Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO BIOLÓGICAS

"Síntesis y caracterización de un bionanocompuesto a base de quitosano/nanopartículas de Ag-afinina, con potencial actividad farmacológica"

TESIS

Que para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Presenta:

I.B.Q. Fernando Bedolla Cázares

Asesores:

Doctor en Química Mario Armando Gómez Hurtado

Doctora en Ciencias Janett Betzabe González Campos

MORELIA, MICHOACÁN ABRIL DE 2015

Dedico éste gran éxito alcanzado a

mis primeros maestros, mis amados padres:

Flora Cázares Yácuta

Cipriano Bedolla Zavala

Quienes me han educado en los cimientos del respeto, honestidad, honradez, perseverancia, trabajo duro y con su ejemplo de amor, esfuerzo y superación.

Porque éste triunfo les pertenece a ellos.

"La ciencia sirve para darnos una idea de cuán vasta es nuestra ignorancia"

Robert de Lamennais

"El mejor científico está abierto a la experiencia, y esta empieza con un romance, es decir, la idea de que todo es posible"

Ray Bradbury

El universo tiene un diseño, y también lo tiene una tesis.

Pero a diferencia del universo, una tesis no aparece de la nada. Una tesis requiere un creador, y ese papel no recae tan solo en los hombros de su autor.

Así, en primer lugar y antes de nada agradezco a Dios que me ha brindado el don de ciencia e inteligencia para cumplir exitosamente las metas que me he trazado.

Quiero expresar mi agradecimiento a mis padres: Flora Cázares-Yácuta y Cipriano Bedolla-Zavala; ejemplos dignos de superación y pilares fundamentales de mi formación espiritual y académica, quienes me han brindado en todo momento su amor, apoyo, compresión y confianza incondicionalmente, quienes me han impulsado a dar lo mejor de mí en cada etapa de mi vida. Es gracias a sus notables esfuerzos y sacrificios es que he podido llegar a ser un profesionista. No bastarían mis palabras para agradecerles lo que han hecho por mí.

Agradezco al Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por abrirme sus puertas y brindarme la oportunidad de superarme y formarme como un profesional de las Ciencias Químicas.

Agradezco a mis asesores: D.C. J. Betzabe Gonzales-Campos y D.Q. Mario A. Gómez-Hurtado quienes lucharon con el manuscrito, por su infinita paciencia y disposición por haber depositado en mí su entera confianza para que éste proyecto lo realizara y concluyera exitosamente.

También quiero expresar mi agradecimiento al Comité Tutoral conformado por: D. Q. Gabriela Rodríguez García, D.C. Rosa E. N. del Rio Torres y D.C. Manuel Arroyo Albiter, quienes amablemente apoyaron con la realización de este manuscrito e hicieron valiosos comentarios y cuya atención a los detalles me han librado de algunos errores que no nos hubieran gustado ver impresos; agradezco de manera especial a la D. Q. Gabriela quién se involucró activamente en el proceso de obtención y elucidación del complejo de coordinación.

De igual manera agradezco el apoyo brindado por el Dr. David Morales Morales de la UNAM para la obtención del espectro de masa del complejo metálico, a Concepción Armentas y José Manuel, en la obtención de los espectros de RMN y al Dr. Pablo Merinos en la obtención de los espectros de IR.

Agradezco el apoyo, paciencia, consejos y los ánimos que me ha brindado la Q.F.B. Angélica Escamilla Ramírez, gracias por compartir conmigo este tiempo y la experiencia de estar a tu lado. Te amo.

Agradezco no solo el apoyo moral, sino el técnico y práctico de mis compañeros QFB's de generación y del laboratorio, sin el cual no se hubieran obtenido estos buenos resultados.

Finalmente agradezco el apoyo económico otorgado para la realización de este proyecto por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), con matrícula CB2010/150767 y el apoyo del proyecto CIC 2.40: PROMEP UMSNH PTC-332.

Parte de los resultados obtenidos en el desarrollo del presente proyecto fueron presentados en los siguientes eventos:

- 8° Congreso Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación y 2do. Encuentro de Jóvenes Investigadores del Estado de Michoacán, 7 y 8 de noviembre de 2013, Morelia, Michoacán. México.

