



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

TESIS

**ANÁLISIS DEL PROCESO DE REDUCCIÓN QUÍMICA PARA LA
PRODUCCIÓN DE NANOPARTICULAS DE ORO Y PLATA EN
SOLUCIÓN BIOPOLIMÉRICA Y LA PRODUCCIÓN DE
NANOFIBRAS COMPUESTAS**

QUE PRESENTA:

JESSICA STEFFANY PÉREZ CAMPOS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACOBIOLOGA

ASESORA:

DOC. EN CIENCIAS JANETT BETZABE GONZÁLEZ CAMPOS

CO-ASESORA:

MA. EN CIENCIAS JULIA HERNÁNDEZ VARGAS

MORELIA, MICHOACÁN ABRIL 2015

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 D.C. Janett Betzabé González Campos. Con el financiamiento como becaria del proyecto CONACYT 150767, proyecto CIC Y financiamiento SUBES.

Parte de este trabajo fue presentado en el 3rd US-México Symposium on Advances in Polymer Science, XXX CONGRESO DE LA SOCIEDAD POLIMÉRICA DE MÉXICO, celebrado del 3-6 de Diciembre 2014 en Nuevo Vallarta, Nayarit, México.

DEDICATORIA

A mi mami Elitania (Tany), porque gracias a ti estoy aquí, luchando por ser una mujer de bien. Porque nunca me has dejado caer y siempre has estado incondicionalmente para mí, aplaudiendo mis triunfos y brindándome tu apoyo en mis derrotas. Por la vida y educación brindadas, pero sobre todo por tu inmenso amor. TE AMO MAMI <3

A mis hermanas Nancy, Rocio y Janett, aunque en ocasiones me hacen bullying, saben que LAS AMO <3, porque gracias a sus buenos ejemplos y consejos, mi vida lleva un buen camino. Gracias por cada jalón de oreja, por cada noche de desvelo cuidando de mí, explicando tareas y llenándome de amor.

A mi hija Karla Ivón, por ser el gran motor de mi vida, porque por ti y para ti me superaré, tratando siempre de brindarte lo mejor, haciendo de ti una mujer de bien, dándote todo mi amor. Gracias por todo el amor que me das mi niña y por ser tan paciente conmigo, TE AMO INMENSAMENTE <3

A mi abuelita Triny, por los principios y valores inculcados, por tus sabios consejos y tus cuidados, por ser un ejemplo de vida, y aunque ya no estás aquí sabes que TE AMO y siempre te recordaré.

A Dios y a la vida misma, por traerme siempre de la mano, llena de bendiciones, fortaleza y amor incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora D.C. Janett Betzabé González Campos, por el tiempo y la confianza, por motivarme para seguir superándome y por ser un ejemplo a seguir.

A mi co-asesora M.C. Julia Hernández Vargas y sinodales D.C. Yliana López Castro, D.C. Judit A. Aviña Verduzco, D.C. Juan Pablo García Merinos, M.C. Melissa Tapia Juárez y M.C. Ramón Guzmán Mejía, por el tiempo y consejos brindados para el mejoramiento del presente trabajo.

Al personal del laboratorio EDULAB, por permitir la realización de las pruebas microbiológicas en sus instalaciones.

A mis compañeros de trabajo y ahora amigos Ale, Perla y Fer, por sus consejos, tiempo y conocimientos brindados, así como por los excelentes momentos que pasamos juntos 😊

A mis amig@s y familiares en general, por estar SIEMPRE ahí, motivándome para salir adelante, ¡@s quiero mucho 😊 P.D. No los nombro, para evitar que alguno se me pase, pero si lo estás leyendo sabes que estas incluid@, por ser parte de mi vida.

A ti Mario, por estos 10 años de vivencias juntos, apoyándonos en todo momento, gracias por tu paciencia, por tu comprensión, por tu amor, TE AMO <3

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y FÓRMULAS	xi
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xvi
1.- Introducción	1
2.- Justificación	4
3.- Objetivos	5
3.1.- Objetivo general.....	5
3.2.- Objetivos específicos.....	5
4.- Hipótesis	6
5.- Antecedentes y Marco Teórico	7
5.1.- Nanociencia y nanotecnología.....	7
5.2.- Nanomateriales y nanopartículas.....	8
5.2.1.- Aplicaciones de las nanopartículas metálicas.....	10
5.2.2.- Nanopartículas de oro y plata.....	10
5.3.- Métodos de síntesis y caracterización de nanomateriales.....	11
5.3.1.- Síntesis verde de nanopartículas.....	14
5.4.- Polímeros.....	18
5.5.- Quitosano.....	19
5.5.1.- Aplicaciones del quitosano.....	20
5.5.2.- Compuestos quitosano-AuNPs.....	21

5.5.3.- Compuestos quitosano-AgNPs.	22
5.6.- Nanofibras.	24
5.6.1.- Factores que influyen en el proceso de electrospinning.	26
5.6.1.1.- Parámetros de la solución.	27
5.6.1.2.- Parámetros del proceso.	28
5.6.2 Nanofibras de quitosano	29
5.6.3- Nanofibras de compuestos polímero/nanopartículas metálicas.	30
6.- Materiales y metodología.	31
6.1.- Síntesis de nanopartículas metálicas en solución de CTS	31
6.1.1.-Preparación de las soluciones.	31
6.1.2.- Síntesis de nanopartículas.	32
6.2.- Obtención de las películas de quitosano/nanopartículas metálicas (CTS/AgNPs y CTS/AuNPs).	32
6.3.- Síntesis de nanofibras de quitosano/nanopartículas metálicas (CTS/AgNPs y CTS/AuNPs).	33
6.4.- Determinación de la actividad antimicrobiana de compuestos CTS/NPMs.	33
6.5.- Caracterización de los materiales obtenidos.	34
6.5.1.- Caracterización de las nanopartículas.	34
6.5.2.- Caracterización de la morfología de nanofibras y películas.	35
7.- Resultados y discusión.	36
7.1.- Caracterización de las soluciones de CTS con precursor químico expuestas a las diferentes fuentes energéticas para producción de NPMs.	37
7.1.1.- Caracterización visual por cambio de coloración para AgNPs.	37
7.1.2.- Caracterización visual por cambio de coloración para AuNPs.	37

7.2.- Espectroscopia Molecular de Absorción UV-Vis.	39
7.2.1- Espectroscopia Molecular de Absorción UV-Vis: evaluación del método y tiempo de reducción de las soluciones CTS/AgNPs.	39
7.2.2.- Espectroscopia Molecular de Absorción UV-Vis: evaluación del método y tiempo de reducción de las soluciones CTS/AuNPs.	41
7.2.3.- Espectroscopia Molecular de Absorción UV-Vis: evaluación del método y tiempo de reducción de las soluciones CTS/AgNPs.	42
7.2.4.- Espectroscopia Molecular de Absorción UV-Vis: evaluación del método y tiempo de reducción de las soluciones CTS/AuNPs.	45
7.3.- Obtención de películas delgadas de compuestos CTS/AgNPs y CTS/AuNPs.	47
7.4.- Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR). . .	48
7.4.1.- Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR) para compuestos CTS/AgNPs.	48
7.4.2.- Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR) para compuestos CTS/AuNPs.	51
7.5.- Obtención de nanofibras de compuestos CTS/AgNPs y CTS/AuNPs. .	52
7.6.- Caracterización estructural por Microscopía Electrónica de Barrido por Emisión de Campo (FESEM)	53
7.6.1.- Caracterización estructural por microscopía electrónica de barrido por emisión de campo de películas delgadas y nanofibras de compuestos CTS/AgNPs.	54
7.6.2.- Caracterización estructural por microscopía electrónica de barrido por emisión de campo de películas delgadas y nanofibras de compuestos CTS/AuNPs.	56
7.7.- Determinación de la actividad antimicrobiana de compuestos CTS/nPMs.	58
7.7.1- Determinación de la actividad antimicrobiana de compuestos CTS/AgNPs.	59
7.7.2- Determinación de la actividad antimicrobiana de compuestos CTS/AuNPs.	61

8.- Conclusiones.	63
9.- Bibliografía.	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Escala de tamaños de Nanomateriales.	8
Figura 2.- Clasificación de Nanomateriales..	8
Figura 3.- Fuentes comunes de nanopartículas en el medio ambiente.	9
Figura 4.- Mecanismo de crecimiento para la formación de NPs.	16
Figura 5.- Tipos de polímeros. A: lineal, B: ramificado, C: reticulado.	18
Figura 6.- Representación esquemática de la reacción de desacetilación de la quitina para obtener quitosano.	20
Figura 7.- Montaje del sistema de electrospinning.	26
Figura 8.- Esquema de las etapas del análisis de resultados.	36
Figura9.- Síntesis de AgNPs, con radiación solar.	37
Figura10.- Síntesis de AuNPs, con radiación solar.	38
Figura 11.- Evaluación de la concentración de las soluciones CTS/AgNPs por reducción solar.	40
Figura 12.- Evaluación de la concentración de las soluciones CTS/AuNPs por reducción con radiación solar.	41
Figura 13.- Espectro UV-Vis para AgNPs.	42
Figura 14.- Curvas de la reducción progresiva en solución de CTS 1.5% w/w, Ag 0.7% w/w.	44
Figura 15.- Espectro UV-Vis para AuNPs.	46
Figura 16.- Curvas de la reducción progresiva en solución de CTS 2% w/w, Au 1.5% w/w.	47
Figura 17.- Película de CTS con nPMs.	47

Figura 18.- Espectros de IR para CTS/AgNPs.	49
Figura 19.- Ampliación de la región IR 1800-1000 para CTS/AgNPs.	49
Figura 20.- Espectros de IR para CTS/AuNPs.	51
Figura 21.- Ampliación de la región IR 1800-1000 para CTS/AuNPs.	52
Figura 22.- Equipo de electrospinning para la obtención de nanofibras CTS/AgNPs y CTS/AuNPs.	53
Figura 23.- Nanofibras CTS/AgNPs e Histograma de distribución de tamaño de partícula.	54
Figura 24.- AgNPs en películas de CTS (reducción mecánica) e Histograma de distribución de tamaños.	55
Figura 25.- AgNPs en películas de CTS (reducción solar) e Histograma de distribución de tamaños.	55
Figura 26.- Nanofibras CTS/AuNPs.	57
Figura 27.- AuNPs en películas de CTS (reducción mecánica) e Histograma de distribución de tamaños.	57
Figura 28.- AuNPs en películas de CTS (reducción solar) e Histograma de distribución de tamaños.	58
Figura 29.- Prueba de susceptibilidad a compuestos CTS/AgNPs A: <i>Pseudomona aeruginosa</i> , B: <i>Staphylococcus aureus</i> y C: <i>Escherichia coli</i>	59
Figura 30.- Prueba de susceptibilidad a compuestos CTS/AgNPs A: <i>Pseudomona aeruginosa</i> , B: <i>Staphylococcus aureus</i> y C: <i>Escherichia coli</i>	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Reactivos y equipos utilizados.	31
Tabla 2.- Soluciones de CTS con precursor químico realizadas.	32
Tabla 3.- Parámetros para la reducción química.	38
Tabla 4.- Halos de inhibición para compuestos CTS/AgNPs y Meropenem.. . . .	60

Tabla 5.- Halos de inhibición para compuestos CTS/AuNPs y Quitosano 2%.....

61

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y FÓRMULAS

<	Menor que
%	Porcentaje
λ	Longitud de onda
>	Mayor que
γ	Gamma
(0)	Cerovalente
ml	Microlitros
μm	Micrómetros
~	Aproximadamente
\pm	Mas-menos
\geq	Mayor o igual que
®	Marca registrada
°C	Grados Celsius
3D	Tercera Dimensión
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ag	Plata
Ag ⁺	Ión plata
AgNO ₃	Nitrato de plata
AgNPs	Nanopartículas de plata

Aprox	Aproximadamente
Au	Oro
AuNPs	Nanopartículas de oro
c/u	Cada Uno
CF ₃ COOH	Ácido trifluoroacético
CH ₃ COOH	Ácido acético glacial
cm	Centímetro
cm ⁻¹	Centímetro a la menos uno
C-O	Enlace Carbono-Oxígeno
-COO ⁻ , -C=O.	Grupo funcional carboxilo
CTS	Quitosano
CVD	Deposición Química de Vapor
e ⁻	Electrón
etc	Etcétera
eV	Electronvolt
EXAFS	Extendida de absorción de rayos X Estructura Fina
FESEM	Microscopía Electrónica de Barrido por Emisión de Campo
FIR	Infrarrojo Lejano
FT-IR	Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier
g/mol	Gramos por mol
h	Horas
H ₂ O	Agua
HAuCl ₄	Ácido cloroáurico
H-N	Enlace Hidrogeno-Nitrógeno

IR	Infrarrojo
ISISA	Segregación de Hielo y Autoensamblaje Inducido
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
kV	Kilovolt
M.C	Maestro en Ciencias
MeOH	Metanol
mg/mol	Miligramos por mol
min	Minuto
MIR	Infrarrojo medio
mL/min	Mililitro por minuto
N	Nitrógeno
Na ₂ S ₂ O ₃	Tiosulfato de sodio
NH ₂	Grupo funcional amino
-NH ₃ ⁺	Grupo amino protonado
NIR	Infrarrojo cercano
nm	Nanómetros
NPMs	Nanopartículas metálicas
NPs	Nanopartículas
NPsPd	Nanopartículas de Paladio
OH	Grupo funcional oxidrilo
P	Fósforo
PEG	Poli(etilenglicol)
PEO	Poli (óxido de Polietileno)

pH	Potencial Hidrogeno
PU	Poliuretanos
PVA	Alcohol polivinílico
PVC	Cloruro de Polivinilo
PVD	Deposición física de vapor
PVP	Polivinilpirrolidona
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RPS	Resonancia de Plasmones de Superficie
S	Azufre
S/N	Relación Señal/Ruido
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SQUID	Dispositivo de Interferencia Cuántica Macroscópica
TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta visible
w/w	Porcentaje peso/peso, por sus siglas en ingles.
XANES	Espectroscopia de rayos x cercana al borde de absorción

RESUMEN

Los compuestos, polímero-nanopartículas metálicas (NPMs) son materiales versátiles y útiles en diversas áreas, debido a que presentan interesantes propiedades ópticas, electrónicas, magnéticas y catalíticas, además del efecto inhibitor y bactericida que las nanopartículas (NPs) poseen frente a diferentes microorganismos patógenos. Debido a las necesidades actuales, es necesario desarrollar métodos de síntesis con alta eficiencia pero que a la vez sean amigables con el medio ambiente, de bajo costo y que generen materiales con propiedades fisicoquímicas superiores a las obtenidas convencionalmente en función de su utilidad.

En el presente trabajo, se presentan la síntesis y caracterización de nanopartículas de oro (AuNPs) y plata (AgNPs) generadas a través de una "síntesis verde". En esta ruta de síntesis se usó al biopolímero Quitosano (CTS) como agente reductor, dispersante y estabilizante, así como nitrato de plata y ácido cloroáurico como precursores químicos. Se aplicaron tres metodologías diferentes para llevar a cabo la reducción química: en la primera se expusieron las soluciones, polímero/precursor químico, a la radiación solar variando el tiempo de exposición desde 20 minutos para AgNPs, hasta 2 horas para AuNPs. La segunda metodología consistió en someter las soluciones a un tratamiento térmico-mecánico, a 80°C y 6 rpm., durante 1 hora 40 minutos para las AgNPs y 1 hora 20 minutos para las AuNPs. En la última y con ayuda de una lámpara de UV se irradiaron las soluciones por un lapso de 16 horas. Se analizaron concentraciones de 0.5, 1, 1.5 y 2 % peso de quitosano, 0.7, 0.5, 0.3 y 0.1 % peso de la solución de nitrato de plata y 1.5, 1, 0.7 y 0.45% peso de la solución de ácido cloroáurico, con la finalidad de conocer las concentraciones óptimas para la síntesis de NPMs. La generación de nPMs se confirmó mediante Espectroscopia UV-Vis y Microscopía Electrónica de Barrido por Emisión de Campo (FESEM).

A partir de las soluciones resultantes de la reducción química, se elaboraron películas por el método de evaporación del solvente y se generaron nanofibras compuestas CTS/NPMs en un equipo de electrospinning. Los parámetros adecuados para la generación de nanofibras fueron: temperatura de 40°C, velocidad de inyección 0.009 ml/min, distancia entre electrodos 12 cm, voltaje de 20-25 KV empleando un colector vertical.

Los compuestos CTS/nPMs se caracterizaron mediante Espectroscopia FTIR y FESEM y se evaluaron sus propiedades antimicrobianas por la técnica del halo de inhibición.

Palabras clave: Síntesis verde, Nanopartículas, Quitosano.

ABSTRACT

Polymer-metal nanoparticles (NPMs) composites are versatile and useful materials in several fields because they exhibit interesting electronic, magnetic optical and catalytic properties, besides the antibacterial effect that nanoparticles (NPs) have against different pathogen microorganisms. Due to current needs, it is necessary to develop methods of synthesis with high efficiency but at the same time ecofriendly, inexpensive and that could generate materials with improved physicochemical properties in terms of their usefulness.

This manuscript presents the synthesis and characterization of gold (AuNPs) and silver nanoparticles (AgNPs) generated through a "green synthesis". The biopolymer Chitosan (CTS) was used as the reducing, dispersing and stabilizing agent, and silver nitrate and chloroauric acid were the metal precursors. Three different methodologies were applied as the driving force to carry out chemical reduction: first, the polymer/chemical precursor solutions were exposed to sunlight varying the exposure time from 20 minutes for silver nanoparticles to 2 hours for gold nanoparticles. The second method consisted on exposing the solutions to a thermo-mechanical treatment at 80°C and 6 rpm; 1hour 40 minutes for AgNPs and 1hour 20 minutes for AuNPs. Finally, in the third method the solutions were exposed to a UV lamp during of 16 hour. Concentrations of 0.5, 1, 1.5 and 2% weight of chitosan, 0.7, 0.5, 0.3 and 0.1% weight of silver nitrate solution and 1.5, 1, 0.7 and 0.45% weight of chloroauric acid solution were analyzed to determine the optimal concentrations for NPMs synthesis. The synthesis of NPMS was confirmed by UV-Vis spectroscopy and Field Emission Scanning Electron Microscopy (FESEM)

With the resulting solutions from chemical reduction, films by the solvent evaporation method and composite nanofibers CTS/NPMs generated through electrospinning were prepared. The suitable parameters for nanofibers generation by electrospinning were: temperature 40°C, flow rate 0.009 ml/ min, distance between electrodes 12 cm, voltage 20 to 25 KV and vertical collector.

Keywords: Green Synthesis, Nanoparticles, Chitosan

1.- INTRODUCCIÓN.

En la época actual, la necesidad de nuevos materiales que satisfagan las necesidades que los avances tecnológicos requieren ha encauzado a girar el rumbo del esfuerzo científico a una nueva era en el estudio de la ciencia de los materiales, aportando como resultado, el desarrollo de una naciente e interesante rama del conocimiento, la Nanociencia. Usando estos nuevos conocimientos, se pretende mejorar los materiales ya existentes para un uso más efectivo [1]. La Nanociencia es la disciplina encargada de estudiar y sintetizar materiales en un rango de 1 a 100 nm [2]. En este sentido, está bien establecido que las nanopartículas de metales como oro (AuNPs) y plata (AgNPs) poseen interesantes aplicaciones en biomedicina además de una alta relación superficie-volumen intrínseca a su tamaño nanométrico. Añadiendo los conocidos efectos inhibidores y bactericidas ejercidos por las nanopartículas de plata y las aplicaciones en diagnóstico, terapia, catálisis y como biomarcadores de las nanopartículas de oro [3].

La síntesis de nanopartículas metálicas (NPMs), se lleva a cabo empleando métodos de Deposición Química de Vapor (CVD por sus siglas en inglés: Chemical Vapor Deposition), Deposición Física de Vapor (PVD por sus siglas en inglés: Physical Vapor Deposition), reducción directa de cationes metálicos en solución, deposición capa-por-capla (layer-by-layer), microondas e inducción electrostática. No obstante, estos métodos requieren de múltiples y laboriosos pasos de síntesis, y en general son específicos para un único metal [4]. Además de los métodos de síntesis mencionados anteriormente, también existen procedimientos que buscan contribuir al desarrollo de síntesis verde de nanopartículas en donde se emplean extractos de plantas o microorganismos para su síntesis. Sin embargo, aun cuando existen diversas metodologías, la reducción química de precursores metálicos sigue siendo la estrategia más empleada para la preparación de nanopartículas puesto que permite el control del tamaño y la morfología, al ser posible el control de la adición de los agentes reductores, estabilizantes y la variación de las intensidades y tiempos de exposición a las fuentes energéticas empleadas [3].

Uno de los aspectos más importantes en la síntesis de nanopartículas metálicas es su estabilización mediante el empleo de polímeros. Así, ya en 1718 Helcher indicó que las partículas de oro podían estabilizarse con el polímero natural almidón. Actualmente, se sabe que los polímeros permiten la síntesis de partículas metálicas solubles en agua.

A la vez que aumentaba el interés por la Nanociencia, se fueron desarrollando métodos de síntesis de nanopartículas estabilizadas por diferentes

polímeros, entre los más comunes se encuentran la polivinilpirrolidona (PVP) y el polietilenglicol (PEG) [2]. Existen numerosos métodos para la síntesis de nanopartículas metálicas en los cuales se incluye la formación de compuestos poliméricos, aunque los dos más empleados son: 1) la síntesis *in situ* de las nanopartículas en la matriz polimérica por reducción de sales metálicas disueltas en la misma matriz y 2) la evaporación de los metales a alta temperatura en la superficie del polímero. El primer método es el más habitual, ya que además de tratarse de un procedimiento sencillo, permite la obtención de nanopartículas con un alto rendimiento y en corto periodo de tiempo. En el segundo método se lleva a cabo la polimerización de la matriz alrededor de las nanopartículas, en el que el espesor de la capa de polímero puede ser controlado por la concentración del monómero [2].

