura de las nanofibras.

Tomando como base la escala indicada al pie de la micrografía, se podrían especular tamaños de las AgNPs entre 100 y 500 nm con una mínima presencia de aglomerados de AgNPs. Debido a limitaciones de la resolución del microscopio, así como limitaciones por el manejo de muestras poliméricas en SEM (ya que el haz de electrones a mayores acercamientos degrada la muestra), no se puede asegurar que el tamaño exacto de las AgNPs (**Figura 22**) sea el determinado por el equipo (110 nm de diámetro promedio), sin embargo las imágenes sustentan los resultados obtenidos por Espectroscopia UV-Vis (**Figura 18**), confirmando la formación de AgNPs por la técnica propuesta. Adicionalmente, también es posible confirmar que el CTS es un excelente soporte para la NPs durante el proceso de formación de las nanofibras generándose un material compuesto de buena calidad.



**Figura 22.** Probables diámetros medidos de AgNPs.

La presencia de Ag en las muestras es posible corroborarla a través del análisis elemental (cualitativo y semicuantitativo) por Espectroscopia de Energía Dispersiva (EDS). Esta técnica se aplica a superficies de muestras sólidas y permite conocer la composición elemental de forma cuantitativa presente en el área analizada [42]. El análisis de las muestras antes discutidas se presenta en la **Figura 23**.



**Figura 23.** Micrografías de análisis elemental de las nanofibras. A) Nanofibras de CTS/afinina B) Nanofibras de CTS/AgNPs C) Nanofibras de CTS/afinina+AgNPs D) CTS/afinina+AgNPs. Nótese que el análisis elemental detecta Cobre (Cu), lo anterior se debe a que las muestras fueron previamente metalizadas con éste metal para su análisis.

Claramente se muestra una mayor cantidad de Ag en la muestra correspondiente al compuesto CTS/afinina-AgNPs respecto del compuesto CTS/AgNPs. Es importante mencionar que se realizaron los cálculos correspondientes para que todos los componentes estuvieran en la misma proporción en cada uno de los compuestos procesados por reducción química (excepto la mezcla CTS-afinina) y posterior electrohilado). Sin embargo, con estos análisis no es posible diferenciar si la Ag corresponde solamente a plata en forma de nanopartículas.

### 7.6.3 Determinación de la actividad antimicrobiana.

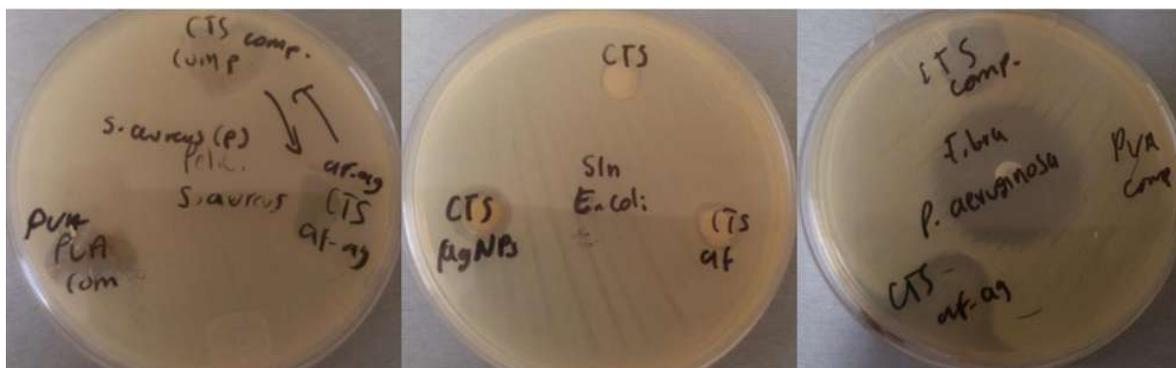
La actividad antimicrobiana de los compuestos analizados se evaluó frente a tres microorganismos representativos: *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. aureus*. Se utilizaron tres sensidiscos del antibiótico Meropenem como control, de manera que cada sensidisco estuviera presente en cada tipo de muestra y microorganismo. Los compuestos se probaron en tres diferentes presentaciones; solución, películas y fibras.

Al término del período de incubación se presentó la formación de halos de inhibición los cuales se muestran en la **Figura 24**. Las dimensiones de los halos de inhibición, así como el detalle de cada una de las muestras analizadas se presentan en la **Tabla 3**.