"*Estudio sobre la capacidad coordinante de una alcamida natural frente a sales de plata*".

- 10ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales, 21–24 de mayo de 2014, Mérida, Yucatán. México.

"Reactividad de la afinina como ligante frente a iones de plata".

- 9° Congreso Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación. Tercer Encuentro de Jóvenes Investigadores del Estado de Michoacán, 16 y 17 de octubre de 2014, Morelia, Michoacán. México.

"*Síntesis de un bionanocompuesto con potencial farmacológico*".

- 3rd US-Mexico Symposium on Advances in Polymer Science. XXX Congreso Nacional de la Sociedad Polimérica de México, 3–6 diciembre de 2014, Nuevo Vallarta, México.

"Synthesis of a Bionanocomposite with Pharmacological Potential"

Índice

Abreviaturas y símbolos……..V

Resumen……..……..……VII

Abstract……..…….....VIII

1. Introducción 1
2. Antecedentes..... 3
3. Justificación 17
4. Hipótesis..... 18
5. Objetivo General..... 18
6. Objetivos Particulares 18
7. Discusión de Resultados 19
   - 7.1. Obtención de la afinina 19
   - 7.2. Obtención y caracterización del complejo $[Ag_2\text{-}(afinina)](NO_3)_2$..... 24
   - 7.3. Generación de nanofibras por el método de “Electrohilado”. 31
   - 7.4. Generación y caracterización de nanofibras de PVA/CTS. 33
   - 7.5. Generación y caracterización de nanofibras de quitosano puro. 38
   - 7.6. Ensayos para la síntesis de AgNPs en soluciones de quitosano 47
   - 7.7 Síntesis y caracterización de AgNPs en solución de quitosano por el método de foto-reducción 50
   - 7.8 Generación de nanofibras con AgNPs provenientes de $AgNO_3$ y del complejo $[Ag_2\text{-}(afinina)](NO_3)_2$ 54
   - 7.9 Tratamiento alcalino para la neutralización del ATF presente en las nanofibras de quitosano 57
   - 7.10 Caracterización microscópica de biopelículas y nanofibras que contienen sal de $AgNO_3$ y complejo $[Ag_2\text{-}(afinina)](NO_3)_2$ 60
   - 7.11 Análisis preliminar de la actividad antimicrobiana de biopelículas y nanofibras . 83
8. Conclusiones 88
9. Parte experimental..... 90
10. Referencias bibliográficas 99

Abreviaturas y símbolos

δ	Desplazamiento químico (RMN), estiramiento de flexión (IR)
ν	Banda de estiramiento (IR)
°C	Grados Celsius
®	Marca registrada
Ac.	Ácido
ACN	Acetonitrilo
AcOH	Ácido acético
AcOEt	Acetato de Etilo
AgNPs	Nanopartículas de plata
ATF	Ácido trifluoroacético
BSE	Back-scattered electrons (Electrones Retrodispersados).
CTS	Quitosano
DL_{50}	Dosis Letal 50
DMSO	Dimetilsulfóxido
$DMSO_{-d6}$	Dimetilsulfóxido deuterado
EDX	Energy-dispersive X-ray spectroscopy (Espectroscopia de Energías dispersivas por rayos X)
ESI-MS	Electrospray Ionization Mass Spectrometry (Espectrometría de Masas por Ionización por Electrospray)
ESI	Electron Spectroscopy Imaging (Espectroscopia de Imágenes por electrones)
g	Gramos
Hex	Hexano
hv	Radiación solar
IR	Espectroscopia de Infrarrojo
kV	Kilovoltios
m/z	Relación masa/carga

M	Molaridad
mM	miliMolar
MEB-EC	Microscopia Electrónica de Barrido por Emisión de Campo
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
MHz	Megahertz
mL	Mililitros
ppm	Partes por millón
PVA	Alcohol polivinílico
RMN de ^{13}C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono
RMN de ^{1}H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrogeno
rpm	Revoluciones por minuto
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Tetrametilsilano
UV-Vis	Espectroscopia de Ultravioleta-Visible