Uno de los polímeros más empleados en la síntesis de nanopartículas metálicas es el quitosano, el cual es un polímero natural con potenciales aplicaciones en el área de biomateriales. El quitosano es un polisacárido catiónico lineal compuesto por unidades de (1-4)-2-desoxi-2-amino-*D*-glucopiranososa (*D*-glucosamina) (GlcN) y (1-4)-2-desoxi-2-acetamido-*D*-glucopiranososa (Nacetyl-*D*-glucosamina) (GlcNAc) derivado por desacetilación de quitina: poli [-(1-4)-2-acetamida-2-desoxi-*D*-glucopiranososa]. Esta última es la segunda sustancia polimérica natural más abundante después de la celulosa y se extrae por métodos químicos a partir de los exoesqueletos de crustáceos y de la concha caliza de moluscos [5].

El quitosano tiene aplicaciones farmacéuticas como: matriz de liberación prolongada de fármacos y en terapia génica, aplicaciones biomédicas tales como: fabricación de materiales bioadhesivos, fungistáticos, hemostáticos y en el tratamiento de heridas por quemadura, el quitosano ha mostrado buenos resultados facilitando la cicatrización y mejorando las funciones de las células inflamatorias, posee propiedades antimicrobianas, es biocompatible y clínicamente ha demostrado no producir reacciones alérgicas después de su implantación, inyección o aplicación tópica, además de ser biodegradable [5].

Las nanopartículas sintetizadas a partir de quitosano se forman de acuerdo a una aproximación de tipo bottom-up (de arriba hacia abajo) como resultado de procesos de entrecruzamiento, en virtud de los cuales las cadenas poliméricas se ordenan en estructuras nanoscópicas, ya sea por interacciones inter- o intramolecular de tipo covalente o no covalente [5].

En su estructura química, el quitosano posee grupos OH y NH₂ los cuales pueden actuar como agentes reductores de las sales precursoras para la síntesis de nanopartículas metálicas, de esta forma, es posible omitir el uso de agentes

reductores comúnmente empleados en la síntesis de nanopartículas en solución polimérica (6). En la síntesis de NPMs en soluciones de quitosano, el biopolímero puede asumir entonces el papel de agente reductor, estabilizante y dispersante. Adicionalmente, en la reducción química de sales metálicas en soluciones poliméricas es necesario aplicar una fuente energética para llevar a cabo dicha reducción empleando generalmente radiación UV, γ , microondas o temperaturas alrededor de los 90°C.

Por otra parte, en los últimos años ha surgido un gran interés en materiales de compuestos poliméricos a escala nanométrica y especialmente en forma de nanofibras. Particularmente las nanofibras obtenidas por medio de la técnica conocida como electrohilado (“electrospinning”) tienen un alto potencial debido a que poseen una alta relación superficie/volumen la cual es altamente deseable en la manufacturación de biosensores, prendas protectoras, dispositivos de filtración y liberación de medicamentos, así como soportes para el crecimiento de células y tejidos, entre otros [7].

Por lo anteriormente expuesto, el presente trabajo de tesis presenta la síntesis de nanopartículas metálicas en soluciones de quitosano. La síntesis propone el uso del quitosano como agente reductor, estabilizante y dispersante además del uso de radiación solar como la fuente energética para llevar a cabo la reducción química de las sales precursoras. De esta forma, se propone una ruta amigable como el ambiente al evitar el uso de un mayor número de agentes químicos y aprovechando la energía proporcionada de forma natural, contribuyendo así al desarrollo de la química verde.

Se analiza el uso de tres diferentes fuentes energéticas para la reducción química: radiación con lámpara UV, por aumento de temperatura y agitación magnética y por radiación solar. La producción de nanopartículas metálicas se monitorea mediante espectroscopia UV-Vis, y finalmente se corrobora mediante y Microscopía Electrónica de Barrido por Emisión de Campo (FESEM).

Las soluciones conteniendo las NPMS, fueron posteriormente procesadas mediante el método de evaporación del solvente para la obtención del compuesto en forma de películas delgadas y en el equipo de electrospinning para la producción de nanofibras compuestas CTS/AgNPs y CTS/AuNPs. Los compuestos fueron caracterizados mediante espectroscopia IR y FESEM. Adicionalmente se reporta la evaluación de sus propiedades antimicrobianas.

2.- JUSTIFICACIÓN.

La creciente demanda de Nanomateriales se debe a que poseen propiedades físicas, eléctricas, magnéticas y ópticas únicas, que con frecuencia son superiores a las de los materiales tradicionales. Debido a esto, es necesario desarrollar métodos de síntesis que conduzcan a la producción de materiales con alta eficiencia y con propiedades fisicoquímicas superiores a las obtenidas convencionalmente. Uno de los mayores inconvenientes, de muchos de estos métodos, es el problema de la generación de residuos y productos que afectan el medio ambiente, además del elevado costo de producción. Esto ha llevado a los investigadores a estudiar la obtención de compuestos que posean las propiedades deseadas en función de su utilidad pero que carezcan de las emisiones dañinas al medio ambiente, así como al desarrollo de procesos de producción que eliminen o minimicen la generación de emisiones contaminantes y reduzcan sus costos de producción.

Dado que el quitosano posee en su estructura química grupos funcionales que pueden actuar como agentes reductores, el presente trabajo propone la síntesis verde de nanopartículas metálicas por reducción química de sales metálicas, empleando al polímero como agente reductor, estabilizante y dispersante además de emplear radiación solar como la fuente energética para llevar a cabo la reducción química del precursor, de esta forma se propone un método eficaz y amigable con el ambiente produciendo soluciones compuestas CTS/NPMs con las cuales es posible producir materiales compuestos con propiedades deseables en el área biomédica en dos presentaciones: películas delgadas mediante el método de evaporación de solvente y nanofibras compuestas mediante el proceso de electrospinning.

Adicionalmente, se analiza el efecto sobre las NPMs generadas por el uso de dos fuentes energéticas diferentes a la propuesta para la reducción química: por aplicación de radiación UV mediante una lámpara y por aplicación de calor por aumento de temperatura con agitación magnética.

3.- OBJETIVOS.

3.1.- Objetivo General.

Analizar la influencia sobre el proceso de reducción química del uso de tres fuentes energéticas diferentes, para la producción de nanopartículas de plata y oro en solución polimérica de quitosano empleando al biopolímero como agente reductor, estabilizante y dispersante para la obtención y caracterización de materiales compuestos CTS/NPMs en forma de películas delgadas por el método de evaporación del solvente y nanofibras compuestas por medio de la técnica de electrospinning.

3.2.- Objetivos Específicos.

1. Sintetizar nanopartículas de plata (AgNPs) y oro (AuNPs) en una solución de quitosano, empleando al biopolímero como agente reductor, estabilizante y dispersante.
2. Emplear tres fuentes energéticas diferentes para la reducción química y evaluar los resultados obtenidos.
3. Monitorear la formación de NPMs mediante espectroscopia UV-Vis y realizar curvas de progreso para relacionarlas con la fuente energética empleada.
4. Obtener películas delgadas de quitosano/nanopartículas metálicas, por el método de evaporación del solvente para su caracterización.
5. Obtener nanofibras de CTS/NPMs a partir de las soluciones obtenidas mediante la "síntesis verde", empleando el método de electrospinning.
6. Caracterizar fisicoquímicamente las soluciones, las películas delgadas, y las nanofibras de bionanocompuestos para verificar la obtención de nanopartículas. Empleando técnicas de caracterización para dicho fin, tales como Espectroscopia UV-Vis, Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR) y Microscopia Electrónica de Barrido por Emisión de Campo (FESEM).
7. Realizar ensayos microbiológicos para determinar la posible actividad antimicrobiana de los bionanocompuestos.

4.- HIPÓTESIS.

Por medio de la “síntesis verde” con radiación solar como fuente de energía se obtendrán soluciones de CTS/AgNPs y CTS/AuNPs, las cuales cuentan con un alto potencial antimicrobiano además de ser buenas conductoras eléctricas, por lo cual es posible generar materiales compuestos en forma de películas delgadas mediante el método de evaporación del solvente y nanofibras por medio de electrospinning, las cuales poseen características únicas con potencial aplicación en el área de la biomedicina.

5.- ANTECEDENTES Y MARCO TEORICO.

5.1.- NANOCIENCIA Y NANOTECNOLOGÍA.

La Nanociencia es el estudio de los sistemas cuyo tamaño es del orden de los nanómetros (un nanómetro (nm) es 10^{-9} metros). La Nanociencia trata de comprender qué pasa a estas escalas. El prefijo “nano” en nanotecnología proviene del griego “nanos” que significa enano [8].

El premio nobel de física Richard P. Feynman, considerado el padre de la Nanociencia, abrió una nueva puerta en el ámbito científico tras proponer la fabricación de materiales de dimensiones atómicas o moleculares en el año de 1959. Fue a partir de entonces cuando comenzó el gran desarrollo de la nanotecnología [9], una de las áreas prioritarias en el desarrollo científico y tecnológico actual, junto con la biotecnología [10].

El concepto de nanotecnología fue acuñado en el año de 1974 por el profesor Norio Taniguchi, de la Universidad de Ciencia de Tokio [11]. Se trata de una tecnología emergente e interdisciplinaria que ha tenido gran auge en las décadas pasadas, incluyendo áreas como: materiales, mecánica, electrónica, óptica, medicina, industria de plásticos, energía, aeroespacial, entre otras. Lo que lleva a que la nanotecnología sea un gran avance en diversos campos de la ciencia y en la relación entre las propiedades o fenómenos físicos y químicos y las dimensiones de los Nanomateriales [10].

La investigación del comportamiento de la materia en la escala nanométrica abre una prometedora perspectiva de nuevos conocimientos [12]. La nanoescala hace referencia a dimensiones espaciales cuyo rango se comprende entre 1 y 100 nm, como se puede apreciar en la Figura 1 [9]. Cuando las dimensiones de las partículas de un sólido son del orden del nanómetro, o milésima de micra, el número de átomos que las constituyen es del orden de centenas. La mayoría de ellos se encuentran situados en la superficie de las partículas. Las propiedades físicas de estas partículas son muy distintas de las que se observan en un sólido de tamaño normal o macroscópico con la misma composición química.

Hoy en día comienzan a utilizarse de modo habitual técnicas experimentales que permiten fabricar, caracterizar y manipular partículas de este tamaño minúsculo llamadas nanopartículas (NPs) [12].

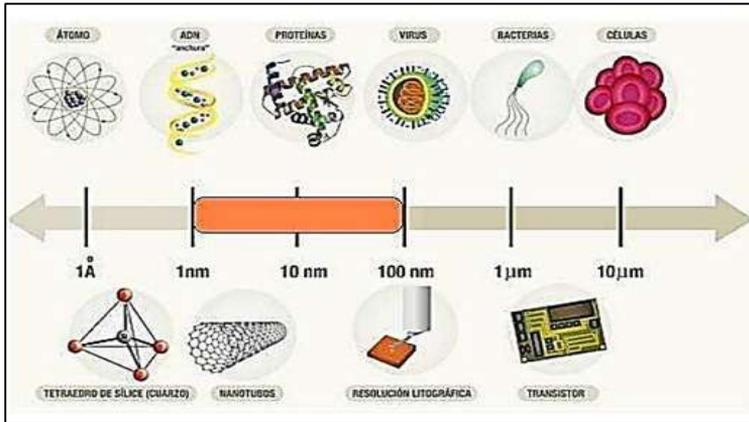


Figura 1.- Escala de tamaños de Nanomateriales [9].

5.2.- NANOMATERIALES Y NANOPARTÍCULAS.

Los Nanomateriales son aquellos que poseen propiedades morfológicas más pequeñas que un micrómetro en al menos una dimensión. De acuerdo con el número de dimensiones que se encuentren en la escala nanométrica, estos materiales se pueden clasificar en cuatro tipos (Figura 2):

- Materiales de dimensión cero. Las tres dimensiones se ubican en el régimen nanométrico, a ésta corresponden las nanopartículas.
- De una dimensión. Teniendo una longitud variable, conservan una sola dimensión en el régimen de los nanómetros, como es el caso de nanoalambres y nanotubos.
- De dos dimensiones. Con áreas de tamaño indefinido, mantienen su espesor en el orden de 1 a 100nm, como en el caso de películas delgadas.
- De tres dimensiones. Formados por unidades nanométricas [13].

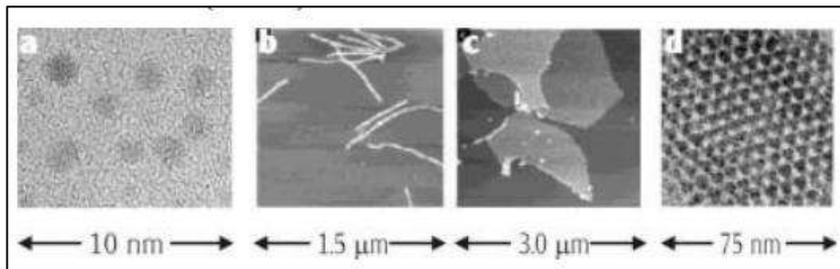


Figura 2.- Clasificación de Nanomateriales [13].

Dentro de los estudios que abarca la nanotecnología, la preparación de nanopartículas metálicas ha cobrado gran interés debido a que estas poseen propiedades físicas, ópticas, magnéticas, eléctricas, catalíticas y biomédicas únicas que difieren significativamente de aquellas presentes a mayor escala. Dichas propiedades están fuertemente relacionadas con la composición, cristalinidad y estructura de las nanopartículas.

Las nanopartículas (NPs) han existido en el planeta por siglos, algunos ejemplos son las partículas de humo y las NPs dentro de las bacterias. Respecto a sus primeros usos se puede citar el caso de la cultura egipcia, que empleaba NPs de oro como coloides medicinales para conservar la juventud y mantener buena salud; en el caso de la civilización china, además de utilizarla con fines curativos, también las empleaban como colorantes inorgánicos en porcelanas.

En 1857 Faraday realiza el primer estudio sistemático de NPs, presentando un estudio de la síntesis y propiedades de coloides de oro [14].

Así, según sus tamaños, las partículas se dividen en:

- Partículas gruesas: $>10\mu\text{m}$
- Partículas finas: $\sim 1\mu\text{m}$
- Nanopartículas: $<0.1\mu\text{m}$ [13]

Las fuentes de nanopartículas (NPs) pueden ser clasificadas como naturales o como derivadas de actividades antropogénicas intencionales o accidentales, como se muestra en la Figura 3 [15].



Figura 3.- Fuentes comunes de nanopartículas en el medio ambiente [15].

Las propiedades de las nanopartículas dependen de su forma, de su tamaño, de las características de la superficie (como el porcentaje de átomos en la superficie) y de su estructura interna. Algunas características que hace ampliamente utilizadas a las nanopartículas son:

- Estabilidad térmica.
- Larga vida.
- Resistencia al calor.
- Alta relación superficie-volumen.

5.2.1.- APLICACIONES DE LAS NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.

Entre las aplicaciones potenciales de las nanopartículas metálicas se tienen las siguientes:

- Transporte selectivo de fármacos.
- Estudio de propiedades ópticas, magnéticas, catalíticas y electrocatalíticas.
- Catalizadores (dispersados y soportados) para baterías, pilas de combustible, electrodos de difusión de gas, etc.
- Materiales cerámicos.
- Pigmentos.
- Sensores.
- Aplicaciones médicas y biológicas.
- Electrónica
- Cosmetología y estética
- Aplicaciones biomédicas [15].

5.2.2.- NANOPARTÍCULAS DE ORO Y PLATA.

Las estructuras nanometálicas han sido llamadas nanoestructuras plasmónicas por ser las que presentan un mayor potencial para aplicaciones prácticas en diferentes ámbitos, y en particular se ha prestado una especial atención a la síntesis de nanopartículas de oro (AuNPs) y de plata (AgNPs) [16]. Las AuNPs presentan baja toxicidad y propiedades peculiares increíblemente interesantes que pueden ser modificadas mediante su funcionalización con múltiples ligandos, con el propósito de obtener nanosistemas óptimos para las distintas aplicaciones terapéuticas debido a que los núcleos de oro de las nanopartículas son inertes y no tóxicos.

Se ha demostrado que las características superficiales de las AuNPs así como los agentes estabilizantes empleados durante la síntesis influyen en su toxicidad.

Las AuNPs suscitan un gran interés debido a las propiedades que poseen para diferentes aplicaciones como son:

- Propiedades químicas.- Reconocimiento molecular, reactividad y la catálisis.
- Propiedades biológicas.- Bioconjugados, ensamblajes ADN-AuNPs, sensores de glucosa.
- Propiedades físicas.- Ópticas, electroquímicas, o electrostáticas.

Por su parte, la actividad bactericida de los iones plata sobre microorganismos es muy conocida, por lo que la plata ha sido utilizada desde hace mucho tiempo como agente antimicrobiano previniendo infecciones en heridas [17, 18]. Se ha informado que comparadas con la plata iónica, las nanopartículas de plata tienen una eficacia mucho mayor como antimicrobiano. La concentración requerida de nanopartículas de plata para eficacia antimicrobiana se encuentra a niveles nanomolares, en contraste con los niveles micromolares requeridos para los iones de plata, es decir, las nanopartículas son eficaces a niveles sumamente bajos. Sin embargo, una ventaja importante de las nanopartículas de plata metálica sobre la plata iónica es que no se desactivan por compuestos contenidos en el fluido de la herida, como los haluros, como es el caso de los iones Ag^+ , por lo cual la actividad de las nanopartículas se mantendrá durante mucho más tiempo que la de una sustancia que se disocia y libera rápidamente toda su plata en forma de iones Ag^+ [19].

Las nanopartículas de plata (AgNPs), tienen especial interés debido a:

- Su efecto bactericida.- Desinfección de dispositivos médicos y tratamiento de aguas
- Su uso en la industria textil.
- Sus propiedades electroquímicas, que ofrecen la posibilidad de usarse como sensores.
- Sus propiedades ópticas.- Ofrecen la posibilidad de utilizarse como dispositivos electroluminiscentes o marcadores biológicos. La actividad catalítica de las AgNPs, también ha sido objeto de estudio [9].

5.3.- MÉTODOS DE SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOMATERIALES.

Dentro de la nanotecnología se encuentra la nanoquímica, rama dedicada a la síntesis y estudio de la reactividad de las nanopartículas. En este ámbito, destaca el interés por las nanoestructuras metálicas o de óxidos metálicos gracias a sus propiedades ópticas, eléctricas y catalíticas [9].

Los métodos de síntesis de nanopartículas suelen agruparse en dos categorías, las aproximaciones «de arriba hacia abajo» y las «de abajo hacia arriba». La primera consiste en la división de sólidos másicos en porciones más pequeñas. Este enfoque puede involucrar la molienda o el desgaste, métodos químicos, y la volatilización de un sólido seguido por la condensación de los componentes volatilizados. La segunda aproximación, «de abajo hacia arriba», consiste en la fabricación de nanopartículas a través de la condensación de átomos o entidades moleculares en una fase gaseosa o en solución. Este último enfoque es mucho más popular en la síntesis de nanopartículas [20].

Existen varios métodos que utilizan la aproximación «de arriba hacia abajo», los más representativos son:

a) **Evaporación térmica:** que consiste en el calentamiento hasta la evaporación del material que se pretende depositar. Se lleva a cabo en una cámara de vacío en la que se condensa el vapor sobre una lámina fría requiriendo en todo momento un control preciso de las condiciones de crecimiento para no producir una modificación de la morfología de la capa depositada.

b) **Depósito químico en fase vapor (CVD, por sus siglas en inglés):** que consiste en la descomposición de uno o varios compuestos volátiles, en el interior de una cámara de vacío (reactor), o cerca de la superficie de un sólido para dar lugar a la formación de un material en forma de capa delgada o de nanopartículas.

c) **Preparación de clusters gaseosos:** que utiliza un láser pulsado de alta potencia para producir vapores atómicos metálicos que son acarreados en un gas inerte y posteriormente son depositados en un óxido monocristalino u otro sustrato, bajo condiciones de ultra-alto vacío.

d) **Molienda:** de partículas de tamaño macro o micrométrico, por medio de molinos de alta eficiencia; las partículas resultantes son clasificadas por medios físicos, recuperándose las de tamaño nanométrico [20].

e) **Preparación de nanopartículas en disolución:** Son los más desarrollados. En este ámbito, la mayor parte de los métodos consisten en provocar una reducción química de las correspondientes sales metálicas mediante el empleo de un agente reductor en disolución acuosa en presencia o no de agentes estabilizantes. Las variaciones de todos los parámetros (precursor metálico, agente reductor, agente estabilizante, disolvente, etc.), ha dado lugar a un amplio abanico de métodos sintéticos para la producción de nanopartículas de metales u óxidos [9].

El método de reducción de sales metálicas, requiere de equipo simple, de un proceso tecnológico corto y es fácil de controlar, por tal motivo, este método es confiable y se ha convertido en el método de síntesis más común en este ámbito de la ciencia [14].

A partir de esta técnica, se han obtenido diversos sistemas coloidales empleando agentes reductores tales como: gases (hidrógeno o monóxido de carbono), hidracina, hidruros o sales (borohidruro de sodio, citrato de sodio, entre otros), o incluso disolventes oxidables (alcoholes) [14].

El mecanismo para la formación de NPs se basa en primer lugar en la reducción de la sal metálica al correspondiente átomo metálico covalente. Estos interactúan en la solución con átomos del metal (0) o con “sub-clústeres” que ya se han formado para dar un núcleo estable de semillas de 13 átomos metálicos. Este es el primer miembro de la llamada familia de clústeres de capa completa, y su formación es irreversible. A continuación, estos átomos actúan como centros de nucleación dando lugar a racimos atómicos o clústeres cuyo crecimiento continuará a medida que se mantenga el suministro de átomos, formándose así la partícula. Sin embargo, los coloides son sólo estables cinéticamente, por esta razón es necesario estabilizar las partículas inmediatamente, en la cual, la partícula se envuelve de moléculas estabilizadoras que se adsorben en su superficie y de esta manera se previene la aglomeración [14].