**Tabla 3.** Halos de inhibición obtenidos en el ensayo microbiológico.

MICROORGANISMO	MUESTRA						TIPO
	CTS	CTS/ afinina	CTS/ AgNPs	CTS/Af+ AgNPs	CTS/afinina- AgNPs	AbC	
<i>E. coli</i>	---	---	1 mm	1 mm	---		PELÍCULA
<i>S. aureus</i>	---	---	---	---	---	11 mm	
<i>P. aeruginosa</i>	---	---	---	1 mm	1 mm		
<i>E. coli</i>	1 mm	2 mm	2 mm	5 mm	4 mm	13 mm	SOLUCIÓN
<i>S. aureus</i>	1 mm	1 mm	2 mm	3 mm	2 mm		
<i>P. aeruginosa</i>	1 mm	1 mm	2 mm	4 mm	3 mm		
<i>E. coli</i>	1 mm	3 mm	3 mm	7 mm	6 mm		NANOFIBRA
<i>S. aureus</i>	1 mm	2 mm	3 mm	6 mm	5 mm		
<i>P. aeruginosa</i>	1 mm	3 mm	5 mm	6 mm	4 mm	11 mm	

Anteriormente Hsu S. y colaboradores [43] reportaron diámetros de inhibición de compuestos CTS/AgNPs contra *S. aureus*, los cuales no fueron superiores a 0.68 mm. Por otro lado, Thomas V. y colaboradores [44] reportaron diámetros de inhibición en compuestos CTS/AgNPs de 1 mm contra *E. coli*. Hubo claras diferencias de los halos de inhibición obtenidos que dependieron de las diferentes muestras y microorganismos (**Figura 24**). Los mejores resultados se obtuvieron con los compuestos CTS/afinina-AgNPs y CTS/afinina+AgNPs. Los compuestos en forma de nanofibras fueron los que dieron mejores resultados y el microorganismo más susceptible fue *E. coli*. El CTS fue componente con efecto inhibitorio reducido o casi nulo, al igual que el de las películas y el microorganismo menos sensible fue *S. aureus*. Estos resultados sugieren que los efectos antimicrobianos de las muestras estén asociados con las características de ciertas especies bacterianas, más específicamente, la estructura de su membrana. La pared de las bacterias Gram (+) contienen peptidoglicano a diferencia de las Gram (-) [2]. Hong Jeong y colaboradores [2] sugieren que la resistencia de *S. aureus* se debe a la diferencia de la naturaleza de la pared celular Gram (+), es decir, puede existir una mayor dificultad de penetrarla y por lo tanto, la actividad antimicrobiana se ve reducida. Lo anterior podría justificar también el hecho de que *E. coli* y *P. aeruginosa* presenten más sensibilidad ante nuestros compuestos. Para confirmar esta hipótesis, se necesitan más estudios comparativos entre las bacterias Gram (-) y Gram (+).



**Figura 24.** Pruebas antimicrobianas. De izquierda a derecha: Películas con actividad antimicrobiana nula en contra de *S. aureus*. Soluciones con actividad antimicrobiana escasa en contra de *E. coli*. Fibras con halos de inhibición superiores en contra de *P. aeruginosa*.

Como se mencionó anteriormente, las películas registraron halos de inhibición mucho menores a los de las nanofibras, lo cual sugiere que debido a la estructura física de las nanofibras su efectividad es mayor, esto puede atribuirse a la característica más peculiar de las nanofibras, que es su alta relación área superficie/volumen, lo que hace que una mayor área de material se encuentre expuesta para su interacción con los microorganismos lo cual aumenta su efectividad contra los mismos; los componentes a escala nanométrica al tener mayor superficie disponible para la interacción, ejercerán un efecto bactericida mayor en comparación con aquellas más grandes [3].

Finalmente, como discusión general, el CTS obtuvo halos de inhibición constantes de 1 mm, mientras que combinado con la afinina alcanzó un rango de hasta 3 mm. Combinado con las AgNPs obtuvo halos de inhibición de 2-5 mm. Con nuestro compuesto objetivo (CTS/afinina-AgNPs) se obtuvo un efecto sinérgico, es decir, es evidente que la actividad antimicrobiana que presentó es igual a la suma de las actividades antimicrobianas individuales de los componentes, si se toma en cuenta la actividad de la afinina y de las AgNPs de forma individual. En contraste, el compuesto CTS/afinina+AgNPs, presenta sinergismo potenciado, en donde la actividad antimicrobiana del mismo es mayor a la suma de los componentes individuales (afinina y AgNPs). Esto puede deberse a que los componentes adicionados individualmente al CTS y no en forma de complejo se encuentran con una mayor disposición en la superficie de las nanofibras, a diferencia de cuando se encuentran formado el complejo, que tal y como se observó por FESEM, estos componentes se encuentran inmersos formando parte de las nanofibras.