Resumen

El presente trabajo describe la obtención de un bionanocompuesto en forma de nanofibras el cual está constituido por tres componentes: la afinina, producto mayoritario obtenido de la plata Chilcuague o “raíz de oro”, que posee importante actividad biológica como agente analgésico, antimicrobiano y antiinflamatorio; nanopartículas de plata (AgNPs), obtenidas mediante foto-reducción de un complejo de coordinación formado entre la afinina y $AgNO_3$; y quitosano (CTS), un biopolímero biodegradable y biocompatible que presenta una importante actividad antimicrobiana y que actúa como agente reductor, dispersante y estabilizante en la síntesis de las AgNPs.

El compuesto CTS/afinina-AgNPs se caracterizó en forma de películas delgadas, y nanofibras obtenidas mediante el proceso electrospinning. Los resultados de su caracterización fueron comparados con los de los compuestos CTS-AgNPs, CTS-afinina y CTS/afinina+AgNPs. Mediante Microscopía Electrónica de Barrido por Emisión de Campo se analizó la morfología y calidad de las nanofibras obtenidas así como la distribución de las AgNPs y el complejo fotoreducido a lo largo de la matriz. El compuesto CTS/afinina-AgNPs mostró una mejor calidad de nanofibras, y se demuestra que con el complejo se favorece la distribución homogénea de la afinina a lo largo de las nanofibras de CTS.

El bionanocompuesto propuesto mostró una actividad antimicrobiana superior respecto de las combinaciones probadas y se evidencia que la presencia de la afinina potencia la actividad antimicrobiana del CTS y las AgNPs. Finalmente las nanofibras poliméricas se sometieron a un tratamiento alcalino para eliminar el disolvente empleado en su generación. Este tratamiento no elimina ninguno de sus componentes, pero modifican considerablemente su estructura, sin embargo, no se descarta la posibilidad de probar la eficacia del bionanocompuesto sintetizado.

Palabras clave: afinina, complejo metálico, nanofibras, nanopartículas, quitosano.

Abstract

The present work describes the synthesis of a three component-bionanocomposite in the form of nanofibers which is comprised of: affinin, the major product obtained from Chilcuague or "golden root," which evokes important biological activities as an analgesic, antimicrobial and anti-inflammatory agent; silver nanoparticles (AgNPs) obtained by photo-reduction of a coordination complex between affinin and $AgNO_3$; and chitosan (CTS), a biodegradable and biocompatible biopolymer which has a significant antimicrobial activity and is used as a reducing, dispersant and stabilizing agent in the synthesis of AgNPs.

CTS/affinin-AgNPs composite was characterized in the form of thin films and nanofibers obtained through electrospinning process. The characterization results were compared with those of CTS-AgNPs, CTS-affinin and CTS/affinin+AgNPs composites. By means of Field Emission Scanning Electron Microscopy the nanofibers morphology and quality as well as the AgNPs and the photo-reduced complex distribution along the matrix were analyzed. CTS/affinin-AgNPs composite showed better nanofibers quality and it was observed that the complex improves the affinin homogeneous distribution along CTS nanofibers.

The proposed bionanocomposite showed an enhanced antibacterial activity compared with all the analyzed combinations, and the evidence of the potentiated antibacterial activity because of the affinin incorporation to CTS and AgNPs is presented. Finally, the polymer nanofibers were alkaline treated to eliminate any possible residual solvent used in their synthesis. This treatment do not eliminate any of the three components of the composite, but it modifies significantly its structure, however, the possibility to test efficacy of the synthetized bionanocomposite is not discarded.

Keywords: affinin, metal complex, nanofibers, nanoparticles, chitosan.