Por su parte, existen diversos métodos que utilizan la aproximación de “abajo hacia arriba” para la síntesis de nanopartículas, los métodos más representativos de esta aproximación son:

a) **Reducción fotoquímica y radioquímica:** La síntesis de nanopartículas metálicas modificando el sistema químico por medio de altas energías se asocia con la generación de reductores fuertes altamente activos como electrones, radicales y especies excitadas. La reducción fotoquímica (fotólisis) y la radiación-química (radiólisis) difieren en el nivel de energía utilizado. La síntesis fotoquímica está caracterizada por energías por debajo de 60 eV, mientras que la radiólisis utiliza energías de 103-104 eV. Los métodos de reducción fotoquímica y radioquímica tienen las ventajas sobre el método de reducción química. Debido a la ausencia de impurezas formadas cuando se usan reductores químicos, estos métodos producen nanopartículas de alta pureza. Además, la reducción fotoquímica y radioquímica permiten producir nanopartículas en condiciones de estado sólido y a bajas temperaturas.

b) **Irradiación con microondas:** En los últimos años, el proceso de calentamiento asistido por microondas se ha utilizado como una alternativa atractiva para la síntesis de materiales a escala nanométrica, dado que es un método rápido, uniforme y efectivo, que permite incrementar las cinéticas de reacción en uno o dos órdenes de magnitud.

c) **Síntesis solvotermal:** Con el nombre general de síntesis solvotermal se agrupan una serie de técnicas en las que un precursor metálico disuelto en un líquido, en un recipiente cerrado, es calentado por encima de su punto de ebullición, lo que genera una presión superior a la atmosférica (100 °C y 1 bar.).

d) **Método sol-gel:** Se parte de una solución química o sol que actúa como precursor de una red integrada ya sea de partículas discretas o de una red de polímeros. Los precursores típicos del proceso sol-gel son los alcóxidos metálicos y los cloruros metálicos, que sufren varias reacciones de hidrólisis y policondensación para formar una dispersión coloidal, que luego de una polimerización lenta forma un gel [20].

Como puede constatarse en lo aquí descrito, varios de los métodos requieren de instrumentación compleja y complicada, lo cual los hace costosos, además de la generación de residuos y productos que afectan el medio ambiente. Por tanto, muchas veces se prefieren los métodos de síntesis verde, aunque implementarlos requiera de mayor tiempo.

5.3.1.- SÍNTESIS VERDE DE NANOPARTÍCULAS.

Uno de los mayores inconvenientes de la química y de la industria química es el problema de la generación de residuos y productos que afectan el medio ambiente. Esto ha ocasionado que la química tenga una imagen negativa ante la sociedad, ya que en muchas ocasiones se destacan más los aspectos negativos que los positivos. Esto ha estimulado a los químicos a estudiar la obtención de compuestos que posean las propiedades deseadas en función de su utilidad pero que carezcan de las propiedades dañinas al medio ambiente, así como al desarrollo de procesos de producción que eliminen o minimicen la generación de emisiones contaminantes [21].

La creciente demanda de materiales nanoparticulados, en un amplio campo de aplicación (desde la biomedicina hasta la catálisis, incluyendo la electrónica y las industrias farmacéuticas y cerámica, entre otras) ha generado la necesidad de desarrollar métodos de síntesis que conduzcan a mayores producciones con alta eficiencia y con propiedades fisicoquímicas superiores a las obtenidas

convencionalmente [22]. Se han investigado varios métodos para la síntesis de nanopartículas los cuales pueden ser físicos, químicos u orgánicos. Sin embargo, debido al impacto que tiene la síntesis de estos materiales en el medio ambiente, en la actualidad se están buscando nuevas alternativas para la producción de las nanopartículas que sean más amigables con la naturaleza, también conocidas como síntesis verde, y que produzcan una menor cantidad de desechos tóxicos [23].

El concepto de química verde está íntimamente asociado con la prevención de la contaminación ambiental mediante el diseño de procesos y productos químicos que no posean propiedades dañinas al medio ambiente. La misión de la química verde la encontramos en la página web del Green Chemistry Institute (<http://www.acs.org/greenchemistry>) y viene definida como “promover el desarrollo y uso de tecnologías químicas innovadoras que reduzcan o eliminen el uso o generación de sustancias dañinas en el diseño, manufactura y uso de productos químicos”. Los objetivos de la química verde han sido definidos de manera más específica como “el establecimiento de los principios para la síntesis y aplicación de productos y procesos químicos que reduzcan o eliminen completamente el uso y producción de materiales que sean dañinos al medio ambiente” [21].

Ahora bien no hay que confundir la química ambiental con la química verde. La diferencia es que la primera tiene como objetivo el saneamiento y remediación de los efectos en el ambiente de los procesos contaminantes, mientras que la química verde intenta prevenir la contaminación en su origen [24].

Dado el alto potencial de aplicación de los nanomateriales, se debe considerar un diseño de los procesos de producción con un impacto ambiental mínimo. Las condiciones de reacción se pueden ajustar de tal manera que sea posible llegar a un producto de manera eficiente y benigna para el medio ambiente. Las variaciones en los medios de reacción pueden implicar modificaciones bastante simples, como la sustitución del solvente, la reducción de la temperatura y/o presión, o el uso de técnicas avanzadas que proporcionen un entorno propicio para la producción de productos de alta calidad. Los últimos avances hacia la síntesis verde o de bajo impacto ambiental de nanopartículas, incluyen el uso de química ultrasónica [24] y la síntesis biológica [25].

a) **Síntesis ultrasónica:** La sonoquímica se basa fundamentalmente en los efectos químicos producidos por la propagación de ultrasonido en el medio de reacción, proporcionando una activación o desarrollo de las reacciones químicas a través de la energía acústica [24].

b) **Síntesis biológica:** Se emplean sistemas biológicos como levaduras, hongos (*Fusarium oxysporum*), bacterias (Cepas bacterianas, tanto gram-positivos y gram negativos, por ejemplo, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus pentosaceus* y *Enterococcus faecium*) y extractos de plantas (como la espirulina) [26]. Sin embargo estas técnicas de síntesis resultan poco viables debido a que necesitan metodologías costosas para el mantenimiento de los cultivos microbianos y vegetales, así como periodos largos para la síntesis de NPs.

Algunos métodos de síntesis de nanopartículas se han modificado con la finalidad de adentrarlos en la química verde. Como muestra de ello, tenemos las metodologías expuestas en el presente trabajo de investigación (reducción química mediante radiación UV-solar, reducción química mediante aumento de la temperatura y agitación magnética y reducción química mediante radiación UV-lámpara). En las cuales se está evitando el uso de un agente reductor, gracias a que el quitosano hace la función de agente reductor, estabilizante y dispersante al mismo tiempo. Hablando propiamente de la reducción con radiación solar, la mayor ventaja es que no es necesario tratar térmicamente las muestras ya que luego de la preparación, el metal se encuentra reducido por la irradiación UV-solar, evitando así un gasto energético por el uso de energía artificial.

El mecanismo de crecimiento para la formación de NPs (Figura 4) consta de varias etapas, este mecanismo fue propuesto por Turkevich quien describió que la formación gradual de nanoclústeres se basa en la nucleación, crecimiento y aglomeración [14].

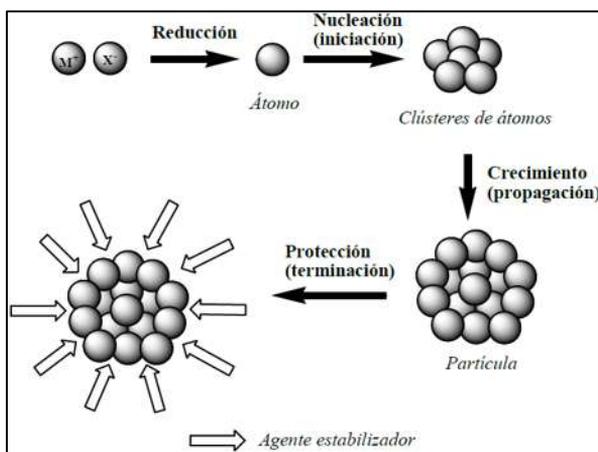


Figura 4.- Mecanismo de crecimiento para la formación de NPs [14].

Un aspecto fundamental en la síntesis de nanopartículas es el poder mantenerlas estables en equilibrio, de tal manera que pueda mantenerse su tamaño y su forma en función del tiempo [20]. Dos partículas separadas a una pequeña distancia pueden ser atraídas entre sí por fuerzas de tipo Van der Waals, en ausencia de fuerzas repulsivas que las contrarresten, lo que conduciría a la inestabilidad coloidal. En este sentido, de manera general se pueden considerar como principales fuerzas que actúan en los sistemas coloidales: fuerzas atractivas de Van der Waals y fuerzas repulsivas electrostáticas y estéricas. Con el objetivo de equilibrar estas fuerzas se emplean habitualmente agentes protectores o estabilizantes en sistemas de NPs, los cuales presentan grupos funcionales tales como: aminas, alcoholes, fosfinas, tioles o ácidos carboxílicos, que interactúan con la superficie del nanomaterial favoreciendo su estabilización y ejerciendo un control sobre el tamaño y monodispersidad de las NPs mediante la inhibición de procesos de agregación interarticular [11]. Además de ello, la estabilidad que las NPs presentan en el medio es un aspecto crucial en la química coloidal que determina su grado de dispersidad ya que inhibe procesos de agregación o colisión que desestabilicen el sistema.

Existen cuatro tipos de procedimientos para la estabilización de NPs que son:

1. **Estabilización electrostática:** consiste en la formación de una doble capa de aniones y cationes que interactúan con la superficie de las NPs metálicas. Como resultado de la repulsión entre dichas capas y si el potencial eléctrico asociado a la doble capa es suficientemente alto, se evita la aglomeración. Como ejemplo tenemos la formación de AuNPs, preparadas por reducción en medio acuoso a partir de la reducción de HAuCl_4 con citrato de sodio [27].
2. **Estabilización estérica:** es la estabilización de NPs por adsorción de moléculas sobre su superficie, tales como polímeros, surfactantes, dendrímeros o ligandos, que forman una capa de protección [28].
3. **Estabilización electroestérica:** combinación de efectos electrostáticos y estéricos en presencia de agentes surfactantes. Como ejemplo tenemos la estabilización de NPs Pd utilizando cloruro de tetra-n-octilamonio [29].
4. **Estabilización por ligandos o disolventes:** se produce por la coordinación de las NPs con ligandos orgánicos para formar una capa protectora, por ejemplo, donadores de P, N, S como las fosfinas, aminas y tioesteres, respectivamente, y disolventes como THF, THF/MeOH, o carbonato de propileno [14].

En el caso del método de síntesis propuesto en este trabajo, un aspecto fundamental como se ha venido puntualizando es que el quitosano también

juega el papel de agente estabilizante, ya que proporciona una envoltura biocompatible, catiónica e hidrofílica [30]. La naturaleza policatiónica del quitosano en medio ácido favorece una fuerte interacción electrostática con polianiones, como tripolifosfato (TPP), que permite la formación de nanopartículas de quitosano [31]. Lo que es un punto adicional a favor en cuanto a la minimización al uso de agentes químicos contribuyendo nuevamente al desarrollo de la química verde.

5.4.- POLÍMEROS

La palabra *polímero* se deriva del griego *poli* y *meros*, que significan mucho y partes respectivamente [31]. Los polímeros son macromoléculas formadas por la unión covalente de pequeñas unidades moleculares conocidas como monómeros. Estas macromoléculas pueden estar formadas por un único tipo de monómero, los cuales se denominan homopolímeros, o por varios tipos de monómeros, en cuyo caso se conocen como copolímeros. El número de moléculas de monómero que componen esta cadena es su grado de polimerización. Tanto los homopolímeros como los copolímeros pueden ser lineales, ramificados o reticulados, como se puede observar en la Figura 5.

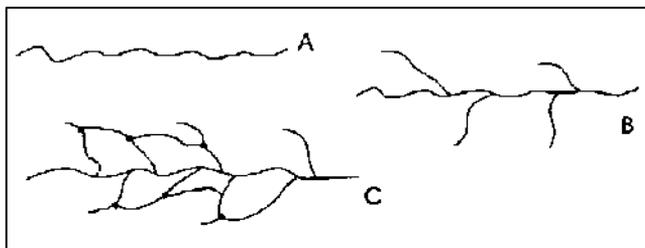


Figura 5.- Tipos de polímeros. A: lineal, B: ramificado, C: reticulado [33].

Los polímeros poseen, en general, la ventaja de permitir manipulaciones químicas y físicas para adquirir diversas formas y propiedades [33].

Existen dos grandes grupos de polímeros:

Polímeros naturales: también conocidos como **biopolímeros**, se forman durante los ciclos de crecimiento y vida de los organismos [33]. Como el colágeno, la albúmina o el quitosano [34], el ácido poligalacturónico y la quitina [35]. Los homopolímeros naturales más conocidos son el caucho, el almidón y la celulosa. Entre los copolímeros, se destacan las proteínas y, entre ellas, la lana y la seda [33]. Una propiedad atractiva de los polímeros naturales es que poseen un gran

número de grupos funcionales, lo que les permite extraer fácilmente a metales por adsorción química o física [35].

Polímeros sintéticos: Estos poseen estructuras esenciales más fuertes y permiten un gran número de modificaciones, por lo que se puede experimentar con ellas hasta encontrar el producto con las características deseadas. Como ejemplos de homopolímeros sintéticos se pueden destacar el nylon, polietileno, teflón, cloruro de polivinilo (PVC) y, entre los copolímeros, el formado por el ácido poli-glicólico y el ácido láctico [33].

El uso de polímeros como ligandos para la síntesis y estabilización de NPs representa una interesante alternativa frente a otro tipo de moléculas sencillas empleadas tradicionalmente, como surfactantes, alcanotiolatos y demás moléculas de cadena corta conteniendo grupos funcionales afines a la superficie de la partícula nanométrica [11]. Una estrategia conveniente para crear una dispersión estable en una matriz polimérica consiste en la funcionalización de la superficie de las nanopartículas con cadenas del mismo polímero que los de la matriz utilizada [36].

Actualmente la síntesis de polímeros reforzados con nanopartículas metálicas está abriendo nuevos caminos para obtener materiales de ingeniería que exhiban mejores propiedades eléctricas, ópticas, mecánicas, antifúngicas y antibacteriales. Entre los polímeros que se han reforzado con este fin, podemos encontrar los siguientes:

- Una serie de poliuretanos tipo poliéster (PU) [37].
- Poli (óxido de polietileno (PEO) [38].
- Poliestireno de alto impacto [39].
- Alcohol polivinílico (PVA) [40].
- Quitosano (CTS) [41].

5.5.- QUITOSANO.

El estudio de este polímero a lo largo de todos estos años ha generado su empleo en múltiples aplicaciones [42]. El quitosano, nombre dado a la quitina desacetilada, es un polisacárido, natural, biodegradable y no tóxico que se obtiene principalmente de la parte externa de crustáceos tales como cangrejos y camarones. Comercialmente el uso del quitosano ha abarcado diferentes industrias entre las que se incluyen: la médica, la farmacéutica, la biotecnológica, la cosmetológica, la alimentaria y la agrícola [43].

La quitina está formada por unidades de 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucosa unidas por enlaces β -(1 \rightarrow 4). La obtención de quitosano a partir de quitina se realiza por desacetilación de la misma, dejando libre el grupo amino del carbono 2, si bien este proceso nunca llega al 100%, como se puede observar en la Figura 6. Es por ello que el quitosano es un copolímero de 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucosa y 2-amino-2-deoxy- β -D-glucosa [34].

Oficialmente el quitosano es nombrado por la IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) como: poli(2-amino-2-desoxi--D-glucopiranosas). La masa molar de este polímero natural puede variar en el orden de 10.000 hasta el orden de los millones de g/mol [35].

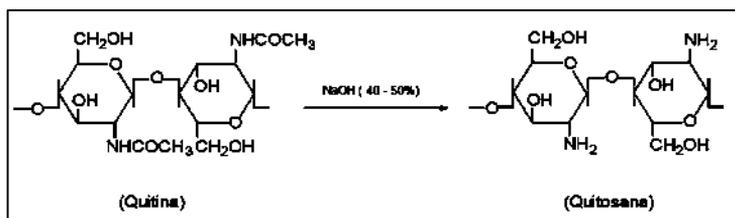


Figura 6.- Representación esquemática de la reacción de desacetilación de la quitina para obtener quitosano [35].

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

5.5.1.- APLICACIONES DEL QUITOSANO.

Dado el gran número de trabajos que existen sobre este versátil material es conveniente realizar una clasificación por área de acuerdo sus aplicaciones; algunas de ellas se mencionan a continuación:

Química analítica: aplicaciones cromatográficas, intercambiadores de iones, absorción de iones de metales pesados y absorción de ácidos, fabricación de electrodos específicos para metales, etc.

Biomedicina: membrana de hemodiálisis, suturas biodegradables, sustituyentes artificiales de la piel, agente cicatrizante en quemaduras, sistemas

liberadores de fármacos, liberación de insulina, transporte de agentes anticancerígenos, tratamiento de tumores (leucemia), control del virus del SIDA, etc.

Agricultura y ganadería: recubrimiento de semillas para su conservación durante el almacenamiento, sistemas liberadores de fertilizantes, aditivo para alimento de animales, en formulación de pesticidas, etc.

Cosméticos: Espumas de afeitar, cremas para la piel y el cuerpo.

Dietéticos: Adelgazantes (existe una amplia variedad de productos comerciales que ofrecen el polímero como atrapador de grasas en el estómago,

Industria: del papel, textil, alimentaria (soporte para inmovilización de enzimas en la producción de maltosa, espesante en alimentos, agente de oxidación controlada, agente preservante).

Tratamiento de agua: agente floculante, agente coagulante, tratamientos de flotación para la remoción de aceite de pescado en agua, agentes filtrantes para piscinas y spas, remoción de metales, remoción de surfactantes, etc. [44].

Desde el punto de vista fisicoquímico, el quitosano es un biopolímero hidrosoluble que puede formar películas, hidrogeles, andamios porosos, fibras, micro y nanopartículas en condiciones y medio ácido suaves [45]. También cuenta con propiedades de biodegradabilidad, biocompatibilidad, capacidad filmogénica, actividad antimicrobiana, actividad antifúngica, actividad hipocolesterolemia, actividad antioxidante, mucoadhesión, hemostático y promotor de absorción [42].

5.5.2.- COMPUESTOS QUITOSANO-AuNPs.

La combinación de nanopartículas de oro (AuNPs) y polímeros abre nuevas rutas para el desarrollo de materiales avanzados con aplicaciones potenciales en optoelectrónica, sensores, catálisis, almacenamiento magnético y varios otros campos. Las aplicaciones tecnológicas de estos compuestos dependen de la habilidad de controlar la agregación y la distribución espacial de las AuNPs en la matriz. Una estrategia conveniente para crear una dispersión estable en la matriz polimérica consiste en la funcionalización de la superficie de las AuNPs con cadenas del mismo polímero que los de la matriz utilizada [46].

Al lado de la nanopartícula de oro ópticamente sintonizable para la conversión eficiente de la luz al calor, recubrimientos a base de quitosano

proporcionan cargas superficiales sintonizables para aplicaciones en una variedad de entornos de pH fisiológicos y también permite continuar la modificación con moléculas diana o moléculas de fármacos por reacción química o la interacción electrostática [47].

Hortigüela-Gallo y colaboradores, en el 2012 produjeron andamios de quitosano y nanopartículas de oro. La preparación de compósitos 3D porosos de quitosano y nanopartículas de Au se llevó a cabo mediante el proceso criogénico ISISA. La reducción química, para la obtención de AuNPs, se llevó a cabo por tratamiento térmico a 40 y 80°C durante 5 y 3 horas respectivamente, obteniendo NPs desde 5 hasta 20 nm de diámetro [48].

Luna-Bárceñas y colaboradores probaron el nanocompósito quitosano-nanopartículas de oro como material base en la fabricación de un biosensor de metales (Cadmio, Zinc y Cobre), por los resultados obtenidos mostraron que fue capaz de detectar concentraciones por debajo de los límites permisibles por las Normas Oficiales Mexicanas [49].

Zhang y colaboradores en el año 2012 sintetizaron nanocompuestos quitosano/oro mediante la reducción de AuHCl₄ con Na₂S₂O₃, estos compuestos fueron evaluados como agentes terapéuticos para la terapia fototérmica contra el cáncer [50].

En 2014 Requejo-Roque, obtuvo AuNPs esféricas monodispersas por medio de un tratamiento mecánico, utilizando al quitosano como agente reductor y estabilizante, la superficie de estas nanopartículas tiene carga positiva y se obtuvieron en tamaños entre 10 y 15 nm [51].

Se presentó un método para preparar nanopartículas de oro por plasma atmosférico, utilizando CTS como un precursor de agente estabilizante: Una disolución de quitosano se redujo en un plasma atmosférico en una cámara de temperatura, el tratamiento es eficaz para reducir el precursor de oro y el proceso sólo toma unos minutos [52].

5.5.3.- COMPUESTOS QUITOSANO-AgNPs.

La incorporación de nanopartículas de plata (AgNPs) en matrices poliméricas para proveer a éstas de propiedades biosidas y de conductividad electrónica, representa un gran reto tanto para el área académica como para el sector industrial. Debido a la poca interacción que presentan las AgNPs con los diferentes polímeros surge la necesidad de su modificación superficial ya sea

mediante modificaciones con agentes orgánicos o mediante carga electrónica superficial [39].