Los ensayos antimicrobianos respetaron la  $DL_{50}$  de la afinina en todas las muestras, por lo que los otros componentes se acoplaron y se adicionaron de manera proporcional. Los resultados mostraron que en efecto el bionanocompuesto CTS/afinina-AgNPs puede tener potencial aplicación en el área médica, donde la higiene representa un factor clave. Por otro lado, a pesar de que el compuesto CTS/afinina+AgNPs tuvo mejores halos de inhibición, éste no sería un biomaterial adecuado para su uso en el área biomédica debido a que presenta muchos defectos, tal y como se observó por FESEM.

## 8. CONCLUSIONES

Se generó exitosamente el nanocompuesto de CTS/afinina-AgNPs en forma de nanofibras por medio del proceso de electrohilado. El material compuesto partió de la formación del complejo del extracto de afinina con AgNO<sub>3</sub>. El complejo se redujo químicamente a afinina-AgNPs y la producción de nanopartículas de Ag a partir del complejo se confirmó mediante Espectroscopia UV-Vis y Microscopía Electrónica de Barrido por Emisión de Campo (FESEM). Con lo anterior, se verifica el uso del CTS como un agente reductor eficaz en la producción de AgNPs por reducción química mediante radiación solar.

El material compuesto final es homogéneo, innovador y original con actividad antimicrobiana potenciada. Se estableció una metodología adecuada que facilitó el electrohilado de las soluciones y se establecieron las condiciones óptimas para su producción.

Adicionalmente, mediante FESEM se observó que las nanofibras obtenidas tienen diámetros promedio de 600 nm, son buena calidad, homogéneas y con una distribución adecuada, y el diámetro promedio de las AgNPs sintetizadas es de 110 nm.

El ensayo microbiológico mostró la efectiva actividad antimicrobiana de los nanocompuestos de CTS/afinina-AgNPs en contra de las bacterias *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*. El material compuesto en forma de nanofibras cuenta una elevada superficie de contacto lo que mejora la actividad antimicrobiana, comparado con el material compuesto en forma de películas o en solución.

## 9. PERSPECTIVAS

Completar la caracterización del complejo de coordinación Afinina-AgNO<sub>3</sub> por Espectroscopía de Masas de Alta Resolución.

Establecer una metodología adecuada para la eliminación de cualquier posible remanente de ácido trifluoroacético en el material compuesto final para descartar cualquier efecto tóxico.

En lo posible, proponer una estrategia alternativa para evitar el uso del ácido trifluoroacético en la síntesis del nanocompuesto.

Determinar la DL<sub>50</sub> de las nanofibras CTS/afinina-AgNPs y realizar más pruebas antimicrobianas con el fin de explorar el efecto del compuesto en bacterias Gram (+) y en Gram (-).

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Bedolla-Cazás F., Synthesis of a bionanocomposite with pharmacological potential, 3rd US-México Symposium on Advances in Polymer Science y XXX Congreso Nacional de la Sociedad Polimérica de México, Nuevo Vallarta, **2014**.
2. Gamboa W., Mantilla O., Castillo V, Producción de micro y nano fibras a partir de la técnica “Electrospinning” para aplicaciones farmacológicas, VII Congreso de la Sociedad Cubana de Bioingeniería, La Habana, **2007**.
3. Pérez-Nava A., Síntesis verde de nanopartículas metálicas en solución polimérica para la producción de nanofibras por electrospinning, Tesis de Licenciatura, IIQB, **2013**.
4. Wazed Ali S., Rajendranb S., Joshi M., Synthesis and characterization of chitosan and silver loaded chitosan nanoparticles for bioactive polyester, *Carbohydrate Polymers* **2011**, 83, 438–446.
5. Molina-Torres J., García-Chávez A., Ramírez-Chávez E., Antimicrobial properties of alkaloids present in flavouring plants traditionally used in Mesoamerica: affinin and capsaicin, *Journal of Ethnopharmacology* **1999**, 64, 241–248.
6. Rios Y., Aguilar A. B., Gutiérrez M., Analgesic activity of affinin, an alkaloid from *Heliopsis longipes* (Compositae), *Journal of Ethnopharmacology* **2007**, 110, 364–367.
7. Hernández I., Márquez L., Martínez I., Dieguez R., Del porte C., Prieto S., Molina-Torres J., Garrido G., Anti-inflammatory effects of ethanolic extract and alkaloids-derived from *Heliopsis longipes* roots, *Journal of Ethnopharmacology* **2009**, 124, 649–652.
8. Boonen J., Baert B., Roche N., Burvenich C., De Spiegeleer B., Transdermal behaviour of the N-alkylamide spilanthol (affinin) from *Spilanthes acmella* (Compositae) extracts, *Journal of Ethnopharmacology* **2010**, 127, 77–84.
9. Sun K., Li Z. H., Preparations, properties and applications of chitosan based nanofibers fabricated by electrospinning, *Polymer Letters* **2011**, 5, 342–361.
10. Molina-Torres J., Salgado-Garciglia R., Ramírez-Chávez E., Del Río R. E., Purely olefinic alkaloids in *Heliopsis longipes* and *Acemella* (*Spilanthes*) *oppositifolia*, *Biochemical Systematics and Ecology* **1996**, 24, 43–47.
11. González-Campos J. B., Hernández-Marcelo P. E., Síntesis en un solo paso de nanofibras polímero/nanopartículas metálicas, 3er Congreso del Verano Nicolaita, Morelia, **2014**.