1. Introducción

Los bionanocompuestos base biopolímeros son materiales híbridos que consisten en una matriz biopolimérica y que pueden contener un refuerzo a base de fibras o partículas de dimensiones nanométricas, o bien que el material compuesto en sí esté presente como fibras o partículas de tamaño nanométrico; estos materiales compuestos presentan cualidades benéficas que los enfocan a realizar una función específica; sus propiedades no solo dependen de sus constituyentes individuales, sino también de su morfología y características interfaciales. Actualmente, las técnicas avanzadas para la síntesis de nanocompuestos han mostrado su eficacia para ensamblar estructuras de diferente naturaleza, con las que se pretenden obtener mejores resultados en comparación al uso individual de cada componente (Muraviev *et al*., 2006).

Uno de los biopolímeros más ampliamente utilizado como matriz en la generación de bionanocompuestos de este tipo es el quitosano (CTS), un polímero natural obtenido de la hidrólisis de la quitina en solución alcalina que presenta un potencial e interesante valor económico, debido a sus versátiles actividades biológicas y aplicaciones químicas (Gagne-*Simpson*, 1993; Brine-Austin, 1981).

El CTS ha sido combinado con diversos compuestos de diferente naturaleza; ha sido empleado como matriz en la síntesis de nanopartículas metálicas para la producción de bionanocompuestos con propiedades farmacológicas potenciadas (Liu *et al*., 2008; Zhou *et al*., 2008; An *et al*., 2009; Son *et al*., 2009). Asimismo, se ha combinado con extractos de productos naturales como cebolla, ajo, papaya y jengibre (Cao *et al.,* 2013) para su evaluación antimicrobiana, obteniendo resultados altamente eficaces. También se ha empleado en forma de nanopartículas cargadas con extractos etanólicos de *Ziziphus mauritiana* con la finalidad de mejorar sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas brindando estabilidad en el tracto gastrointestinal (Bhatia *et al.*, 2011).

Dentro de la gran variedad de productos naturales atractivos para la síntesis de materiales compuestos, destaca *Heliopsis longipes,* comúnmente conocido como “Chilcuague” o “raíz de oro” en la región de la Sierra Gorda del norte de Guanajuato. En medicina tradicional se emplea para calmar dolores musculares y de muelas, así como desparasitante e insecticida. La afinina es el principal componente de esta planta y se acumula en las raíces y semillas, presenta una actividad biológica importante como poderoso anestésico bucal (Molina *et al*., 2001), analgésico (Cilia, 2008), fungicida (Ramírez *et al*., 2000; Salgado *et al*., 2008), antipalúdico (Waizel *et al.,* 2011), insecticida (Hernández *et al*., 2012), antiinflamatorio (Hernández *et al.*, 2009) y crioprotector de tejido vegetal (Hernández, 2009). Por lo que resulta de gran interés para su combinación con CTS. Es importante mencionar que aun cuando el CTS ha sido combinado con diferentes extractos de productos naturales, hasta la fecha, no se han encontrado reportes de su combinación con afinina. De igual forma, las nanopartículas metálicas han recibido especial atención, especialmente las de oro y plata debido a sus propiedades y aplicaciones importantes como agentes antimicrobianos, en la catálisis, en la óptica, y como sensores (Zeng *et al*., 2007).

Por todo lo anterior, resulta de gran interés combinar las propiedades individuales de cada una de los componentes para obtener un material compuesto con propiedades mejoradas y potenciadas, por lo que el presente trabajo de investigación propone la síntesis de nanofibras compuestas con potencial aplicación farmacológica. Este bionanocompuesto generado por medio del proceso de electrohilado, está integrado por CTS y afinina-nanopartículas de plata (AgNPs) obtenidas por foto-reducción a partir de un complejo de afinina-$AgNO_3$; se obtuvo evidencia de la formación de este complejo por medio de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Espectrometría de Masa, Espectroscopia de Infrarrojo (IR) y UV-Vis y Microscopía Electrónica de Barrido por Emisión de Campo (MEB-EC).

2. Antecedentes

La búsqueda continua de materiales mejorados a menudo incluye combinaciones de varios componentes naturales y/o sintéticos de diferente naturaleza: polímeros naturales y sintéticos, metales y materiales orgánicos, los cuales pueden ofrecer una serie de propiedades específicas que los hacen atractivos para aplicaciones en distintos campos de la ciencia.