La combinación de un polímero natural como el quitosano y las NPMs de plata resulta ampliamente atractiva debido a la capacidad antibacterial que poseen ambos componentes de forma individual y de la posibilidad de generar un compuesto biodegradable y biocompatible, comúnmente denominado bionanocompuesto. La incorporación de nanopartículas de Ag al quitosano permite aumentar su conductividad, mejorar sus propiedades mecánicas y a la vez potenciar su efecto antimicrobiano, con lo que es posible ampliar su espectro de aplicación, específicamente en aquellas aplicaciones donde la higiene es un factor clave, tal es el caso del campo de la biomedicina. Otras aplicaciones muy atractivas actualmente incluyen biosensores, celdas combustibles electrolíticas, partes electrónicas, etc. [53].

En el 2010, Modrzejewska y colaboradores sintetizaron nanopartículas de plata en una solución de quitosano tomando ventaja de la habilidad del quitosano de formar acetatos en presencia de iones metálicos. Obtuvieron nanopartículas de tamaños entre 50 nm a 2 μ m [54].

En el 2011, Potara y colaboradores sintetizaron nanopartículas de plata sobre quitosano. Obtuvieron nanopartículas entre 43 y 55 nm y demostraron que la combinación de quitosano y nanopartículas de plata es más eficiente contra la bacteria *Staphylococcus aureus* que cada uno de los componentes de forma individual [55].

Saifunddin y colaboradores prepararon un compuesto integrado por nanopartículas de plata impregnadas sobre una matriz de quitosano usando radiación de microondas. Lograron remover un 94% del pesticida Atrazina en soluciones acuosas con una concentración de 10 mg/L con este material [56].

En el 2012, Rao y colaboradores sintetizaron un nanocompuesto integrado de nanopartículas de plata depositadas sobre una matriz de quitosano y poli etilenglicol. Ellos evaluaron la bacteria *E. Coli* y encontraron diámetros de inhibición de 8 a 11 mm, mucho mayores que los del quitosano puro [57].

Pinto y colaboradores sintetizaron un nanocompuesto integrado por películas de quitosano con nanopartículas de plata. Obtuvieron tamaños de partícula de 16 nm. Evaluaron las propiedades antimicrobianas de este material frente a *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, utilizando concentraciones de 0.47%, 1.1%, 2.58% y 3.94% de nanopartículas de

plata. Encontraron diámetros de inhibición de 0, 1.5, 1.7 y 2 mm para las concentraciones evaluadas respectivamente para todas las bacterias [58].

5.6 NANOFIBRAS.

Las propiedades que presentan las estructuras nanométricas en forma de fibras, tubos, cintas, anillos, varillas y cables abren un panorama fascinante. A todas ellas nos referiremos con el nombre genérico de nanofibras (fibras con diámetros inferiores a 500 nanómetros, producidas por ciertas técnicas que permiten la obtención de fibras ultrafinas). Estas tienen la capacidad de formar materiales altamente porosos que han mostrado un enorme potencial para mejorar significativamente las tecnologías actuales, y encontrar nuevas y sorprendentes aplicaciones [59].

Las nanofibras tienen una variedad de aplicaciones, entre ellas: ingeniería de tejidos, textiles, elementos para cubrir heridas, medios de filtración, membranas especiales y diversas aplicaciones médicas tales como reemplazo de huesos, implantes dentales, sistemas de liberación de fármacos, injertos vasculares, vasos sanguíneos artificiales entre otros [60].

Particularmente el quitosano ha sido ampliamente estudiado en este sentido, ya que por sus características físicas y químicas descritas anteriormente (que lo hacen ampliamente atractivo en el área biomédica), su empleo en forma de nanofibras es altamente deseable, y la generación de un material compuesto CTS/NPMs en forma de nanofibras con potencial actividad antimicrobiana da pauta a una amplia gama de aplicaciones.

Dentro de los métodos de síntesis de nanofibras, se encuentran:

1.- **Deposición química en fase de vapor** (CVD del inglés *Chemical Vapor Deposition*): A partir de una fuente en fase de vapor se forma una fase sólida debido al craqueo, descomposición y posterior recondensación, o simplemente reacción, de dicha fase de vapor.

2.- **Método de ablación láser**: En esta técnica, también llamada vaporización láser, un blanco consistente de una mezcla de grafito con una pequeña cantidad de partículas de metales de transición (catalizadores) es colocado en el extremo de un tubo de cuarzo encerrado en un horno bajo una atmósfera inerte, el blanco es expuesto a un haz de láser argón, el haz vaporiza el grafito y produce nucleación en la onda de choque justo en frente del blanco. Un

flujo de argón a través del reactor calentado por el horno lleva el vapor, las nanofibras, las nanopartículas de catalizador y el carbón amorfo.

3.- **Método del Catalizador Flotante:** La idea de este método es producir de forma continua, en un único proceso, los nanofilamentos catalíticos, introduciendo en el reactor sus reactivos.

4.- **Síntesis por Flama:** En este método se sintetizan nanofibras de carbono utilizando una flama producida por una mezcla aire-etileno sobre un sustrato de arco produciendo microfibras y nanofibras de varios diámetros empleando diversos catalizadores metálicos. La técnica de la flama también requiere de condiciones básicas de operación tales como: alta energía, adición de hidrocarburos y altas temperaturas para la síntesis. Es un método potencial para producir a gran escala nanofibras [61].

5.- **Electrospinning:** La técnica consiste en hacer girar soluciones de polímero a través de altos campos eléctricos, se basa en aplicar fuerzas eléctricas suficientes que superen las fuerzas de la tensión superficial en la solución de polímero cargado, de esta forma a un voltaje determinado, finos chorros de solución son expulsados desde el capilar hasta el plato colector. Posteriormente el chorro se mueve en la dirección del campo eléctrico, alargándose de acuerdo a las fuerzas externas e internas y experimentando inestabilidad en algunas ocasiones. El disolvente se evapora y los segmentos de fibras son depositados al azar en un sustrato.

El típico montaje para la ejecución de la técnica de electrospinning se muestra en la Figura 7. Consta de un capilar a través del cual se expulsa la solución polimérica (aguja, cono, etc); una fuente de alto voltaje que posee dos electrodos los cuales deben conectarse uno a la salida de la solución (aguja) y otro directamente al plato colector (lamina de metal conductor, mandril rotativo, etc.) donde se depositarán las fibras posterior a la evaporación del disolvente. Para impulsar la solución a través del capilar puede utilizarse una bomba de infusión; la salida de la solución puede estar determinada por la fuerza de gravedad ligada a la viscosidad de la solución.

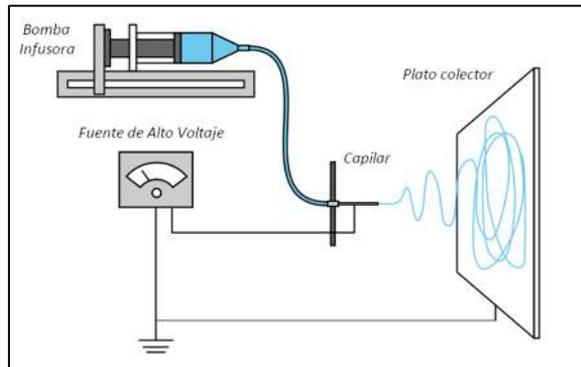


Figura 7.- Montaje del sistema de electrospinning [60].

En ocasiones para incrementar las propiedades dieléctricas de la solución, se adicionan disolventes con constantes dieléctricas altas, esto favorece la formación de fibras con menos estructuras defectuosas (las estructuras defectuosas conocidas como beads o perlas). Una vez que se tiene la solución en la jeringa o cono se inicia la aplicación del alto voltaje, cuando este potencial eléctrico se aplica, las cargas se acumulan promoviendo la formación de una gota en la punta del capilar, a medida que la intensidad del campo eléctrico se incrementa, la gota se alarga para crear una forma cónica conocida como cono de *Taylor*. La fuerza del campo eléctrico supera las fuerzas de cohesión de la solución, en la mayoría de los casos dominada por la tensión superficial, es así como un chorro de solución de polímero inicia un viaje desde la punta del capilar hasta el plato colector; en su viaje, el chorro de solución polimérica es alargado debido a las interacciones electrostáticas entre las cargas cercanas a segmentos del mismo chorro, mientras tanto, el disolvente se evapora, finalmente, las fibras se solidifican a su llegada al plato colector. Luego de ser extraídas del plato colector algunos autores sugieren mantener las fibras en vacío para eliminar el disolvente remanente [60].

5.6.1.- FACTORES QUE INFLUYEN EN EL PROCESO DE ELECTROSPINNING.

El control de proceso de electrospinning se limita a la identificación de las condiciones de funcionamiento que produce fibras con propiedades aceptables. Sin embargo, dentro de un entorno de laboratorio, incluso con estas condiciones identificadas, todavía existen variaciones significativas en la calidad de los materiales producidos. Estas variaciones son el resultado de una comprensión incompleta de todas las variables de proceso. Hay muchos factores que influyen en la morfología de las fibras o construcciones fibrosas y pueden dividirse en parámetros de la solución y parámetros de proceso [7].

5.6.1.1.- PARÁMETROS DE LA SOLUCIÓN.

Dependiendo de las propiedades reológicas de la solución pueden producirse diferentes estructuras: gotas, fibras con gotas y fibras. Estas propiedades están determinadas por la concentración y las características moleculares del polímero (peso molecular, polidispersidad, grado de ramificación) y del solvente (buen o mal solvente). El conjunto de estas características juega un papel vital en la iniciación y estabilización de una estructura fibrosa [62].

Concentración: En el proceso de electrospinning, para la formación y producción de fibras, es necesario contar con una concentración mínima de la solución del polímero. Diversos investigadores han intentado encontrar una relación entre la concentración de la solución y el diámetro de la fibra, obteniendo una relación conocida como ley de potencia, la cual conduce a la siguiente conclusión "al aumentar la concentración de la solución, aumenta el diámetro de la fibra. La tensión superficial y viscosidad de las soluciones también juegan un papel importante en la determinación del rango de las concentraciones de fibras continuas, que pueden ser obtenidas en electrospinning.

Viscosidad: Durante el proceso de electrospinning, la viscosidad de la solución juega un papel importante en la determinación del tamaño y la morfología de la fibra. Se ha observado que con una viscosidad muy baja no hay una formación continua de la fibra, y que con una viscosidad muy alta hay dificultad en la eyección del jet de la solución del polímero, por lo tanto una viscosidad óptima es un requisito primordial para el proceso de electrospinning [63].

Conductividad: Los iones cargados en la solución polimérica influyen grandemente a la formación de fibras. Cuando las cargas llevadas por el chorro se incrementan, el campo eléctrico genera mayor fuerza de elongación sobre chorro de polímero cargado dando como resultado fibras con diámetros más finos y una notable disminución de los defectos [64]. La conductividad de la solución está determinada principalmente por el tipo de polímero, disolvente utilizado y la disponibilidad de sales ionizables [63].

Disolvente: Básicamente el disolvente cumple dos roles importantes dentro del proceso de electrospinning: en primer lugar disolver las moléculas de polímero para formar el chorro con carga eléctrica y en segundo lugar llevar las moléculas de polímero disueltas hasta el colector, es por ello que las propiedades del disolvente cumplen un rol fundamental dentro del proceso [60].

5.6.1.2.- PARÁMETROS DEL PROCESO.

El control sobre estas variables determina la estabilidad del sistema y la calidad del material fabricado [65].

Voltaje: El voltaje es un parámetro respecto al cual el diámetro de las fibras es directamente proporcional, debido a que generalmente hay más disolución en el haz [66]. Hay autores que afirman que un incremento en la aplicación del voltaje decrece el diámetro de las nanofibras y aumenta la probabilidad de obtener fibras con defectos (*beads*), lo cierto es que en la mayoría de los casos un voltaje alto permite un mayor estiramiento de la solución debido a la presencia de mayor fuerza de coulomb en el chorro y un fuerte campo eléctrico, todos estos factores promueven una reducción en el diámetro de las fibras. La influencia del voltaje depende además de las propiedades viscoelásticas del material base, por ello es importante analizar el comportamiento para cada polímero con su respectivo disolvente [60].

Flujo de salida: Un flujo de salida menor podría ser benéfico ya que el disolvente tendría más tiempo para evaporarse evitando la formación de defectos en las fibras. Cuando el flujo de salida se incrementa ocurre un incremento en el diámetro de las fibras y posiblemente en el tamaño de los defectos. Un mínimo valor de volumen de solución a la salida del capilar debe mantenerse para obtener un cono de *Taylor* estable, el flujo de salida determina la cantidad de solución disponible para el proceso de electrospinning [60].

Distancia del inyector al colector: La distancia de separación entre la punta del inyector y el colector influencia el tiempo de fabricación de las fibras, la tasa de evaporación e intervalo de inestabilidad, los cuales afectan las características de las fibras. Una solución polimérica acuosa necesita ciertos intervalos de distancia para evaporarse en contraposición de un solvente altamente volátil [64].

Tipos de colectores: Un aspecto importante del proceso de electrospinning es el tipo de colector utilizado. En este proceso, un colector sirve como un conductor substrato, donde las nanofibras se recogen. Generalmente, una lámina de aluminio se utiliza como un colector, pero debido a la dificultad en la transferencia de fibras recogidas y con la necesidad de fibras alineadas para diversas aplicaciones; se han utilizado otros colectores, tales como: papel conductor, tela conductora, malla de alambre, pasadores, barras paralelas o cuadrículas, varillas de rotación, ruedas giratorias, en electrospinning la

alineación de la fibra se determina por el tipo de la meta, el colector y su velocidad de rotación [63].

5.6.2 NANOFIBRAS DE QUITOSANO.

El quitosano encuentra muchas aplicaciones debido a sus propiedades únicas, tales como el rendimiento antibacteriano bajo ciertas condiciones específicas. Sin embargo, la formación de fibras de quitosano por electrospinning es bastante difícil debido a su solubilidad limitada y la naturaleza policatiónica en la solución. En este contexto, el electrohilado de soluciones de quitosano para la generación de nanofibras de calidad se ha logrado sólo con el uso de algunos disolventes específicos, que se basan generalmente en fuertes ácidos orgánicos, con puntos de ebullición bajos y constantes dieléctricas bajas.

El carácter catiónico único del quitosano, proporcionado por medio de su fracción de pares de iones ($-\text{COO}^-$ $-\text{NH}_3^+$) llamados "grupos activos", ha sido ampliamente discutido en la literatura. Investigaciones recientes también han demostrado que el rendimiento biosida de sistemas electrohilados basados en quitosano se puede aumentar mediante la retención menor de un ácido fuerte utilizado como disolvente en la estructura nano-fibrilar, lo que facilita el giro de este difícil biopolímero. Sin embargo, el atrapamiento del solvente en el interior de las nanofibras poliméricas está impedido de manera eficiente debido al proceso de secado rápido que se produce físicamente durante el electrospinning. Como resultado, los disolventes normalmente permanecen en la superficies de las nanofibras en niveles muy bajos, haciéndolos atractivos dependiendo de la aplicación y las preocupaciones de legislación.

La mezcla de ácido trifluoroacético (TFA)/diclorometano (DCM) 7:3 (peso/peso), es bien conocida como excelente disolvente del quitosano para electrospinning [67]. Para obtener nanofibras de quitosano puro de una buena calidad, el ácido acético ha sido utilizado con éxito en altas concentraciones (por encima del 80%). Sin embargo, el uso de estos disolventes no se recomienda debido a su toxicidad. Por lo tanto hay una necesidad de encontrar disolventes alternativos o modificar las condiciones de proceso para asegurar la eliminación completa del disolvente [68].

5.6.3- NANOFIBRAS DE COMPUESTOS POLÍMERO/NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.

Las nanopartículas sirven para reforzar a la matriz, así como para transformar el comportamiento eléctrico, óptico, térmico y catalítico del material base. Una de las aplicaciones más importantes de las nanopartículas de metales nobles es su aplicación para la catálisis heterogénea y para varias reacciones de oxidación y reducción [69]. El ordenamiento controlado de nanopartículas metálicas se puede lograr a través de nanofibras de polímero; el método más económico y práctico de conseguirlo es por medio del electrospinning de soluciones de nanopartículas/polímero.

Las nanofibras compuestas resultantes pueden mostrar las distintivas propiedades ópticas, eléctricas, catalíticas o anti-microbiales de las nanopartículas metálicas que contienen o que crecieron dentro de ellas. Las nanopartículas, particularmente las metálicas, representan atractivos “ladrillos” de construcción y son la propuesta actual para ser utilizadas como materiales avanzados, con nuevas propiedades: eléctricas, ópticas, mecánicas, térmicas y catalíticas. Comparados con los materiales en bulto, estas características únicas, surgen de los efectos del confinamiento cuántico y de sus muy grandes áreas superficiales específicas [70, 71]. La técnica de electrospinning es actualmente la técnica más prometedora para la producción continua de nanofibras debido a que es relativamente sencilla y rápida. Generalmente, la producción de nanofibras a través de estas técnicas parte de la inyección de la solución polimérica la cual ya debe contener las NPs metálicas. Esto implica que las NPs hayan sido previamente sintetizadas en la solución polimérica o incorporarlas en la misma previo a la obtención de las nanofibras, lo que requiere de un mayor tiempo de síntesis [72].

Abdelgawad y colaboradores, proponen en el 2014, una ruta verde para producir nanofibras antibacterianas cargadas con nanopartículas de plata de 25 nm de diámetro, envueltas en quitosano después de la reducción con la glucosa. Las nanofibras se obtuvieron a partir de dispersiones coloidales de base quitosano-Ag-PVA. Las nanofibras (de 150 nm de diámetro promedio y estrecha distribución de tamaño) se obtuvieron mediante electrospinning [73]. También mediante la técnica de electrospinning, Lee y colaboradores, en el 2014 diseñaron un nuevo apósito para heridas. Se obtuvieron nanofibras de quitosano (CTS), con diversas proporciones de las nanopartículas de plata (AgNPs), eficaces en el tratamiento antibacteriano tópico en el cuidado de heridas. Las AgNPs fueron generadas directamente en la solución de CTS mediante el uso de un método de reducción química [74].

6.- MATERIALES Y METODOLOGÍA

Los reactivos y equipos utilizados en el desarrollo de este trabajo de tesis se describen en la Tabla 1.

Tabla 1.- Reactivos y equipos utilizados

REACTIVOS	EQUIPOS
Quitosano de Sigma-Aldrich®	Parrilla con agitación magnética marca Thermo SCIENTIFIC (Cimarec)
AgNO ₃ de Sigma-Aldrich®	Lámpara de luz UV marca MINERALIGHT® LAMP MODEL UVGL-25, MULTIBAND UV-254/366
HAuCl ₄ ·3H ₂ O de Sigma-Aldrich®	Espectrofotómetro UV-Vis GENESYS 10S Thermo SCIENTIFIC
Ácido acético glacial de J.T.Baker	
Agua destilada de J.T.Baker	Electrospinning (NaBond Technologies Co., China)
Ácido trifluoroacético de Sigma-Aldrich®	Espectrofotómetro Thermo Scientific modelo Nicolet iS10
Diclorometano de J.T.Baker	

6.1.- SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS EN SOLUCIÓN DE CTS.

6.1.1.- PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES.

1. Solución de quitosano (CTS): El quitosano, se disolvió en una solución de ácido acético glacial (CH₃COOH) 1% en peso con agitación mecánica a temperatura ambiente, por un periodo aproximado de 24 h. Se obtuvieron soluciones a diferentes concentraciones: 0.5%, 1%, 1.5% y 2% en peso de CTS.
2. Solución de nitrato de plata (AgNO₃): El AgNO₃ se disolvió en agua destilada, a temperatura ambiente y con agitación mecánica, para preparar soluciones a diferentes concentraciones: 0.7%, 0.5%, 0.3% y 0.1%, respecto al peso de la sal.
3. Solución de ácido cloroáurico (HAuCl₄·3H₂O): El H₂AuCl₄·3H₂O se disolvió en agua destilada, a temperatura ambiente y con agitación mecánica, para preparar soluciones al 1.5%, 1%, 0.7% y 0.45%, respecto al peso de la sal.
4. Soluciones de CTS con precursor químico: En la Tabla 2, se muestran todas las combinaciones que se realizaron para la obtención de AuNPs y AgNPs, utilizando radiación solar como fuente de energía. Se utilizaron cuatro concentraciones de CTS (0.5, 1, 1.5 y 2% en peso), variando la

concentración de la sal (0.1, 0.3, 0.5, 0.7%Ag con respecto al peso del CTS) y (0.45, 0.7, 1 y 1.5%Au respecto al peso del CTS).

5. Soluciones de ácido trifluoroacético: diclorometano/ película de CTS con precursor químico: Para poder electrohilar las soluciones de CTS con precursor químico, fue necesario formar películas mediante el método de evaporación del solvente (en este caso solución acuosa de CH₃COOH), para posteriormente redissolverlas en una solución de ácido trifluoroacético (CF₃COOH): diclorometano (CH₂Cl₂) en relación 70:30 respectivamente.

Tabla 2.- Soluciones de CTS/precursor químico realizadas con radiación solar.

Solución (% peso)	CTS 0.5%	CTS1%	CTS1.5%	CTS2%
HAuCl ₄ •3H ₂ O 1.5%	+	+	+	+
HAuCl ₄ •3H ₂ O 1%	+	+	+	+
HAuCl ₄ •3H ₂ O 0.7%	+	+	+	+
HAuCl ₄ •3H ₂ O 0.45%	+	+	+	+
AgNO ₃ 0.7%	+	+	+	+
AgNO ₃ 0.5%	+	+	+	+
AgNO ₃ 0.3%	+	+	+	+
AgNO ₃ 0.1%	+	+	+	+

6.1.2.- SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS.

Las nanopartículas fueron obtenidas por reducción química empleando tres diferentes fuentes energéticas para su análisis comparativo:

- Por exposición a radiación solar directa.
- Con aumento de la temperatura y agitación magnética: Utilizando una parrilla con agitación magnética (Thermo SCIENTIFIC, Cimarec), a 8 revoluciones por minuto y 80-90°C
- Con lámpara de luz UV: Utilizando una lámpara de luz UV (MINERALIGHT® LAMP MODEL UVGL-25, MULTIBAND UV-254/366)

6.2.- OBTENCIÓN DE LAS PELÍCULAS DE QUITOSANO/NANOPARTÍCULAS METÁLICAS (CTS/AgNPs Y CTS/AuNPs).