12. Ching-Wen L., An-Pang C., Jia-Horng L., Antimicrobial activity of UV-induced chitosan capped silver nanoparticles, *Materials Letters* **2014**, 128, 248-252.
13. Jun-Sung K., Eunye K., Kyeong-Nam Y., Jong-Ho K., Jung-sin P., Hu-Jang L., So-Hyun K., Young-Kyung P., Yong-Ho P., Cheol-Yong H., Yong-Kwon K., Yoon-Sik L., Dae-Hong J., Myung-Haing C., Antimicrobial effects of silver nanoparticles, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* **2007**, 3, 95–101.
14. Zhao Y., Zhou Y., Wu X., Wang L., Xua L., Wei S., A facile method for electrospinning of Ag nanoparticles/poly (vinyl alcohol)/carboxymethyl-chitosan nanofibers, *Applied Surface Science* **2012**, 258, 8867–8873.
15. Abdelgawad A., Hudson S., Rojas O., Antimicrobial wound dressing nanofiber mats from multicomponent (chitosan/silver-NPs/polyvinyl alcohol) systems, *Carbohydrate Polymers* **2014**, 100, 166–178.
16. Khanna P., Singh N., Charan S., Charan S., Subbarao V., Gokhale R., Mulik U., Synthesis and characterization of Ag/PVA nanocomposite by chemical reduction method, *Materials Chemistry and Physics* **2005**, 93, 117–121.
17. Faraji N., Yunus M., Kharazmi A., Saion E., Third-order nonlinear optical properties of silver nanoparticles mediated by chitosan, *Optik: International Journal for Light and Electron Optics* **2014**, 125, 2809-2812.
18. Ledo-Suárez A., Síntesis y funcionalización de ligandos poliméricos para su empleo en la fabricación, estabilización y autoorganización de sistemas de nanopartículas, Memoria para optar al grado de Doctora en Química, Universidad de Santiago de Compostela, **2011**.
19. Dongwei W., Wuyong S., Weiping Q., Yongzhong Y., Xiaoyuan M., The synthesis of chitosan-based silver nanoparticles and their antibacterial activity, *Carbohydrate Research* **2009**, 344, 2375–2382.
20. Kumar-Mittal A., Chisti Y., Chand-Banerjee U., Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts, *Biotechnology Advances* **2013**, 31, 346–356.
21. Moharram M., Khalil S., Sherif H., Khalil W., Spectroscopic study of the experimental parameters controlling the structural properties of chitosan–Ag nanoparticles composite, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2014**, 126, 1–6.
22. Yawo-Kuo T., Yu-Wan C., Chao-Ming S., Preparation of silver nanoparticles using chitosan suspensions, *Powder Technology* **2008**, 185, 251–257.