La nanotecnología es el campo de la ciencia que se encarga de la fabricación y manipulación de estructuras con escala nanométrica. Las estructuras a nano escala muestran una alta proporción de superficie-volumen, lo que es ideal para aplicaciones que involucran materiales compuestos, reacciones químicas, transporte de fármacos, liberación controlada de sustancias en tecnologías de envase activo, entre otras.

Los compósitos o nanocompuestos son aquellos materiales que combinan dos o más componentes o fases distintas, donde una o más de una de las fases discontinuas (refuerzos) se dispersan en otra fase continua (matriz). Los refuerzos a nanoescala tienen la ventaja de aumentar las interacciones con la matriz debido a su alta área interfacial, lo que se traduce en una mejora en las propiedades del compósito. Debido a las dimensiones a nanoescala de los refuerzos, se espera que los defectos sean pequeños, disminuyendo los errores en los materiales compuestos (Siró-Plackett, 2010). Las ventajas de estos materiales cuando se comparan con los compuestos convencionales son sus propiedades térmicas, mecánicas y de barrera superiores (Sorrentino *et al*., 2007).

Estos nanocompuestos promueven nuevas aplicaciones en muchos campos, como componentes ligeros reforzados mecánicamente, óptica no lineal,

cátodos de baterías, nano-cables, sensores y otros sistemas (Muraviev *et al*., 2006).

El rápido crecimiento en la investigación de los nanocompuestos con base orgánica/inorgánica (bionanocompuestos) promueve la generación de materiales con propiedades nuevas y mejoradas en comparación con sus homólogos macro compuestos. Dentro de los bionanocompuestos se encuentran aquellos de base polimérica, o biopolímeros, cuyas aplicaciones van dirigidas hacia la sostenibilidad, ecoeficiencia, ecología industrial y a la naturaleza renovable. La justificación de su uso se basa principalmente en sus propiedades intrínsecas; son recursos renovables (Kaplan, 1998), pero algunos también exhiben actividad antibacteriana, biodegradabilidad y biocompatibilidad (Rinaudo, 2006). Dentro de la variedad de polímeros funcionales destacan los hidrogeles, las biopelículas y las nanofibras.

Los hidrogeles a base de polímeros naturales, son compuestos superabsorbentes que han sido muy utilizados en los últimos años debido a ventajas únicas. En general, los polisacáridos son inocuos, abundantes y biocompatibles. Sin embargo, como se disuelven total o parcialmente en agua, no pueden formar hidrogeles estables (Soto, 2012).

Las biopelículas, están formadas por biopolímeros de alto peso molecular que proporcionan una gran fuerza de cohesión. El grado de cohesión de la matriz del biopolímero afecta propiedades tales como la densidad, compacidad, porosidad, permeabilidad, flexibilidad y fragilidad. Casi todos los biopolímeros naturales pueden ser utilizados para la preparación de películas que pueden ser utilizadas para cubrir los productos alimenticios (Camacho *et al*., 2011). Con el fin de potenciar las propiedades bactericidas de las biopelículas, estas se enriquecen con sustancias que muestran una atractiva actividad biológica. La

acción selectiva de dichas películas consiste en la liberación de una sustancia activa apropiada que afecta a los microorganismos (López-Rubio *et al.,* 2006).

La nisina ha presentado satisfactorios efectos bactericidas cuando se aplica en películas basadas en proteínas de suero de leche, zeína, trigo y soja (Ko *et al.*, 2001; Hoffman *et al.*, 2001). De igual manera con la pediocina que se introdujo en películas de celulosa, y con la lisozima que es una proteína de origen animal que induce la hidrólisis del peptidoglicano el cual constituye la pared celular de las bacterias Gram-positivas (Fuglsang *et al*., 1995).

Las nanofibras (Figura 1) por su parte, son materiales versátiles debido a su capacidad de formar tejidos o encapsulados, que *a posteriori* podrían recubrir otras sustancias químicas; o preservar/encapsular proteínas, enzimas y otros compuestos; para generarlas se utilizan soluciones poliméricas debido a que éstas tienen las propiedades físicas y químicas necesarias para formar fibras más resistentes, duraderas y elásticas (Gamboa, 2007). Otras aplicaciones de interés involucran la fabricación de componentes artificiales de órganos, ingeniería de tejidos para implantes, liberación de fármacos, entre otros (Ramakrishnaa *et al*., 2006).