Para las soluciones de nanopartículas obtenidas por reducción solar en la matriz polimérica se obtuvieron películas delgadas por evaporación de solvente. Las diferentes combinaciones de CTS/AgNPs y CTS/AuNPs se vaciaron a cajas Petri de plástico de 10 cm de diámetro, se llevaron a la estufa a 60°C durante 24 horas para evaporar el solvente y permitir la formación de las películas. Las

muestras, una vez secas se conservaron en las cajas Petri para su posterior uso y caracterización.

6.3.- SÍNTESIS DE NANOFIBRAS DE QUITOSANO/NANOPARTÍCULAS METÁLICAS (CTS/AgNPs Y CTS/AuNPs).

Las películas de quitosano/nanopartículas metálicas (obtenidas como se describe en el apartado 6.2) se disolvieron en una solución ácido trifluoroacético: diclorometano (70:30) para posteriormente ser inyectadas en la unidad de Electrospinning (NaBond Technologies Co., China) para la formación de nanofibras compuestas con la implícita evaporación del solvente. Las condiciones óptimas del proceso fueron determinadas después de varios ensayos y se reportan en los resultados.

6.4.- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE COMPUESTOS CTS/nPMs.

El ensayo microbiológico fue realizado en el Laboratorio EDULAB. Se llevó a cabo por el método de Kirby-Bauer para estudiar la susceptibilidad por difusión en disco de las cepas analizadas.

El principio de las pruebas de difusión por disco ha sido utilizado por más de 70 años en los laboratorios de microbiología. Alexander Fleming utilizó una variante de esta técnica cuando trabajaba con la penicilina en los años cincuenta.

Los doctores Bauer, Kirby, Sherris y Turck probaron minuciosamente todas las variables involucradas en el proceso, tales como los medios de cultivo, la temperatura y el espesor del agar. En 1966, ellos publicaron su estudio describiendo la prueba que se usa en la actualidad.

Las cepas que se analizaron fueron:

Escherichia coli y *Pseudomona aeruginosa*: Bacterias gram negativas capaces de colonizar diversas áreas del cuerpo humano, cuando este se encuentra inmunocomprometido.

Staphylococcus aureus: Bacteria gram positiva, saprofita cutánea que colonizan la piel y la nariz del personal de los hospitales y de los pacientes y pueden causar una gran variedad de infecciones pulmonares, óseas, cardíacas y sanguíneas.

Preparación de los medios de cultivo:

Como medio de cultivo fue empleado agar Müller-Hinton deshidratado de Bioxon®, el cual fue preparado según las especificaciones del fabricante. Una vez preparados los medios, se esterilizaron en autoclave. Inmediatamente después de esterilizar se colocó el agar nutritivo en las cajas de Petri y se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. Posteriormente se colocaron en refrigeración a 4°C para conservarlas hasta su uso.

Preparación del inóculo:

Se inoculó la superficie seca del Müller-Hinton por hisopado en tres direcciones por cuadrantes en placa para asegurar una completa distribución del inóculo correspondiente a cada una de las cepas. Una vez inoculadas las bacterias se colocaron los discos de CTS/nPM, con 50 µl cada uno. La incubación fue por 24 horas a 37 °C.

Interpretación de resultados:

Transcurrido el periodo de incubación, se midieron los halos de inhibición y se compararon con los obtenidos con el antibiótico Meropenem, el cual es útil para combatir a las 3 bacterias utilizadas.

6.5.- CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES OBTENIDOS.

Con el fin de analizar las propiedades físicas y químicas de los materiales sintetizados, en el presente trabajo se emplearon diferentes técnicas de caracterización, cada una de ellas con un objetivo particular. A continuación se mencionan las técnicas empleadas para comprobar o identificar propiedades de los materiales.

6.5.1.- CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS.

1.- ESPECTROSCOPIA MOLECULAR DE ABSORCIÓN UV-Vis: Para determinar la presencia de NPs metálicas (nPMs), se empleó un Espectrofotómetro UV-Vis GENESYS 10S Thermo SCIENTIFIC del instituto de Químico Biológicas de la UMSNH, en el intervalo de 300 a 600 nm. La absorción UV-Vis produce excitación de electrones superficiales de las nPMs por lo que las longitudes de onda (λ) de los picos de absorción pueden correlacionarse con las resonancias de los plasmones superficiales de las AgNPs y AuNPs identificándoles a 450 nm y 550 nm

respectivamente, las cuales son características a su tamaño nanométrico.

2.- ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR): Por ser útil para identificar las posibles interacciones entre polímero y las nPMs, se empleó el Espectrofotómetro Thermo Scientific modelo Nicolet iS10 del Instituto de Químico Biológicas de la UMSNH, en el intervalo de 4000-650 cm^{-1} .

6.5.2.- CARACTERIZACIÓN DE LA MORFOLOGÍA DE NANOFIBRAS Y PELÍCULAS.

1.- MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO POR EMISIÓN DE CAMPO (FESEM): La morfología de las nanofibras de CTS/AgNPs y CTS/AuNPs fue analizada por medio de un Microscopio Electrónico de Barrido JOEM JSM 6400 del Instituto de Investigaciones Metalúrgicas de la UMSNH.

7.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

El análisis de resultados obtenidos fue dividido en 7 etapas como se muestra en la Figura 8:

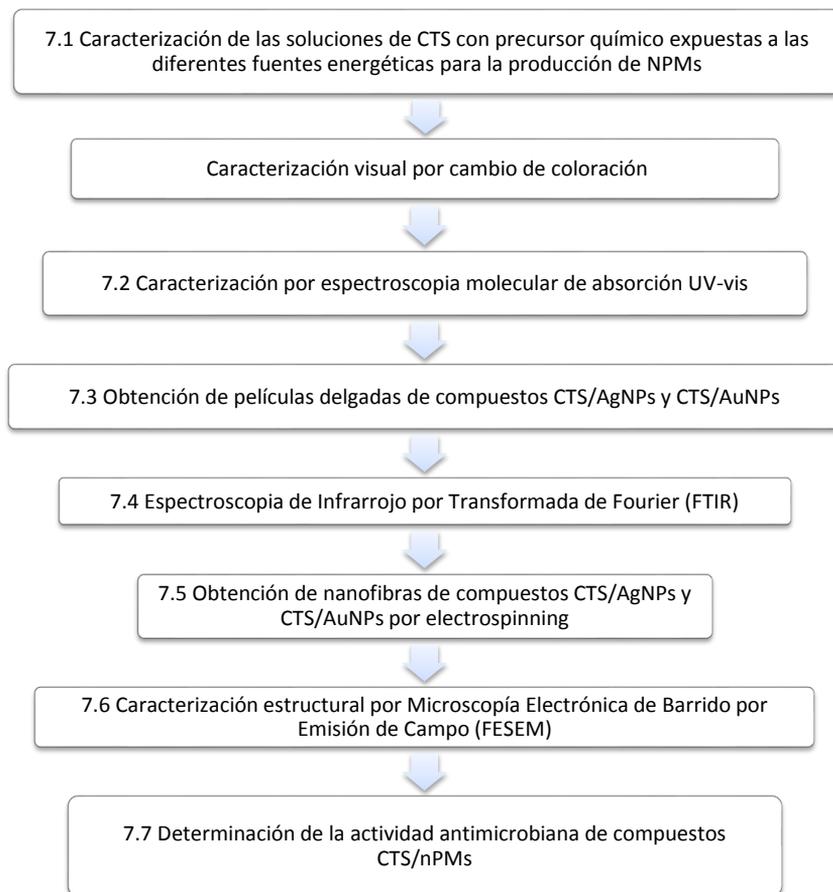


Figura 8.- Esquema de las etapas del análisis de resultados.

7.1.- CARACTERIZACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE CTS CON PRECURSOR QUÍMICO EXPUESTAS A LAS DIFERENTES FUENTES ENERGÉTICAS PARA PRODUCCIÓN DE nPMs.

7.1.1.- Caracterización visual por cambio de coloración para la producción de AgNPs.

En la primera etapa, se presenta la reducción química de las soluciones polímero/ AgNO_3 por las tres vías analizadas (por exposición a radiación solar, a lámpara de luz UV y por agitación magnética con calor). En todos los casos, se obtuvieron soluciones coloidales que fueron cambiando lentamente su coloración desde transparente y pasando por diferentes tonalidades de amarillo hasta llegar a gris, como se observa en la Figura 9. Este cambio de coloración es un indicio de la generación de AgNPs.



Figura 9.- Síntesis de AgNPs con radiación solar.

7.1.2.- Caracterización visual por cambio de coloración para la producción de AuNPs.

En el caso de las soluciones con AuHCl_4 , el cambio observado fue de transparente, pasando por diferentes tonalidades rosadas, hasta llegar a un rosa intenso, como se observa en las Figura 10. Estas coloraciones refieren la presencia de nanopartículas y están relacionadas con el tamaño de nanopartícula generada de menor a mayor tamaño [75]. En ambos casos, dicho cambio indica que la reducción química se ha llevado a cabo correctamente a diferentes tiempos, y es un indicio de que la formación de nPMs se ha llevado a cabo, esto dependiendo del tiempo de exposición de la solución.



Figura 10.- Síntesis de AuNPs, con radiación solar.

El tiempo total de exposición de las soluciones se determinó una vez que no se observó un cambio adicional aparente en la coloración de las mismas. Al concluir la reducción de las soluciones, se logran apreciar diferentes tonalidades entre ellas, lo cual da evidencia de la formación de las nanopartículas metálicas, la tonalidad está relacionada con tamaño de partícula la cual a su vez depende de la concentración inicial de la solución [76]. El tiempo final de exposición varió desde 20 minutos hasta 15 horas, como se muestra en la Tabla 3, según el tipo de solución y de la fuente de energía aplicada. Estos tiempos de reducción son verificados posteriormente a través de la espectroscopia UV-Vis.

Tabla 3.- Parámetro para la reducción química

NPs	Reducción solar	Reducción mecánica	Reducción con lámpara
Ag	Índice de radiación UV, tiempo (20min. aprox.)	Temperatura (80°C), rpm. (6), tiempo (1h. 40min aprox.)	Intensidad de la luz, tiempo (15h aprox.)
Au	Índice de radiación UV, tiempo (2h. aprox.)	Temperatura (80°C), rpm. (6), tiempo (1h. 20min aprox.)	Intensidad de la luz, tiempo (15h aprox.)

7.2.- ESPECTROSCOPIA MOLECULAR DE ABSORCIÓN UV-Vis.

La segunda fase incluye un estudio mediante Espectroscopia UV-vis para las muestras preparadas mediante la metodología de síntesis presentada en la Tabla 3 y con las soluciones de diferentes concentraciones mostradas en la Tabla 2, en las cuales se analizó el efecto de la concentración de las sales de plata y oro, así como el efecto de la concentración del CTS.

Esta técnica de caracterización permite correlacionar las bandas de absorción observadas debidas a la resonancia del plasmón superficial, con el tamaño y las forma de las NPs en estudio. La resonancia del plasmón superficial es originada por los electrones libres presentes en la superficie de las nanopartículas, los cuales interaccionan con la radiación UV. El efecto físico de la absorción de la luz por las nPMs suspendidas en los líquidos, es la oscilación coherente de los electrones de la banda de conducción como respuesta a la interacción con el campo electromagnético, lo que es conocida como Resonancia de Plasmones de Superficie (RPS). Los espectros obtenidos presentan una banda característica a la RPS resultante de la oscilación colectiva de los electrones de conducción del metal en las nanopartículas [77].

La formación de partículas metálicas de tamaño nanométrico aparecen en bandas en el rango UV-Vis del espectro correspondiente a la absorción por resonancia de los plasmones superficiales. En el caso de un sistema de nanopartículas esféricas monodispersas se presenta la aparición de un único pico, y la variación de intensidad indica el grado de avance de la reacción (reducción de Ag^+ a Ag^0 y de Au^{+3} a Au^0) con el consiguiente aumento del número de nanopartículas.

7.2.1- ESPECTROSCOPIA MOLECULAR DE ABSORCIÓN UV-Vis: EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LAS SOLUCIONES CTS/AgNPs POR REDUCCIÓN SOLAR.

En la Tabla 2 descrita en el **apartado 6** (Materiales y Metodología) se muestran las diferentes concentraciones de las soluciones poliméricas sometidas al proceso de reducción química por exposición a la radiación solar. Como se muestra en la Tabla, se analizó el efecto de la variación de la concentración del biopolímero, manteniendo constante la concentración de la sal metálica, así como el caso inverso; variando la concentración de la sal metálica y manteniendo la concentración del biopolímero constante.

De acuerdo al análisis UV-Vis, los espectros de todas las soluciones CTS/AgNO₃ expuestas a radiación solar, mostraron los máximos de absorción en

el rango de 395 a 400 nm. La Figura 11, muestra el espectro de 4 de las concentraciones mostradas en la Tabla 2. Para simplificar y exponer más claramente dicho comportamiento, las concentraciones de las soluciones correspondientes a los espectros mostrados en la Figura 11 se resaltaron en color amarillo en la Tabla 2 y también se muestran en la Figura correspondiente.

Como se observa en la Figura 11, la mayor absorbancia es originada en las soluciones con 1.5% en peso de CTS conteniendo 0.7 % en peso de la sal de AgNO_3 , esta se presenta en una longitud de onda de 396.65 nm lo que es característico del plasmón superficial de plata coloidal. Dado que la absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de AgNPs obtenidas, esto indica que bajo estas concentraciones se favorece la formación de nanopartículas respecto de las otras concentraciones.

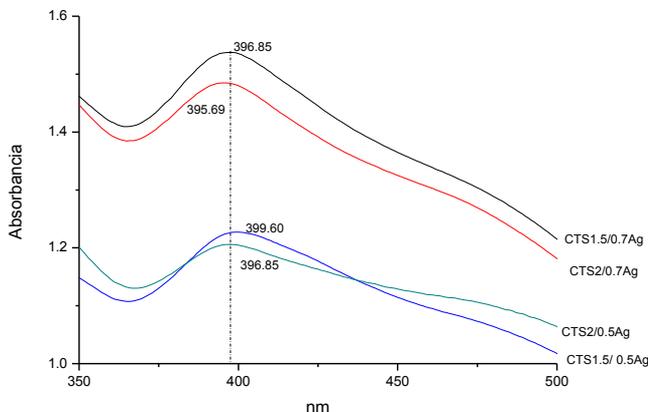


Figura 11.- Evaluación de la concentración de las soluciones CTS/AgNPs por reducción solar.

El ensanchamiento y la asimetría de los picos observados, pueden ser atribuidos a la formación de AgNPs de diferentes tamaños y formas [78], sin embargo, también podría indicar la agregación de las partículas metálicas dado que su posición exacta depende de varios factores, tales como el diámetro, la forma y la distribución de tamaños de las AgNPs formadas [79-80].

Adicionalmente, también es posible observar que al aumentar la concentración del polímero (de 1.5 % a 2%), la reducción se ve ligeramente afectada lo que pone de manifiesto que el proceso de reducción es afectado al

aumentar la viscosidad de la solución y por ende con la presencia de una mayor cantidad de cadenas del polímero.

7.2.2.- ESPECTROSCOPIA MOLECULAR DE ABSORCIÓN UV-Vis: EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LAS SOLUCIONES CTS/AuNPs POR REDUCCIÓN SOLAR.

De manera similar, en la Tabla 2 del **apartado 6** se muestran las combinaciones que se realizaron para las soluciones de quitosano con nanopartículas de oro obtenidas por radiación solar. En este caso, los máximos de los picos de absorbancia se ubican entre 517 y 527 nm, los cuales son característicos de las nanopartículas de oro. En la Figura 12 se observan 4 de las combinaciones analizadas y sus concentraciones correspondientes, las cuales muestran el comportamiento general de las soluciones CTS/ $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. En este caso, la diferencia en las absorbancias es menos significativa que en el caso de las AgNPs, sin embargo, la mayor absorbancia la presenta la solución con 2% en peso de CTS conteniendo 1.5% de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$.

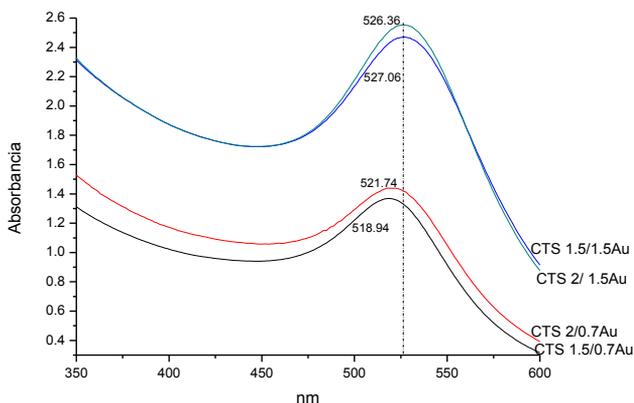


Figura 12.- Evaluación de la concentración de las soluciones CTS/AuNPs por reducción con radiación solar.

De los resultados anteriores, se eligieron las soluciones reducidas con CTS 1.5% peso conteniendo 0.7 % de AgNO_3 y CTS 2% en peso conteniendo 1.5 % de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ para su posterior análisis debido a que fueron las que mostraron una mayor eficacia en la reducción a NPMs.

7.2.3.- ESPECTROSCOPIA MOLECULAR DE ABSORCIÓN UV-Vis: EVALUACIÓN DEL MÉTODO Y TIEMPO DE REDUCCIÓN DE LAS SOLUCIONES CTS/AgNPs.

En la Figura 13 se muestra el espectro UV-Vis de las soluciones coloidales de AgNPs con las concentraciones elegidas anteriormente (CTS 1.5% peso y AgNO_3 0.7%), empleando cada una de las fuentes energéticas descritas en la Figura 13 para llevar a cabo la reducción química. La máxima absorbancia UV-Vis se ubicó en un rango de ~ 380 a ~ 404 nm. Estos picos corroboran la formación de nanopartículas de plata y su absorbancia concuerda totalmente con la tonalidad final de cada una de las soluciones, es decir, a mayor absorbancia mayor intensidad en la coloración.

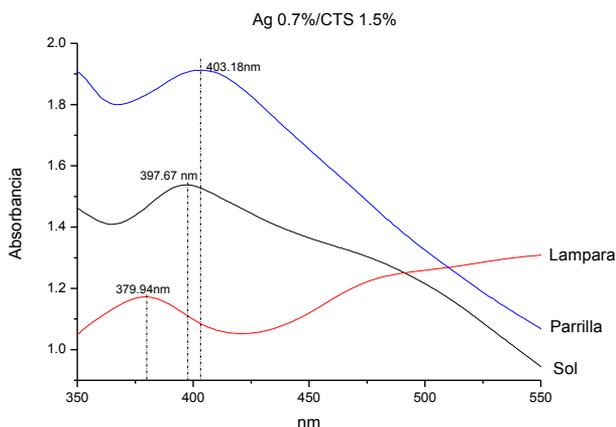


Figura 13.- Espectro UV-Vis para AgNPs.

A partir de este comportamiento es posible determinar la influencia de la variable de síntesis en el tamaño de nanopartículas de plata, de acuerdo con la Figura 13, los máximos de los picos de absorción que se observan en la reducción química se presentan de la siguiente manera:

- Utilizando la parrilla como fuente de energía, la máxima absorción se tiene en ~ 404 nm.
- Utilizando como fuente de energía la radiación solar la banda de absorción se desplazó a ~ 395 nm, y finalmente
- Utilizando la lámpara de luz ultravioleta la máxima absorción se presentó en ~ 380 nm.

Dado que la forma de la banda del plasmón superficial y su posición dependen del diámetro y forma de las partículas; es decir si éstas incrementan su tamaño, la banda de absorción tiende a desplazarse hacia longitudes de onda mayores [78-81], se puede concluir que se tiene un mayor diámetro de nanopartículas cuando se utiliza la parrilla, seguido del proceso por radiación solar y finalmente obteniéndose el menor tamaño cuando se utiliza la lámpara de luz UV.

Otro aspecto importante que puede destacarse a partir del análisis de la Figura 13, es la eficacia de la variable de síntesis en la producción de AgNPs; se observa una mayor absorbancia al emplear la parrilla como fuente energética para la reducción química, seguida por la radiación solar, y con una menor eficacia con la exposición a radiación con lámpara de radiación UV.

En los tres casos expuestos anteriormente, se realizó un seguimiento de la reacción mediante la espectroscopia UV-Vis para la obtención de curvas de progreso monitoreando el cambio en la absorbancia respecto del tiempo de exposición a la fuente de energía correspondiente para la reducción química, iniciando en el tiempo cero y realizando mediciones de absorbancia en intervalos definidos de tiempo hasta no registrar un cambio alguno en el máximo de la absorbancia.

En la Figura 14 se muestran los resultados obtenidos y las curvas de progreso correspondientes como resultado del monitoreo de la reducción de las soluciones CTS 1.5 %/AgNO₃ 0.7 %. De acuerdo a las fases de crecimiento descritas esquemáticamente en la Figura 4 del **Apartado 5.3.1**, utilizando radiación solar como fuente de energía, la etapa de nucleación ocurre aproximadamente a los 10 min de exposición, para posteriormente seguir con la fase de crecimiento hasta los 14.5 min y a partir de ese tiempo se logra la estabilidad de las partículas formadas, por lo cual el tiempo total de reducción se detuvo a las 20 minutos al no registrarse cambios adicionales en los máximos de la absorbancia. Respecto a las soluciones reducidas con aumento de la temperatura y agitación mecánica, la nucleación se observa aproximadamente a los 50 min y la etapa de crecimiento se prolongó hasta 1h 55 min, pero no se logra apreciar una tendencia hacia la estabilización de las nanopartículas a un tiempo total de reducción de 2h 20 min. Por último, las soluciones reducidas con lámpara UV, presentaron la nucleación a las 9 h, la etapa de crecimiento a partir de las 12 h y de manera similar a las producidas en la parrilla, no se logra tener una estabilización aun después de 15 h de exposición.