- 23.** Nidhija R., Archana G., Aditi J., Susinjan B., Vibha R., Green synthesis of silver nanoparticles: An approach to overcome toxicity, *Environmental Toxicology and Pharmacology* **2013**, 36, 807–812.
- 24.** Chen P., Song L., Liu Y., Fang Y., Synthesis of silver nanoparticles by g-ray irradiation in acetic water solution containing chitosan, *Radiation Physics and Chemistry* **2007**, 76, 1165–1168.
- 25.** Kousaku O., Cha D., Kim H., Nishida A., Yamamoto H., Electrospinning of Chitosan, *Macromolecular Rapid Communications* **2004**, 25, 1600-1605.
- 26.** Rodríguez-Argüelles M., Sieiro C., Cao R., Nasi L., Chitosan and silver nanoparticles as pudding with raisins with antimicrobial properties, *Journal of Colloid and Interface Science* **2011**, 364, 80–84.
- 27.** Sang J., Dong N., Ji M., Ji-Hoi M., Wan-Kyu K., Jung-Bok L., Min-Soo B., Se-Woong P., Ji-Eun K., Dong-Hyun L., Eun-Cheol K., Chang-Hoon L., Il-Keun K., Electrospun chitosan nanofibers with controlled levels of silvernanoparticles, Preparation, characterization and antibacterial activity, *Carbohydrate Polymers* **2014**, 111, 530–537.
- 28.** Youssef A., Abdel-Aziz M., El-Saye S., Chitosan nanocomposite films based on Ag-NP and Au-NP biosynthesis by *Bacillus Subtilis* as packaging materials, *International Journal of Biological Macromolecules* **2014**, 69, 185–191.
- 29.** Rogina A., Electrospinning process: Versatile preparation method for biodegradable and natural polymers and biocomposite systems applied in tissue engineering and drug delivery, *Applied Surface Science* **2014**, 296, 221–230.
- 30.** Duque L., Rodriguez L., López M., Electrospinning: La era de las nanofibras, *Revista Iberoamericana de Polímeros* **2013**, 14, 10-27.
- 31.** Salgado-Garciglia R., Molina-Torres J., López-Meza J., Loeza-Lara P., Efecto del extracto crudo y los compuestos bioactivos de *Heliopsis longipes* sobre la incidencia de la antracnosis, micorrización y nodulación del frijol, *Agrociencia* **2008**, 42, 679-688.
- 32.** Kyu W., Jitareerat P., Kanlayanarat S., Sangchote S., Effects of cinnamon extract, chitosan coating, hot water treatment and their combinations on crown rot disease and quality of banana fruit, *Postharvest Biology and Technology* **2007**, 45, 333-340.
- 33.** Bautista-Baños S., Hernández-López M., Bosquez-Molina E., Wilson C., Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit, *Crop Protection* **2003**, 22, 1087–1092.

- 34.** Suwanton O., Opanasopit P., Ruktanonchai U., Supaphol P., Electrospun cellulose acetate fiber mats containing curcumin and release characteristic of the herbal substance, *Polymer* **2007**, 48, 7546-7557.
- 35.** Kushwaha H., Malik C., Nanofabrication of silver nanoparticles from the stem and leaf extract of *Verbesina encelioides*, *National Academy Science Letters* **2012**, 35, 555–563.
- 36.** Calle J., Rivera A., Reguero M. T., del Río R. E., Joseph-Nathan P., Estudio del espilantol usando técnicas de resonancia magnética nuclear en dos dimensiones, *Revista Latinoamericana de Química* **1988**, 19, 94-97.
- 37.** Boufi S., Rei M., Ferraria A., Botelho A., In situ photochemical generation of silver and gold nanoparticles on chitosan, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2013**, 439, 151–158.
- 38.** Sifontes A., Melo L., Maza C., Mendes J., Mediavilla J., Brito J., Zoltan T., Albornoz A., Preparación de nanopartículas de plata en ausencia de polímeros estabilizantes, *Química Nova* **2010**, 33, 1266-1269.
- 39.** Hernández C., Águila A., Flores A., Viveros-Nava E., Ramos C., Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón, *Superficies y Vacío* **2009**, 22, 57-60.
- 40.** Haider S., Park S. Y., Lee S. H., Preparation, swelling and electro-mechano-chemical behaviours of gelatin-chitosan blend membrane, *Soft Matter* **2008**, 4, 485-490.
- 41.** Chen J. P., Chen S. H., Lai G. J., Preparation and characterization of biomimetic silk fibroin/chitosan composite nanofibers by electrospinning for osteoblasts culture, *Nanoscale Research Letters* **2012**, 7:170, 1-11.
- 42.** Legorreta-García F., Hernández-Cruz L., García-Delgado F., Bolarín-Miró A., Sánchez-De Jesús F., Estudio comparativo del uso de ácido cítrico y urea en la síntesis de manganitas de calcio dopadas con europio por el método de combustión, *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales* **2012**, 32, 12-20.
- 43.** Hsu S., Chang Y. B., Tsai C. L., Fu K. Y., Wang S. H., Tseng H. J., Characterization and biocompatibility of chitosan nanocomposites, *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, **2011**, 85,198-206.
- 44.** Thomas V., Yallapu M. M., Sreedhar B., Bajpai S., Fabrication, characterization of chitosan/nanosilver film and its potential antibacterial application, **2009**, 20, 2129-2144.