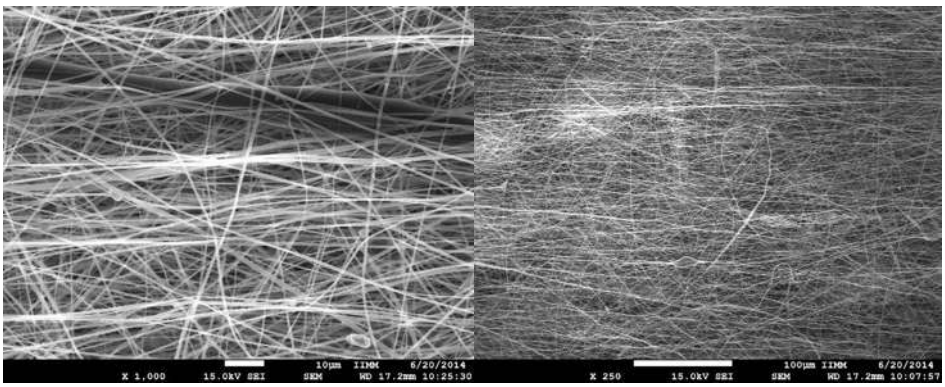


FIGURA 1. Micrografías de Microscopía electrónica de barrido (SEM) de soluciones poliméricas de CTS.

La generación de nanofibras poliméricas puede llevarse a cabo mediante el empleo de técnicas novedosas como: Auto-ensamblado (Smith-Ma, 2004), Síntesis de Plantilla (Tao-Desai, 2007), Dibujo por Laser Supersónico (Suzuki-Arino, 2012), Separación de Fases (Ichimori *et al*., 2013), Ultrasonicación (He *et al*., 2013), Ultrasonicación Atómica-Fundición en frio (Wang-Wakisaka, 2015) y el Electrohilado (Brenner, 2012), un método de producción de fibras ultrafinas con diámetros de tamaños de micro a nanómetros y con una morfología de superficie controlada.

El uso de fuerzas electrostáticas para formar fibras se presentó por primera vez por Formhals en 1934, pero fue hasta la década de 1990 que generó interés debido a su sencillez, versatilidad y potenciales usos en diversos campos (Huang *et al*., 2003). Actualmente, las aplicaciones del Electrohilado incluyen la generación de membranas para filtración (Aussawasathien *et al.*, 2008), protección militar (Gorji *et al*., 2012), nanosensores (Kowalczyk *et al.*, 2008), aplicaciones biomédicas como: inmovilización de enzimas (Shi *et al*., 2008), regeneración de tejidos (Yoo *et al.*, 2009) y liberación de fármacos (Pillay *et al*., 2013). Para estas aplicaciones se han empleado una extensa variedad de polímeros y combinaciones de estos, así como la adición de componentes orgánicos e inorgánicos, lo que abre la posibilidad de generar nanocompuestos de naturaleza cada vez más compleja (Schiffman-Schauer, 2008; Jayakumar *et al.*, 2011). Por medio de esta técnica es posible obtener materiales con una amplia superficie por unidad de área, porosidad interconectada y un rendimiento mecánico superior comparado con otras formas ya conocidas del material, lo cual resulta atractivo a nivel biotecnológico.

La capacidad de electrohilar un polímero depende de encontrar el disolvente óptimo. Además, en el proceso de Electrohilado (Figura 2) se utiliza un alto voltaje para crear un campo electrostático capaz de atraer partículas eléctricamente cargadas de una solución o fluido polimérico desde un cono inyector hacia una superficie donde se solidifica formando micro y nanofibras, las cuales a su vez forman tejidos (Gamboa, 2007).