De esta manera se puede concluir que las condiciones óptimas de reacción fueron: tiempo 20min y el uso de radiación UV-solar, debido a que después de este tiempo no se produce cambio ni en la coloración ni en el espectro UV, lo cual indica que la reducción de las nanopartículas se ha completado y éstas se mantienen estables. Mientras que para los otros dos métodos el crecimiento continuó aun después de 15 h.

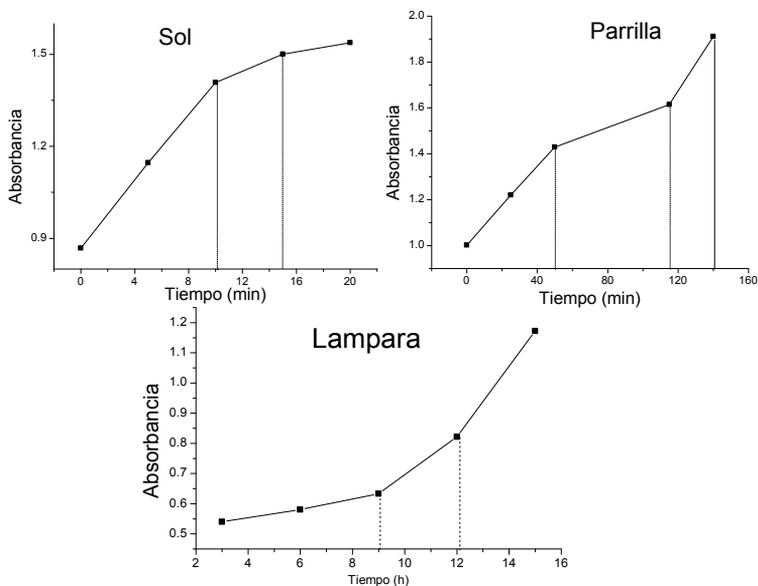


Figura 14.- Curvas de la reducción progresiva en solución de CTS 1.5% w/w, AgNO_3 0.7% w/w.

Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos respecto al cambio en la coloración y tonalidad de las soluciones con el paso del tiempo, los cuales fueron presentados en la Figura 9 y la Tabla 3. Sin embargo, solamente a partir de la espectroscopia UV-Vis ha sido posible determinar cuál de los tres métodos produce AgNPs con una mayor estabilidad. La mayor estabilidad de las AgNPs formadas mediante reducción por radiación solar, puede atribuirse a una mayor homogenización en la aplicación de la energía de reducción, es decir, en el caso de la parrilla, el calor no se aplica de manera homogénea aun cuando se promueve su dispersión con la agitación mecánica, mientras que con la exposición a radiación UV mediante la lámpara la dispersión de la radiación es menos homogénea.

7.2.4.- ESPECTROSCOPIA MOLECULAR DE ABSORCIÓN UV-Vis: EVALUACIÓN DEL MÉTODO Y TIEMPO DE REDUCCIÓN DE LAS SOLUCIONES CTS/AuNPs.

Para el caso de las AuNPs, en la Figura 15, podemos observar que los máximos de los picos de absorbancia UV-Vis se encuentran entre ~519-~527 nm lo que es característico de la señal del plasmón de superficie para las nanopartículas de oro (76). Cuando el método de reducción es la radiación solar y la lámpara de luz UV se tiene la absorbancia máxima en ~526 nm en ambos casos, mientras que cuando se utiliza la parrilla se da en ~520 nm.

Cuando la partícula tiene diámetro de 10 nm, ésta comienza a dispersar luz aunque dispersa mucho menos luz que la que absorbe, por lo que se espera que su espectro UV-Vis no presente ensanchamientos debido a efectos de dispersión. Sin embargo, cuando la partícula incrementa su diámetro, ésta dispersa un poco más de luz que la que absorbe. Es decir, los modos de dispersión de la esfera dependen del diámetro de la misma. Además de que se presentan desplazamientos de los modos de dispersión, provocando que el ancho del pico aumente conforme crece el tamaño de la esfera [82]. De esta manera podemos decir que se tienen nanopartículas de menor tamaño cuando se utiliza la parrilla que cuando se utiliza radiación solar o lámpara UV directamente sobre la solución para la síntesis, lo cual se confirma con la teoría de la posición del pico de absorción de menor valor para la parrilla que para las otras vías de reducción.

La mayor absorbancia la presentan las soluciones expuestas a radiación solar lo que implica una mayor eficacia en la reducción para la síntesis de AuNPs, es decir, una mayor cantidad de éstas. Y nuevamente, la menor eficacia la presenta la reducción con lámpara UV.

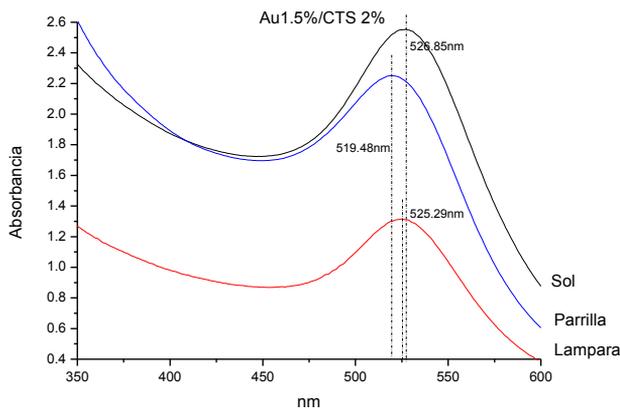


Figura 15.- Espectro UV-Vis para AuNPs.

En las curvas de progreso de CTS-AuNPs, observadas en la Figura 16; en las soluciones reducidas por radiación solar es posible identificar la etapa de nucleación a los 30 min, de crecimiento a los 90 min y a partir de este tiempo se logra la estabilidad de las partículas formadas, por lo cual la reducción se concluyó a las 2 h. Para las soluciones reducidas en parrilla con calor y agitación mecánica, la nucleación se observa a los 20min y la etapa de crecimiento hasta los 40 min estabilizándose a este tiempo, por lo cual se da por terminada la reducción a los 50 min. Por último, las soluciones reducidas con lámpara UV, presentaron la nucleación a las 6 h, el crecimiento a partir de las 12 h y no se logra una tendencia hacia la estabilización aun después de 15 h de exposición.

De esta manera, es posible concluir que las condiciones óptimas de reacción fueron: Tiempo 50 min y Energía mecánica ya que después de este tiempo no se produce cambio ni en la coloración ni en el espectro UV.

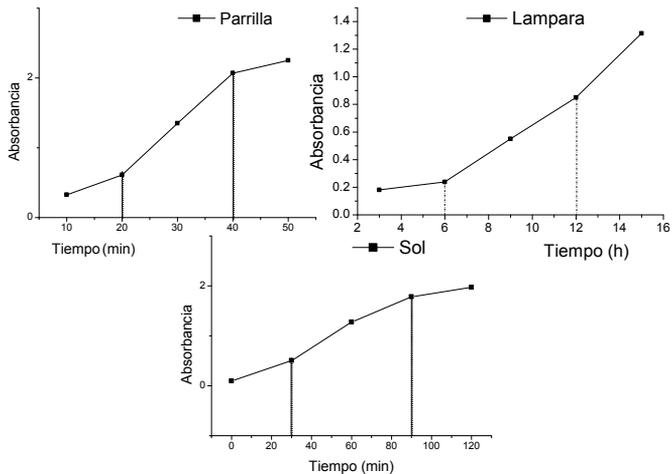


Figura 16.- Curvas de la reducción progresiva en solución de CTS 2% w/w, Au 1.5% w/w.

7.3.- OBTENCIÓN DE PELÍCULAS DELGADAS DE COMPUESTOS CTS/AgNPs Y CTS/AuNPs.

Una vez confirmada la formación de nanopartículas metálicas y determinado el tiempo de reducción, se obtuvieron películas delgadas por el método de evaporación del solvente. Como parte de la tercera etapa; las soluciones de CTS conteniendo las NPMs se vierten en cajas Petri plásticas y se permite la evaporación del solvente durante 24 horas en estufa a 67°C, obteniendo películas como la observada en la Figura 17.



Figura 17.- Película de CTS con nPMs.

7.4.- ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR).

Dentro de la cuarta fase se encuentra el análisis de las posibles interacciones químicas entre el CTS y las nPMs mediante Espectrofotometría de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR), los espectros se obtuvieron a partir de películas delgadas de los compuestos. En la Figura 17, se muestra una película del compuesto CTS/AuNPs.

La técnica de Espectroscopia de Infrarrojo permite la identificación de los grupos funcionales de un compuesto. Esto debido a que cuando una molécula absorbe radiación infrarroja, la vibración intramolecular con frecuencia igual a la de la radiación, aumenta en intensidad, lo que genera señales con frecuencias que corresponden a la vibración de un enlace específico. La región infrarroja se divide en tres regiones denominadas infrarrojo cercano (NIR), infrarrojo medio (MIR) e infrarrojo lejano (FIR). Comúnmente la región MIR es la que brinda una mayor información de los grupos funcionales presentes en las muestras orgánicas.

El espectrómetro de IR por transformada de Fourier permite la obtención de espectros de forma rápida, precisa y con relaciones Señal/Ruido (S/N) elevadas [83].

7.4.1.- ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR) PARA COMPUESTOS CTS/AgNPs.

Los espectros de infrarrojo para las películas de CTS puro y de la combinación CTS/AgNPs con 1.5% en peso de CTS con 0.7 % en peso de la sal de AgNO_3 elegida por ser la que muestra el pico de absorción más elevado analizado anteriormente, se observan en la Figura 18, en la cual se comparan las tres fuentes de energía empleadas para la reducción de la sal metálica.

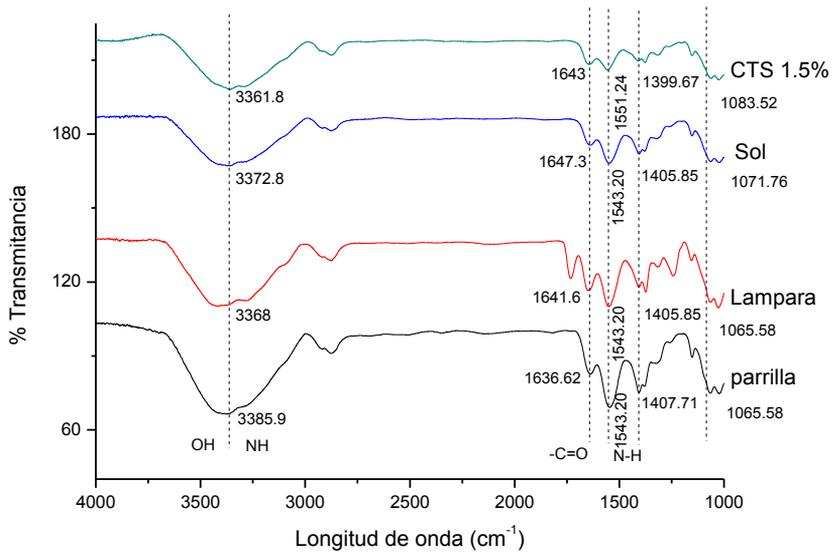


Figura 18.- Espectros de IR para CTS/AgNPs.

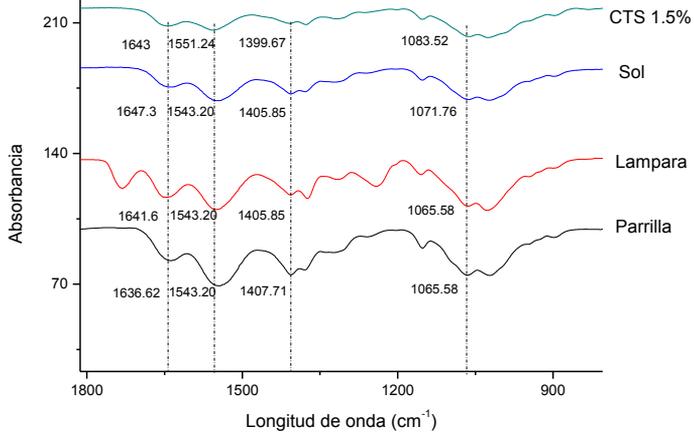


Figura 19.- Ampliación de región 1800-1000 cm⁻¹ para CTS/AgNPs.

Los espectros del compuesto CTS/AgNPs para las tres técnicas de reducción (solar, lámpara y parrilla con agitación mecánica) revelaron bandas de absorción características del quitosano puro quien es la matriz en el material

compuesto y el agente reductor en la formación de las nanopartículas. Estas bandas se presentan en: $\sim 3000, 3500 \text{ cm}^{-1}$, las vibraciones correspondientes a los NH_2 del grupo Amida y los grupos OH (vibraciones de tensión del enlace N-H y tensión y flexión del enlace O-H, respectivamente) las cuáles se observan como un pico muy ancho debido a la formación de enlaces por puente de hidrógeno intramoleculares, en $\sim 1643 \text{ cm}^{-1}$ una banda perteneciente a la amida I originada por vibraciones de tensión del enlace C=O, en 1550 cm^{-1} una banda relacionada con la amida II debido a vibraciones de flexión del enlace N-H y de tensión del enlace C-N, y finalmente en 1400 cm^{-1} , una banda característica de la amida III originada por vibraciones de flexión del enlace N-H.

En la Figura 19, se observa claramente que en los espectros de las nanopartículas de plata sintetizadas por las tres diferentes vías de reducción que las bandas de absorción correspondientes a los grupos amida, se desplazaron a números de onda menores respecto del espectro del CTS puro; para la reducción solar y la lámpara UV se desplazó de 1400 a 1405 cm^{-1} y para la reducción en parrilla con agitación magnética se desplaza 1400 a 1407 cm^{-1} . Estos cambios en las posiciones de las bandas pueden estar relacionados a la interacción entre este grupo funcional N-H del quitosano con las nanopartículas de plata. Cambios similares en los espectros FT-IR de películas compuestas CTS/AgNPS han sido reportados en películas con AgNPs preparadas por otros métodos [84, 85]. Xu y colaboradores [86] establecieron que las amidas del CTS pueden estar ligadas con la Ag a través de un enlace coordinado.

En el espectro obtenido de la reducción con lámpara UV, aparece la banda antes localizada en 1376 cm^{-1} , lo que puede atribuirse a que aún queda nitrato de plata libre sin disociarse originando esta señal. Este pico, ubicado a 1376 cm^{-1} , es característico del ión NO_3^- en forma libre, y el desplazamiento es provocado por un cambio en el entorno electrónico del anión, producto de la separación de su contraparte Ag^+ [87].

Por otro lado se observa que la banda que se ubicada en 3360 cm^{-1} sufre también ligeros desplazamientos; a 3380 cm^{-1} para la reducción utilizando la parrilla, y a 3372 cm^{-1} utilizando radiación solar, mientras se mantiene constante con el uso de lámpara UV, estos cambios respecto del espectro del CTS puro pueden atribuirse a las interacciones entre el grupo funcional N-H de la amida y OH del quitosano con las nanopartículas de plata.

Con estos resultados es posible deducir que estas interacciones son las responsables, en gran medida, de la estabilidad presentada por las soluciones

coloidales descritas en las curvas de progreso obtenidas por espectroscopia UV-Vis. El enlace coordinado entre los grupos amido del CTS y la Ag resulta en una dispersión uniforme de los iones plata en la solución de CTS y algunos de estos iones se convierten en núcleos de tal forma que el quitosano además de ser un buen agente reductor, contribuye a la nucleación y estabilización para la formación de AgNPs.

Sin embargo, como lo establecieron González-Campos y colaboradores anteriormente [84], la plata puede estar presente en el compuesto como una combinación de AgNPs y iones Ag^+ originando un aumento en la conductividad del compuesto, y sus propiedades antimicrobianas estarán en función de la concentración de AgNPs y del estado de oxidación de la Ag.

7.4.2.- ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR) PARA COMPUESTOS CTS/AuNPs.

De manera similar los espectros de infrarrojo para las películas de CTS/AuNPs, comparando las tres fuentes de energía empleadas para la reducción de la sal metálica, con una concentración de 1.5% peso de la sal precursora respecto al peso del quitosano y 2% peso de CTS que se observan en la Figura 20. Estos espectros muestran los picos de absorbancia característicos del quitosano que es la matriz polimérica utilizada en la reducción.

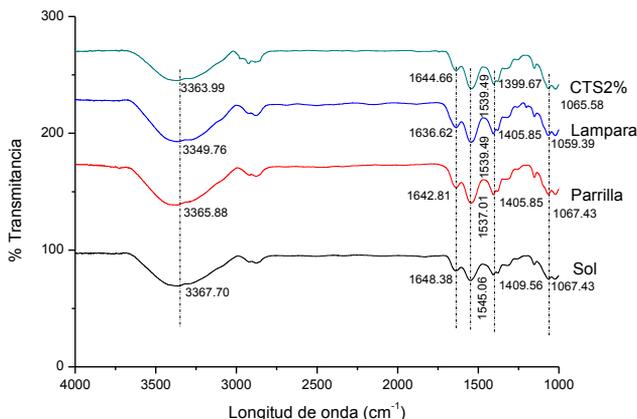


Figura 20.- Espectros de IR para CTS/AuNPs.

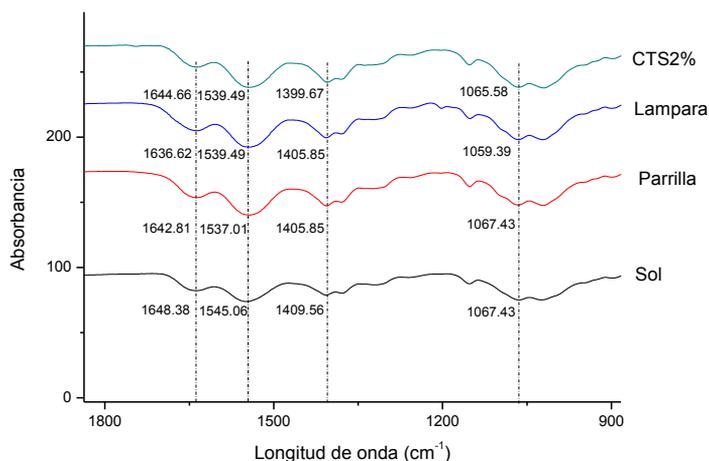


Figura 21.- Ampliación de la region 1800-1000 cm^{-1} para CTS/AuNPs.

Para el caso de nanopartículas de oro, como se observa en la Figura 21, que el pico en 1535 cm^{-1} correspondiente a la amida II (vibraciones de flexión del enlace N-H y de tensión del enlace C-N) sufre un evidente desplazamiento hasta 1545 cm^{-1} lo que sugiere que la interacción de las nanopartículas de oro con el quitosano también se lleva a cabo con estos grupos funcionales del biopolímero como lo mostraron anteriormente Hsu y colaboradores [85].

7.5.- OBTENCIÓN DE NANOFIBRAS DE COMPUESTOS CTS/AgNPs Y CTS/AuNPs.

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; (TFA)/(DCM) (7:3) [88]. Sin embargo, en esta mezcla de disolventes el CTS no actúa como agente reductor debido a la formación de sales de trifluoroacetato de quitosano; los grupos amido interaccionan directamente con los grupos trifluoroacetato para la formación de la sal, y debido a que el CTS actúa como agente reductor precisamente debido a estos grupos funcionales, entonces para la obtención de nanofibras de CTS con AgNPs es necesario primero realizar la reducción de la sal metálica en soluciones de CTS ácido acético 1% para la posterior formación de biopelículas y su redisolución en un disolvente diferente para producir soluciones electrohilables.

Una vez caracterizados los compuestos CTS/nPMs en forma de películas, estas se disolvieron en una solución de TFA: DCM (7:3). Las soluciones resultantes fueron procesadas en el equipo de electrospinning para la obtención de nanofibras (Figura 22); esta etapa corresponde a la quinta fase experimental. Los parámetros adecuados (obtenidos después de varios ensayos) para la generación de nanofibras fueron: temperatura de 40°C, velocidad de inyección 0.009ml/min, distancia entre electrodos 12cm, voltaje de 20-25 KV empleando un colector vertical.



Figura 22.- Equipo de electrospinning para la obtención de nanofibras CTS/AgNPs y CTS/AuNPs.

7.6.- CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO POR EMISIÓN DE CAMPO.

Las nanofibras obtenidas por el método de electrospinning, así como las películas de CTS/nPMs elaboradas por evaporación del solvente, fueron analizadas mediante Microscopía Electrónica de Barrido por Emisión de Campo (FESEM), para determinar su morfología y calidad. Esto corresponde a la sexta fase experimental.

El microscopio electrónico de barrido, conocido por sus siglas inglesas SEM, utiliza electrones en lugar de luz para formar una imagen. Para lograrlo, el equipo cuenta con un dispositivo (filamento) que genera un haz de electrones para iluminar la muestra y con diferentes detectores se recogen después los electrones generados de la interacción con la superficie de la misma para crear una imagen que refleja las características superficiales de la misma, pudiendo proporcionar información de las formas, texturas y composición química de sus constituyentes.

Los nuevos microscopios SEM trabajan utilizando como fuente de electrones un cañón de emisión de campo, que proporcionan haces de electrones

de alta y baja energía más focalizados, lo que permite mejorar la resolución espacial, minimizar cargas sobre el espécimen a observar, causando además menos daños en muestras sensibles. De tal forma que el análisis con estos microscopios se denomina Microscopía Electrónica de Barrido por Emisión de Campo (FESEM por sus siglas en inglés).

Gracias a los detectores es posible obtener imágenes de alta resolución trabajando a bajo vacío y con muy bajos voltajes sin necesidad de metalizar las muestras, lo que permite visualizar muestras biológicas y materiales de muy diverso tipo (polímeros, cerámicas no conductoras, materiales híbridos organo-inorgánicos, etc.), incluso a la escala nanométrica [89].

7.6.1.- CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO POR EMISIÓN DE CAMPO DE PELÍCULAS DELGADAS Y NANOFIBRAS DE COMPUESTOS CTS/AgNPs.

En la Figura 23 se muestra la imagen FESEM de las nanofibras para el compuesto CTS/AgNPs, las cuales se observa poseen una calidad adecuada sin presencia de defectos y con diámetros promedio de 612 nm. La imagen mostrada esta generada a partir de la técnica de electrones retrodispersados, dicha técnica permite diferenciar los componentes de una muestra a partir de su luminosidad o brillantes 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 más brillante. Así pues, las áreas donde existan más elementos más pesados se ven más brillantes y donde aparecen elementos más ligeros, menos brillantes. En este caso, en la micrografía de la Figura 23 se observan claramente puntos brillantes los cuales corresponden a las NPMs. Las NPs tienen forma esférica y una distribución homogénea sin la presencia de aglomerados, estas se encuentran soportadas en las nanofibras y tienen un diámetro promedio de 114 nm tal y como se observa en el histograma de distribución de tamaño que se presenta en la Figura 23.

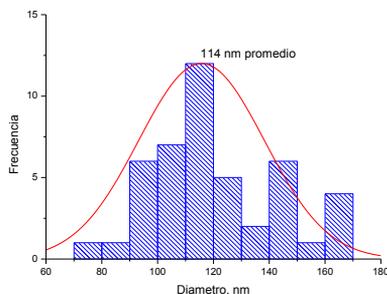
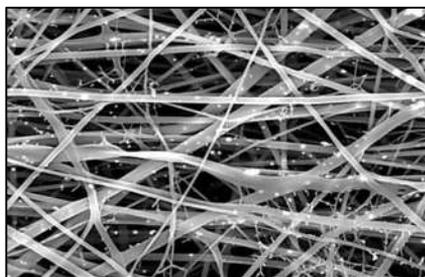


Figura 23.- Nanofibras CTS/AgNPs e Histograma de distribución de tamaño de partícula.

Por su parte, la Figura 24 muestra una micrografía de una película del compuesto CTS (1.5%)/AgNPs (0.7%), destacando que en este caso es una muestra en la cual la reducción química se efectuó en la parrilla con agitación mecánica. Se observa que las NPs tienen una forma esférica y se encuentran homogéneamente dispersas sin presencia de aglomerados, se aprecian diferentes diámetros, por lo cual se obtuvo un promedio obteniendo como resultado 118 nm como se observa en el histograma de distribución de tamaño de partícula.

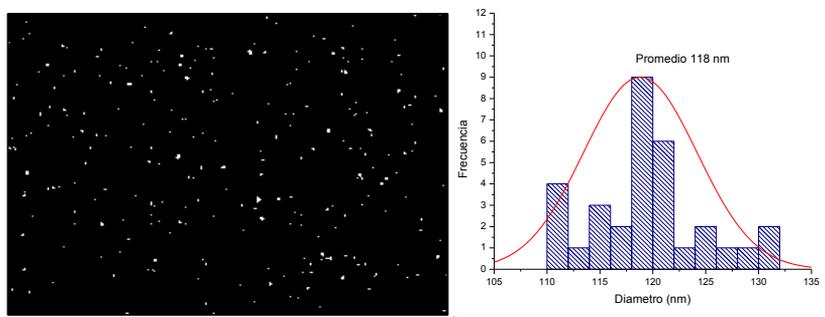


Figura 24.- AgNPs en películas de CTS (reducción en parrilla) e Histograma de distribución de tamaño de partícula.

La micrografía de una película del compuesto CTS (1.5%)/AgNPs (0.7%), reducido con radiación solar, se muestra en la Figura 25. Se observan NPs esféricas, homogéneamente dispersas con diferentes diámetros y sin presencia de aglomerados, del análisis del diámetro promedio se obtuvo como resultado 112 nm como se observa en el histograma de distribución de tamaño de partícula.

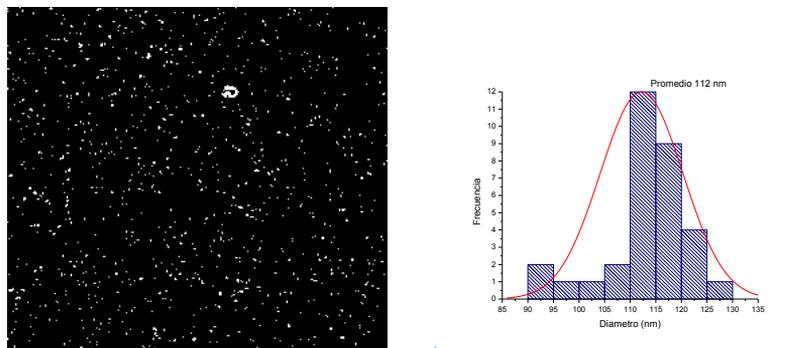


Figura 25.- AgNPs en películas de CTS (reducción con radiación solar) e Histograma de distribución de tamaños.

Estos resultados son congruentes con los resultados del análisis de espectros UV-Vis; de acuerdo a los espectros UV-Vis, el tamaño de AgNPs generadas en la parrilla es mayor respecto al tamaño de aquellas generadas con radiación solar. Adicionalmente es importante destacar que de acuerdo a las imágenes mostradas, se observa una mayor cantidad de nanopartículas distribuidas a lo largo de la matriz de CTS, así como una menor cantidad de aglomerados en los compuestos provenientes de la reducción solar respecto de los compuestos obtenidos mediante reducción inducida en parrilla con agitación magnética, este resultado puede relacionarse con las curvas de progreso obtenidas anteriormente medias espectroscopia UV-Vis; se tiene una menor estabilidad de las AgNPs generadas empleando la parrilla respecto del uso de radiación solar lo cual origina una mayor formación de aglomerados.

Es importante destacar que el procesamiento de las soluciones de CTS/AgNPs mediante electrospinning no tiene un efecto significativo en el tamaño de las nanopartículas ya que los tamaños de partícula promedio de las AgNPs en los compuestos en forma de nanofibras (Figura 23) y películas (Figura 25) son muy cercanos 114 nm y 112 nm respectivamente.

7.6.2.- CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO POR EMISIÓN DE CAMPO DE PELÍCULAS DELGADAS Y NANOFIBRAS DE COMPUESTOS CTS/AuNPs.

En la Figura 26 se muestra la imagen SEM de las nanofibras compuestas CTS/AuNPs, las cuales se observa poseen una calidad adecuada sin presencia de defectos y con tamaño promedio de 400 nm. En las nanofibras CTS/AuNPs no fue posible calcular un promedio para el tamaño de las NPs debido a que éstas se encuentran incrustadas dentro de la fibra, sin embargo es posible apreciar su tamaño nanométrico y uniforme sin presentar aglomerados.

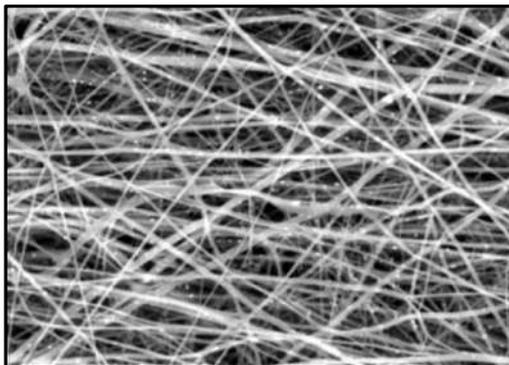


Figura 26.- Nanofibras CTS/AuNPs.

En la Figura 27 se muestra una micrografía del compuesto CTS (2%)/AuNPs (1.5%) en forma de película, destacando que es una muestra en la cual la reducción química se efectuó en parrilla con agitación mecánica. Se observan nanopartículas, las cuales presentan una forma esférica y se encuentran dispersas a lo largo de la matriz con la presencia de algunos aglomerados, sin embargo su dispersión es mucho menos homogénea respecto de la dispersión previamente mostrada en la AgNPs de las Figuras 24 y 25. En este caso la distribución de tamaños es mucho más amplia y el promedio obtenido fue 95 nm de diámetro como se observa en el histograma de distribución de tamaño.

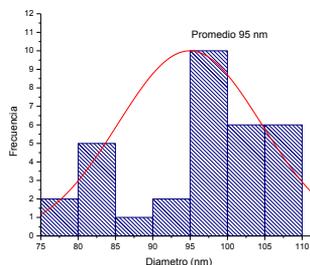


Figura 27.- AuNPs en películas de CTS (reducción en parrilla con agitación mecánica) e Histograma de distribución de tamaños.

La micrografía de una película del compuesto CTS (2%)/AuNPs (1.5%), obtenido por reducción con radiación solar se muestra en la Figura 28. Se observan NPs esféricas en toda la superficie de la película, homogéneamente

dispersas y con aglomerados de tamaño considerable, además se aprecian diferentes diámetros, por lo cual se obtuvo un promedio obteniendo como resultado 116 nm como se observa en el histograma de distribución de tamaño. Estos resultados son congruentes con los espectros UV-Vis ya que se obtiene un mayor tamaño de partícula cuando se emplea radiación solar respecto del método empleando la parrilla con agitación magnética.

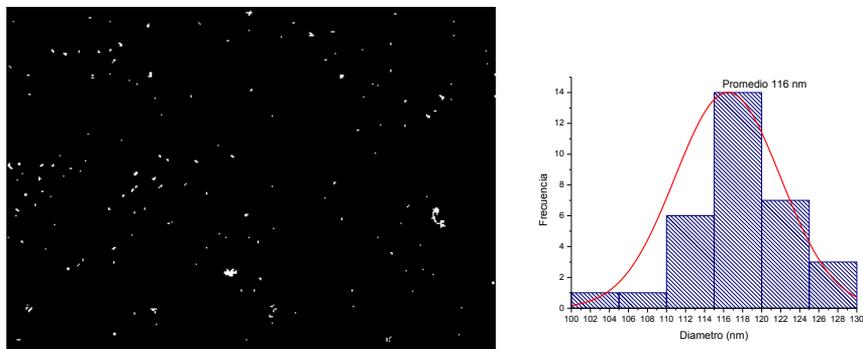


Figura 28.- AuNPs en películas de CTS (reducción solar) e Histograma de distribución de tamaños.

El análisis FESEM muestra que en la síntesis de AuNPs se generan una mayor cantidad de aglomerados y de mayor tamaño en comparación con los compuestos que contienen AgNPs. Este resultado puede relacionarse con los datos de los espectros UV; es más difícil lograr la estabilización de las AuNPs lo que induce un mayor tiempo en la reducción química. Esto a su vez puede afectar el desempeño de estos compuestos respecto a su actividad antimicrobiana.

7.7.- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE COMPUESTOS CTS/nPMs.

Las pruebas de actividad inhibitoria de los antibióticos están ideadas para bacterias que se desarrollan bien después de una incubación durante una noche en aire y tienen una sensibilidad impredecible. Las bacterias de difícil cultivo, que se desarrollan con mayor lentitud o que requieren suplementos nutritivos o atmosféricos, deben ser evaluadas con pruebas de dilución sólo si el uso cuidadoso de cepas bacterianas control demuestra la ausencia de efectos inhibitorios en la interacción. La *prueba de difusión con discos* puede ser modificada para este tipo de microorganismos si el procedimiento ha sido convalidado por comparación con pruebas de referencia y por la experiencia clínica.

Se ha elegido el medio Mueller-Hinton, caldo y agar, para las pruebas de aislamientos bacterianos aerobios y anaerobios facultativos. Contiene infusión de carne deshidratada, digerido ácido de caseína y almidón de maíz. La mayoría de los patógenos se desarrolla satisfactoriamente, y el medio posee propiedades inhibitorias mínimas para las sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclina.

Prueba de sensibilidad por difusión con disco: Cuando el disco impregnado con el antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el agua se absorbe en el papel filtro y el antibiótico se difunde en el medio que lo rodea. La concentración adyacente al disco puede exceder a la del disco mismo. Si las placas ya fueron inoculadas, se produce el crecimiento simultáneo de las bacterias sobre la superficie del agar. Cuando se alcanza una masa celular crítica de bacterias, se sobrepasa la actividad inhibitoria y aparece el crecimiento bacteriano. El tiempo requerido para alcanzar la masa celular crítica, es característico de cada especie, pero depende del medio y de la temperatura de incubación. La concentración del antibiótico que se difundió en esta interface de crecimiento y las bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica [90].

7.7.1- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE COMPUESTOS CTS/AgNPs.

Como séptima y última fase experimental, se realizaron pruebas para analizar la actividad antimicrobiana de las soluciones de CTS al 1.5% en peso con 0.1, 0.3, 0.5, y 0.7% peso (respecto al peso del quitosano) de la solución de AgNO_3 .

Las cepas frente a las que se probó la actividad antimicrobiana de los compuestos fueron: *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Los halos de inhibición obtenidos con los compuestos CTS/AgNPs se muestran en la Figura 29, y el resumen del resultado de su medición en la Tabla 4.

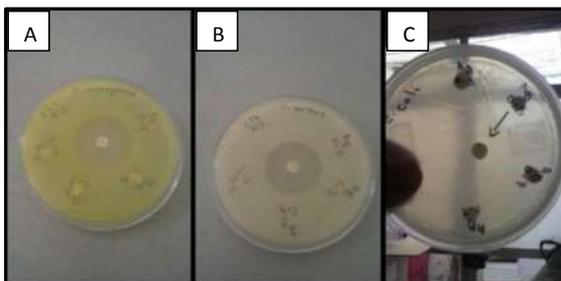


Figura 29.- Prueba de susceptibilidad a compuestos CTS/AgNPs comparados con los de Meropenem A: *Pseudomona aeruginosa*, B: *Staphylococcus aureus* y C: *Escherichia coli*.

Tabla 4.- Halos de inhibición para compuestos CTS/AgNPs y Meropenem.

Solución \ Cepas	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
CTS 1.5/Ag 0.1	1mm	0.5mm	1mm
CTS 1.5/Ag 0.3	1mm	0.5mm	1mm
CTS 1.5/Ag 0.5	1mm	0.5mm	1mm
CTS 1.5/Ag 0.7	1mm	0.5mm	1mm
Meropenem	13mm	15mm	14mm

Aun cuando la actividad de los compuestos CTS/AgNPs no es superior al mostrado por el Meropenem, los resultados obtenidos contra *E. coli* en los compuestos aquí mostrados son comparables con los obtenidos por Thomas y colaboradores [91], sin embargo los obtenidos contra *S. aureus* son superiores a los previamente reportados por Hsu y colaboradores [85] quienes emplearon soluciones comerciales de AgNPs para su inclusión a la matriz de quitosano con agitación a diferentes r.p.m. obteniendo como resultado después de las pruebas antimicrobianas halos de inhibición como máximo de 0.68 mm.

Díaz-Barrida y colaboradores [92] investigaron mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y de Barrido (SEM) los cambios morfológicos ocasionados en la estructura celular de *S. aureus* al ser expuestos a la combinación CTS-Ag. Ellos observaron que esta combinación afecta la estructura celular de la bacteria causando una elongación en la célula, desagregación de los agregados tipo uva, contracción del citoplasma de la bacteria, adelgazamiento de la pared celular, incremento en la rugosidad de la pared celular, rompimiento de la célula con pérdida de material extracelular, filamentación y bacteriólisis.

Potara y colaboradores [55] sugirieron que el efecto antimicrobiano sinérgico de los compuestos CTS/AgNPs puede deberse a una combinación de diferentes mecanismos de acción de los dos componentes, o como una consecuencia de la modificación de la superficie química de las AgNPs, lo que ocasiona un cambio en sus propiedades biológicas al ser recubiertas por el biopolímero, por lo que ellos proponen dos posibilidades: (i) que el recubrimiento de la superficie de las AgNPs con CTS conlleva a la estabilización disminuyendo el potencial de agregación, lo que a su vez incrementa la concentración efectiva de nanopartículas capaces de interactuar con la superficie celular; y (ii) que la carga positiva conferida a las nanopartículas por el CTS aumenta su capacidad de ligarse con superficies negativas presentes en la superficie celular.

7.7.2- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE COMPUESTOS CTS/AuNPs.

En la Tabla 5 se muestra que las concentraciones en % peso de CTS y de la solución de HAuCl₄, en % peso (respecto al peso del quitosano) que fueron la utilizadas para la evaluación de la actividad antimicrobiana.

Tabla 5.- Halos de inhibición para compuestos CTS/AuNPs y Quitosano 2% peso.

Solución \ Cepas	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
CTS 1.5/Au 0.45	1.5mm	0.5mm	1.5mm
CTS 2/Au 1.5	1mm	0.5mm	1mm
CTS 1/Au 1	1mm	0.5mm	1mm
CTS 1/Au 0.7	1.5mm	0.5mm	2mm

En la Figura 30 se aprecia que para el caso de los compuestos CTS/AuNPs los halos obtenidos fueron de 1-2mm, pero en este caso la actividad observada no fue bactericida, sino bacteriostática.

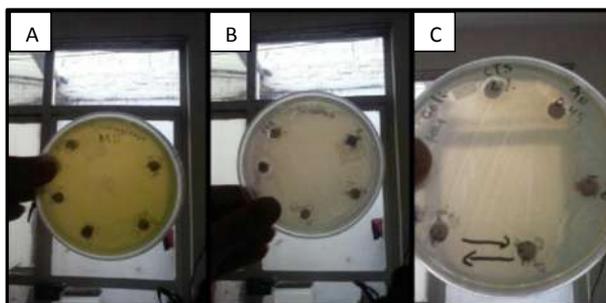


Figura 30.- Prueba de susceptibilidad a compuestos CTS/AgNPs A: *Pseudomona aeruginosa*, B: *Staphylococcus aureus* y C: *Escherichia coli*

Algunas hipótesis indican que el mecanismo de toxicidad del quitosano contra bacterias Gram negativas y Gram positivas depende de la interacción de sus grupos aniónicos en la superficie celular provocando un aumento de permeabilidad de la membrana, seguido de sus alteraciones y una subsecuente fuga de las proteínas celulares[93]. Es razonable afirmar que la unión de las NPs a las bacterias depende del área de superficie de contacto disponible para su interacción. Las partículas más pequeñas, al tener mayor superficie disponible para la interacción, ejercerán un efecto bactericida mayor en comparación con aquellas más grandes [7].

De acuerdo a los resultados obtenidos en UV-Vis y SEM, se observa que los diámetros de las AuNPs producidas en este trabajo son relativamente grandes (95-116 nm), lo cual influye fuertemente en la actividad antimicrobiana de los compuestos CTS/AuNPs. En general se observa una menor efectividad para *Pseudomona aeruginosa*. Sin embargo, estudios en animales muestran que los compuestos CTS/AuNPs tienen un mejor desempeño que el CTS puro en la reparación de heridas y en hemostasis [85]. De acuerdo a los autores, estos efectos pueden deberse a que la presencia de AuNPs proporciona un mayor número de enlaces por puentes de hidrógeno y una mayor retención de agua.

Se ha demostrado que la adición de AgNPs y AuNPs al CTS, además mejorar sus propiedades mecánicas [85], aumenta su temperatura de degradación y conductividad [84]

8.- CONCLUSIONES

Se sintetizaron AgNPs y AuNPs empleando tres diferentes fuentes de energía para inducir la reducción química de las sales precursoras, utilizando al CTS como agente reductor, estabilizante y dispersante.

El efecto más significativo del empleo de las diferentes fuentes de energía se observó en la cantidad y tamaño de nanopartículas sintetizadas, siendo la técnica por exposición a la radiación UV solar la más efectiva, ya que los cambios observados en la caracterización UV-Vis y FESEM muestran que se obtienen nanopartículas esféricas de menor diámetro lo que es más favorable por tener mayor área superficial y una actividad antimicrobiana mayor. Aunado al hecho de que este mecanismo de síntesis es efectivo, fácil, rápido y amigable con el medio ambiente.

En la síntesis de nanofibras compuestas CTS/AgNPs, el quitosano actúa como soporte de las nanopartículas y éstas se mantienen homogéneamente distribuidas a lo largo de las nanofibras aun después del procesamiento de las soluciones mediante electrospinning. Las nanofibras obtenidas son de buena calidad sin la presencia de defectos y con diámetros promedio de 612 nm. De acuerdo al análisis mediante FESEM, el proceso de electrospinning no modifica de forma considerable el tamaño de las AgNPs generadas en la solución polimérica ya que en películas su diámetro es de 114 nm mientras que en las nanofibras es de 112 nm.

La reducción en soluciones de CTS de la sal precursora para la síntesis de AuNPs produce nanopartículas con diámetros promedio de 116 nm y 95 nm por reducción mediante radiación solar y en parrilla con agitación magnética respectivamente, esto fue posible determinarlo por medio de imágenes FESEM de películas delgadas concordando con los resultados obtenidos en los espectros UV-Vis. Mediante el procesamiento de las soluciones CTS/AuNPs por el proceso de electrospinning se obtuvieron nanofibras compuestas CTS/AuNPs homogéneas, de buena calidad y con diámetros promedio de 400 nm sin embargo en este caso no fue posible determinar el tamaño promedio de las AuNPs debido a que éstas se encuentran inmersas en la fibra lo que dificulta su medición.

Se demostró que los compuestos CTS/AgNPs poseen actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa* comparable con resultados previamente reportados para *E. coli* y superiores a aquellos reportados contra *S. aureus*. Mientras que los compuestos CTS/AuNPs mostraron actividad bacteriostática contra las bacterias probadas.

9.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- S. Martínez, T. Serrano, I. Gómez, A. Hernández, Síntesis y caracterización de nanopartículas de CdS obtenidas por microondas, *Boletín de la sociedad española de Cerámica y Vidrio*, 46, 97-101, **2007**.
- 2.- S. Santibáñez, Síntesis de nanopartículas plata-sílice a través de un método organometálico, trabajo fin de estudios para obtener el título de Máster en Química Avanzada, Universidad de la Rioja, 3-10, **2012**.
- 3.- A. Pérez, El Rol de Naturaleza Química del Polímero Empleado como Agente Reductor en la Síntesis de Nanopartículas Metálicas, 1er. Seminario de avances, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas Maestría en Ciencias Químicas, 2-3, **2015**.
- 4.- P. Schifani, C. Barbero, H. J. Salavagione, G. M. Morales, Síntesis de Nanopartículas Metálicas Soportadas sobre Nanotubos de Carbono Solubles, 2 do Encuentro de Jóvenes Investigadores en Ciencia y Tecnología de Materiales – Posadas – Misiones, Asociación Argentina de Materiales, 1-7, **2008**.
- 5.- Porras, M., Madrigal S. y Vega, J., Síntesis de Nanopartículas Poliméricas de Quitosano Funcionalizadas con extractos de la mora (*Rubus glaucus*) y su Evaluación preliminar como agentes antimicrobianos, *Revista Científica*, 22, 1-20, **2012**.
- 6.- M. Camacho, J. Vega, A. Campos, Uso de nanomateriales en polímeros para la obtención de bioempaques en aplicaciones alimentarias, *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 77, 292-306, **2011**.
- 7.- A. Pérez, Síntesis Verde de Nanopartículas Metálicas en Solución Polimérica para la Producción de Nanofibras por Electrospinning, Tesis para obtener el título de Química Farmacobióloga, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Químico Farmacobiología, 24-29, **2013**.
- 8.- M. Olvera, J.R. Aguilar, T. Kryshtab, Procesamiento de micro y nanofibras de polipirrol/óxido de polietileno/nylon-6 por la técnica de electrohilado, *Ingeniería Investigación y Tecnología*, 14, 575-581, **2013**.
- 9.- J. Villanueva, Síntesis de nanopartículas de oro y plata y estudio de su deposición sobre nanoestructuras de base sílicea, Trabajo fin de estudios: Máster

en Química Avanzada Facultad de Ciencias, Estudios Agroalimentarios e Informática de la Universidad de la Rioja, 1-9, **2012**.

10.- C.E. Gutiérrez, Las Nanopartículas: pequeñas estructuras con gran potencial ¿Por qué el interés en estos materiales? ¿Qué aplicaciones tiene? revista contacto nuclear, 24-29, **2012**.

11.- A. Ledo, 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 Facultad de Química, 26-42, **2011**.

12.- A. Hernando, Nanotecnología y Nanopartículas Magnéticas: La Física Actual en Lucha Contra la Enfermedad, Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales101, 321-327, **2007**.

13.- S. Domínguez, Síntesis de Nanopartículas Metálicas y de Zeolitas para Catálisis y Separación de Gases, Tesis Doctorales Universidad de ALICANTE, 7-27, **2011**.

14.- M.G. Ponce, Síntesis y caracterización de nanopartículas de Ni y NiMo en medio acuoso, Tesis para obtener el grado de Maestro en Tecnología Avanzada Instituto Politécnico Nacional Centro de Investigaciones en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada, 1-15, **2011**.

15.- A. Ávalos, Haza, AI, Mateo, D y Morales P., Nanopartículas de Plata. Aplicaciones y Riesgos Tóxicos para la Salud Humana y el Medio Ambiente, Revista Complutense de Ciencias Veterinarias, 1, 1-23, **2013**.

16.- J.M. Castignino, Nanobiotecnología Nanomedicina y Teranóstica, *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 47,635-7, **2013**.

17.- D.X. Xiang, Q. Chen, L. Pang, C.L Zheng, Inhibitory effects of silver nanoparticles on H1N1 influenza A virus in vitro, *Journal of Virological Methods*,137–142, **2011**.

18.- H.J Klasen, A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver, *Burns* 26,131-8, **2000**.

19.- C.N Lok, C.M. Ho, R. Chen, Q.Y. He, W.Y. Yu, H.Z. Sun, P.K.H. Tam, J.F. Chiu and C.M. Che, Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles, *Journal of Proteome Research*, 5, 916-24, **2006**.

- 20.-** R. Zanella, Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño, *Revista Mundo Nano*, 5, 69-81, **2012**.
- 21.-** C.O. Meléndez, A.A. Camacho, Química Verde, la química del nuevo milenio, *Synthesis*, 45, 1-5, **2008**.
- 22.-** E.G Gioria, L.B. Gutierrez, Síntesis Verde de Nanopartículas de Plata en un Microreactor Continuo: Optimización de Parámetros, XXI Jornadas de Jóvenes Investigadores de AUGM “Ciencia para el Desarrollo de los Pueblos”. UNNE, Corrientes, 1, **2013**.
- 23.-** L. Cardeño, M.E. Londoño, Síntesis verde de nanopartículas de plata mediante el uso del ajo (*Allium Sativum*), *Revista Soluciones de Posgrado EIA*, 12, 129-140, **2014**.
- 24.-** P. Salinas, E.M. Sánchez, La química verde en la síntesis de nanoestructuras, *Ingenierías*, 54, 7-16, **2012**.
- 25.-** R. Nidhija, G. Archana, J. Aditi, B. Susinjan, R. Vibha, Green synthesis of silver nanoparticles: An approach to overcome toxicity, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36, 807-812, **2013**.
- 26.-** G. Corthey, Estudio de Interfases Metal-Tiol en Superficies Planas y Nanopartículas, Trabajo de Tesis Doctoral, Universidad Nacional de la Plata Facultad de Ciencias Exactas Departamento de Química, 77, **2012**.
- 27.-** A.I. Pérez, Uso de la Dispersion de Hiper Rayleigh para el Estudio y Caracterización de Nanopartículas de Oro, Trabajo Especial de Grado presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela para optar al título de LICENCIADO EN QUIMICA, 30-31, **2010**.
- 28.-** S.M. Rodríguez, Obtención de Nanopartículas y Nanoordenamientos Metálicos Empleando la Química de los Compuestos de Inclusión, Tesis Presentada a la Universidad de Chile para optar por el grado de Doctor en Química, 20-25, **2007**.
- 29.-** P. Riente, Nanopartículas de níquel: formación de enlaces carbono-carbono y transferencia de hidrógeno, Tesis para obtener el grado de Doctor Universidad de Alicante, 19-39, **2009**.

- 30.-** M. Ramos y C. Castillo, Aplicaciones biomédicas de las nanopartículas magnéticas, *Revista Ide@s CONCYTEG* 6, 629-246, **2011**.
- 31.-** M. C. Rodríguez, C. Sieiro, R. Cao, L. Nasi, Chitosan and silver nanoparticles as pudding with raisins with antimicrobial properties, *Journal of Colloid and Interface Science*, 364, 80–84, **2011**.
- 32.-** B. Raimond, Seymour y E. Charles, Carraher, Introducción a la química de los polímeros, Editorial Reverte, 1, **1995**.
- 33.-** B. Ramos, Anexo B: Generalidades Sobre Polímeros, Introducción a los polímeros, <https://upcommons.upc.edu/pfc/bitstream/2099.1/4536/3/Anexo%20%20B.pdf>, 21-22, consultado 16:30 del 20 de Enero del 2014, **2007**.
- 34.-** R. Expósito, Quitosanto, un biopolímero con aplicaciones en sistemas de liberación controlada de fármacos, Memoria para optar al grado de doctor presentada, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Biológicas Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, I, 15-22, **2010**.
- 35.-** O. Cartaya, C. Peniche, I. Reynaldo, Polímeros naturales recolectores de iones metálicos, *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 10, 81-94, **2009**.
- 36.-** A.B. Leonardi, L. Reven, Compuestos de polímeros-nanopartículas de oro: estudio por resonancia magnética nuclear en estado sólido, XXIX Congreso Argentino de Química, 1, **2012**.
- 37.-** A. Estrada, J.R. Herrera, Síntesis de materiales a base de uretanos reforzados con nanopartículas metálicas. i. síntesis y caracterización, *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 14, 28-38, **2013**.
- 38.-** E. Castro, P. Taboada, V. Mosquera, Polimerosomas de poli (butadieno) - bloque-poli (óxido de etileno) cargados con nanopartículas de oro, *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 13, 10-139, **2012**.
- 39.-** F. Soriano, G. Morales, P. Acuña, Incorporación de nanopartículas de plata en poliestireno de alto impacto: efecto sobre la cinética de polimerización y la estructura morfológica, *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 12, 116-124, **2011**.
- 40.-** A. Gautam, S. Ram, Preparation and thermomechanical properties of Ag-PVA nanocomposite films, *Materials Chemistry and Physics*, 119, 266-271, **2010**.

- 41.-** R. Alvarado, F. Solera, J. Vega, Síntesis sonoquímica de nanopartículas de óxido de cinc y de plata estabilizadas con quitosano, evaluación de su actividad antimicrobiana, *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 15, 134-148, **2014**.
- 42.-** M.Á. López, Obtención y caracterización de quitosanos modificados: ingredientes funcionales con aplicaciones tecnológicas y biológicas en la industria alimentaria. Memoria para optar al grado de doctor, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria, Departamento de nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, 9-21, **2012**.
- 43.-** S. Bautista- Baños, A. N. Hernández-Lauzardo, M.G. Velázquez, E. Bosquez y D. Sánchez, Quitosano: una alternativa natural para reducir microorganismos postcosecha y mantener la vida de anaquel de productos hortofrutícolas, *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 7, 1-6, **2005**.
- 44.-** C. Lárez, Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos, *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 4, 91-109, **2003**.
- 45.-** F.M. Goycoolea, C. Remuñán, M.J. Alonso, Nanopartículas a base de polisacáridos: quitosano, *Real Academia Nacional de Farmacia* 11, 103-131, 2010.
- 46.-** S. Rucareanu, M. Maccarini, J. L. Shepherd, R. Bruce Lennox, Polymer-capped gold nanoparticles by ligand-exchange, *Journal of Materials Chemistry*, 18, 5830, **2008**.
- 47.-** T. Niidome, M. Yamagata, Y. Okamoto, PEG-modified gold nanorods with a stealth character for in vivo applications, *Journal of Controlled Release*, 114, 343–347, **2006**.
- 48.-** M.J. Hortigüela, Estructuras tridimensionales porosas de mwcnts con aplicaciones en biomedicina y en biotecnología, Memoria para optar al grado de Doctor en Química, Grupo de Materiales Bioinspirados (ICMM-CSIC) Departamento de Química (UBU) Burgos, **2009**.
- 49.-** J.G Bárcenas, Laboratorio A12. Polímeros y Biomateriales, Cinvestav Querétaro,
http://www.qro.cinvestav.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=236&Itemid=253 consultado 15:30 del 25 de Enero del **2015**.
- 50.-** G. Zhang, X. Sun, J. Jasinski, D. Patel, y A.M. Gobin, Gold/Chitosan Nanocomposites with Specific Near Infrared Absorption for Photothermal Therapy Applications, *Journal of Nanomaterials*, 1-9, **2012**.

- 51.-** K.I. Raquejo, Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro con quitosana como agente reductor y estabilizador, *Revista de Química PUCP*, 28, 40-41, **2014**.
- 52.-** Y. Jin, Z. Li, L. Hua, X. Shia, W. Guanb, Y. Dua, Synthesis of chitosan-stabilized gold nanoparticles by atmospheric plasma, *Carbohydrate Polymers*, 91, 152– 156, **2013**.
- 53.-** J.B. González, R.E. del Río, Compuestos de quitosano/nanopartículas de Ag: conductividad y mecanismos de relajación y su relación con sus propiedades macroscópicas, *Superficies y Vacío*, 25, 43-48, **2012**.
- 54.-** Z. Modrzejewska, R. Zarzycki, J. Sielski, Synthesis of silver nanoparticles in a chitosan solution, *Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its*, 15, 63-72, **2010**.
- 55.-** M. Potara, E. Jakab, A. Damert, O. Popescu, V. Canpean and S. Astilean, Synergistic antibacterial activity of chitosan–silver nanocomposites on *Staphylococcus aureus*, *Nanotechnology*, 22, 9, **2011**.
- 56.-** N. Saifuddin, C. Y. Nian, L. W. Zhan and K. X. Ning, Chitosan-Silver Nanoparticles Composite as Point- of- use Drinking Water Filtration System for Household to Remover Pesticides inWater, *Asian Journal of Biochemistry*, 6, 142-159, **2011**.
- 57.-** N. Durán, P.D. Marcato, R. De Conti, O.L. Alves, Fabio T. M. Costa and M. Brocchi, Potential Use of Silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21, 949-959, **2010**.
- 58.-** R.J.B. Pinto, S.C.M. Fernandes, C.S.R. Freire, P. Sadocco, J. Causio, C. Pascoal, T. Trindade, Antibacterial activity of optically transparent nanocomposite films based on chitosan or its derivatives and silver nanoparticles, *Carbohydrate Research*, 348, 77–83, **2012**.
- 59.-** P.C. Caracciolo, P.R. Cortez, F. Bufa, F. Montini, T.R. Cuadrado y G.A. Abraham, Pequeñas fibras, grandes aplicaciones, *Ciencia Hoy*, 20, 57-64, **2011**.
- 60.-** L.M. Duque, L. Rodriguez, M. López, Electrospinning: la era de las nanofibras, *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 14, 10-27, **2013**.

- 61.-** J.A. Juanico, Síntesis y Caracterización de nanofibras de Carbono para su Aplicación en la Adsorción de Gases Tóxicos, Informe final de la idónea comunicación de resultados del proyecto de investigación, Universidad Autónoma Metropolitana División de Ciencias Básicas e Ingeniería, Coordinación de Estudios de Posgrado, 35-40, **2004**.
- 62.-** P. C. Caracciolo, F. A. Buffa y G. A. Abraham, Matrices poliuretánicas nanofibrosas obtenidas por el proceso de electrospinning, 2^{do} Encuentro de Jóvenes Investigadores en Ciencia y Tecnología de Materiales-Posadas-Misiones, Asociación Argentina de Materiales, 1-6, **2008**.
- 63.-** J.M. Calderón, H.A. Martínez, Obtención de fibras poliméricas a partir de la técnica de “electrospinning” para aplicaciones biomédicas, Proyecto de Grado para optar por el título de Ingeniero Biomédico, Universidad Autónoma de Occidente Facultad de Ingeniería, Departamento de Automática y Electrónica, Programa de Ingeniería Biomédica, Santiago de Cali, 20-40, **2012**.
- 64.-** E. Huamani, Síntesis y caracterización de nano y microfibras de pva/plata fabricados por la técnica de electrospinning para la descontaminación de agua, Tesis para optar el grado académico de Maestro en Ciencias con Mención en Energía Nuclear, Universidad Nacional de Ingeniería Facultad de Ciencias, 33, **2011**.
- 65.-** W. Gamboa, O. Mantilla, V. Castillo, Producción de micro y nano fibras a partir de la técnica “electrospinning” para aplicaciones farmacológicas, VII Congreso de la Sociedad Cubana de Bioingeniería, 1-4, **2007**.
- 66.-** P. Martínez, P. Marín, Diseño y estudio de una máquina de Electrospinning, Tesis de Maestría, Univesidad Politécnica de Catalunya. Departamento de Ingeniería Química, 15, **2009**.
- 67.-** S. Torre, M.J. Ocio, J.M. Lagaron, Novel antimicrobial ultrathin structures of zein/chitosan blends obtained by electrospinning, *Carbohydrate Polymers*, 77, 261-266, **2009**.
- 68.-** A.P. Martínez, M.O. Cortez, M.M. Castillo, A. Burgos, J.M. Ezquerra y M Plascencia, Antimicrobial activity of chitosan nanofibers obtained by electrospinning, *Polymer International*, 60, 1663-1669, **2011**.

- 69.-** X. Lu, L. Li, W. Zhang and C. Wang, Preparation and characterization of Ag₂S nanoparticles embedded in polymer fibre matrices by electrospinning, *Nanotechnology*, 16, 2233–2237, **2005**.
- 70.-** R. Gopalakrishnan, K. Balamurugan, E. Ramaprasad A. Singam, S. Sundaraman and V. Subramanian, Adsorption of collagen onto single walled carbon nanotubes: a molecular dynamics investigation, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 13046-13057, **2011**.
- 71.-** Gopalakrishnan, R, Interaction of Collagen with Carbon Nanotube: A Molecular Dynamics Investigation, *Subramanian*, 7, 186-187, **2011**.
- 72.-** T. Yang, H. Yang, S. J. Zhen, C. Z. Huang, Hydrogen-bond-mediated *in situ* fabrication of AgNPs/agar/PAN electrospun nanofibers as reproducible SERS substrates, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7, 1586-1594, **2015**.
- 73.-** A.M. Abdelgawad, S.M. Hudson, O.J. Rojas, Antimicrobial wound dressing nanofiber mats from multicomponent(chitosan/silver-NPs/polyvinyl alcohol) systems, *Carbohydrate Polymers*, 100, 166– 178, **2014**.
- 74.-** S. Jin, D. Nyoung, J.H. Moona, W.K. Koa, J.B. Leea, M. Soo, S. Woong, J. Eun, D. Hyun, E.C. Kimc, C.H Leed, Il K. Kwona, Electrospun chitosan nanofibers with controlled levels of silvernanoparticles, Preparation, characterization and antibacterial activity, *Carbohydrate Polymers*, 111, 530–537, **2014**.
- 75.-** Templeton A.C., J.J. Pietron, R.W. Murray, P. Mulvaney, Solvent Refractive Index and Core Charge Influences on the Surface Plasmon Absorbance of Alkanethiolate Monolayer-Protected Gold, *Journal of Physical Chemistry*, 104, 564-570, **2000**.
- 76.-** J.J Infante, V. Campos, C.A Guerrero, S. Sepúlveda, Bionanocompósitos de carragenina κ con nanopartículas metálicas, *Ingenierías*, 15, 66-73, **2012**.
- 77.-** Á.B. Sifontes, L. Melo, C. Maza, J.J. Mendes y M. Mediavilla, Preparación de nanopartículas de plata en ausencia de polimeros estabilizantes, *Química Nova*, 33, 1266-1269, **2010**.
- 78.-** K.L. Kelly, E. Coronado, L.L. Zhao, G.C. Schatz, The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape and dielectric environment, *Journal of Physical Chemistry*, 107, 668-677, **2003**.

- 79.-** J. Cheng, J. Wang, X. Zhang, Y. Jin, Microwave-assisted green synthesis of silver nanoparticles by carboxymethyl cellulose sodium and silver nitrate, *Materials Chemistry and Physics*, 108, 421-440, **2008**.
- 80.- X. Tian, W. Wang, G. Cao, a facile aqueous-phase route for the synthesis of silver nanoplates, *Materials Letters*, 61, 130-133, **2007**.
- 81.-** A. Slistan, R. Herrera, J.F. Rivas, M. Ávalos, F.F. Castellón, A. Posada Synthesis of silver nanoparticles in a polyvinylpyrrolidone (PVP) paste, and their optical properties in a film and in ethylene glycol, , *Mater. Res. Bull.*, 43, 90-96. **2008**.
- 82.-** MA. Ayadi, W. Abdelmaksoud, M. Ennouri, H. Attia, Cladodes from opuntia ficus indica as a source of dietary fiber: effect on dough characteristics and cake making, *Industrial Crops and Products*, 30, 40-47, **2009**.
- 83.-** S. Gómez, M.I. Sierra, D. Pérez, Netbiblo, Análisis Instrumental, Volumen 1, netbiblo, 65-98, España, **2009**.
- 84.-** J.B. González-Campos, E. Prokhorov, G. Luna-Bárceñas, I.C. Sánchez, J. Lara-Romero, M.E. Mendoza-Duarte, F. Villaseñor, L. Guevara-Olvera. Chitisan/silver nanoparticles composite: molecular relaxations investigation by dynamic mechanical analysis and impedance spectroscopy. *Journal of Polymer Science: Part B: Polymers Physics*, 48, 739-748, **2010**.
- 85.-** S. Hsu, Y.B. Chang, C.L. Tsai, K.Y. Fu, S.H. Wang, H.J. Tseng, Characterization and biocompatibility of chitosan nanocomposites, *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, 85, 198-206, **2011**
- 86.-** Z. Xu, Y. Peng, Y. Wantai, C. Jinchun. The bio-inspired approach to controllable biomimetic synthesis of silver nanoparticles in organic matrix of chitosan and silver-binding peptide (NPSSLFRYLPSD), *Materials Science and Engineering:C*, 237-242, **2008**.
- 87.-** J.W. Cho, y J.H. So, Polyurethane–silver fibers prepared by infiltration and reduction of silver nitrate, *Materials Letters*, 60, 2653–2656, **2006**.
- 88.-** K. Sun, Z.H. Li. Preparations, properties and applications of chitosan based nanofibers fabricated by electrospinning, *eXPRESS Polymer Letters*, 5, 342-361, **2011**.

89.- Principios generales de la Microscopia Electrónica de Barrido (Scanning Electron Microscope, SEM), Laboratorio de Microscopía FE-SEM, Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid. Citado en: <http://www.icmm.csic.es/divulgacion/posters/TECMicroscopia%20Electronica%20de%20Barrido.pdf> a las 16:30, el 23 de Enero del 2015.

90.- Elmer W. Koneman, Stephen D. Allen, William M. Janda, Paul C. Schrecknberger, Washington C. Winn, Diagnóstico Microbiológico texto y atlas color, quinta edición, Editorial Medica Panamericana, 784, 785, 797, 2001.

91.- V. Thomas, M. M. Yallapu, B. Sreedhar, S. Bajpai. Fabrication, characterization of chitosan/nanosilver film and its potential antibacterial application, *Journal of Biomaterials Science*, 20, 2129-2144, **2009**.

92.- J. Díaz-Barriga, A. García, G. Cárdenas. Lethal effect of chitosan-Ag(I) films on *Staphylococcus aureus* as evaluated by electron microscopy, 108, 633-646, **2010**.

93.- J.A. Martínez, Caracterización fisicoquímica y evaluación de la actividad antibacteriana de películas de quitosano con nanopartículas de plata, tesis para obtener el Título de Químico Farmacobiólogo, Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo, Facultad de Químico Farmacobiología, **2012**.