La solución de polímero se inyecta hacia el aspersor (aguja) empleando una bomba de infusión (Figura 2). Como resultado de la tensión superficial, las primeras gotas de la solución se mantienen en su lugar, hasta que una protuberancia cónica conocida como cono de Taylor se forma debido a un voltaje crítico aplicado al sistema; mientras la bomba de infusión genera una presión y un flujo constante; la solución polarizada es asperjada (jet) hacia una superficie conductora (por lo general una pantalla metálica) colocada a una distancia que puede variar entre los 5 y 30 cm de la aguja.

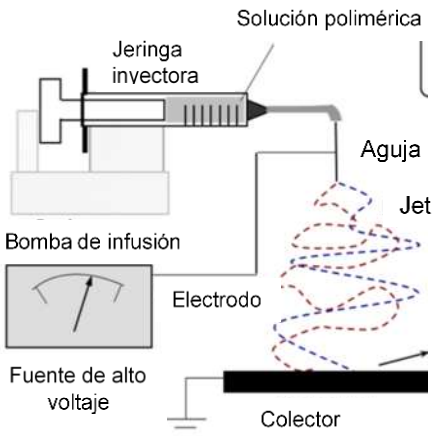


FIGURA 2. Esquema típico de un aparato de Electrohilado. Modificado de Schiffman-Schauer, 2008.

En el flujo electro-hidrodinámico del jet, las cargas son inducidas en el fluido a través de la distancia de separación de los dos electrodos (punta metálica

y colector), rompiéndose la tensión superficial a través del campo eléctrico y descomponiéndose en una tangencial (τ*t*) y una normal (τ*n*), dando lugar al cono de Taylor antes mencionado (Gamboa, 2007). La Figura 3 muestra la distribución de las cargas a través del jet.

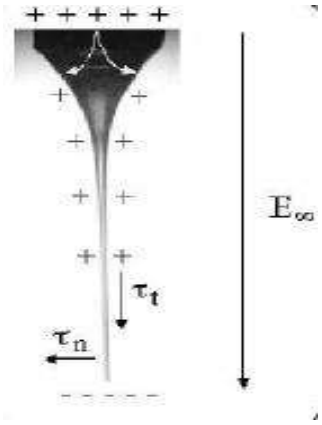


FIGURA 3. Distribución del Jet (Gamboa, 2007).

A medida que el jet toma aceleración, su diámetro disminuye en magnitud y de esta forma, la componente tangencial y la componente normal son balaceadas, finalmente el jet se solidifica creando una fibra de medidas micrométricas a nanométricas (Gamboa, 2007).

Si la viscosidad de la solución polimérica es alta y produce goteo con un voltaje bajo, se recomienda que este se incremente hasta observar la aspersión de la solución polimérica (cono de Taylor).

El flujo de la solución polimérica (ṁ), es dependiente de la densidad y viscosidad de la solución. El ṁ óptimo de inyección será aquel que se asimile con el volumen de solución que sale por la aguja hacia el colector; no debe ser muy alto ya que esto puede estropear la bomba inyectora.

La distancia entre la aguja y el colector (d) es un parámetro importante ya que a medida que aumenta la distancia las nanofibras serán de un diámetro menor, si la distancia es pequeña tendrán un diámetro mayor lo que podría contribuir a la formación de perlas (deformaciones ovaladas), las cuales incrementan el peso de las nanofibras reduciendo su resistencia mecánica.

La temperatura dentro del equipo de Electrohilado (T): contribuye a la evaporación de los disolventes empleados en las soluciones poliméricas cuando se está generando las nanofibras. Durante la creación del jet el disolvente gradualmente se evapora y el producto obtenido es una red no tejida compuesta de nanofibras con diámetros entre 50 nm y 10 µm.

La técnica de Electrospinning es versátil y de fácil ensamble lo que ha permitido procesar una gran variedad de polímeros, integrando en los últimos años una nueva clase de materiales.

Entre los polímeros de mayor uso en la obtención de nanofibras se encuentra el CTS, descubierto por Rouget en 1859 (Figura 4), es el segundo biopolímero natural más abundante después de la celulosa; es biodegradable, no tóxico y biocompatible.

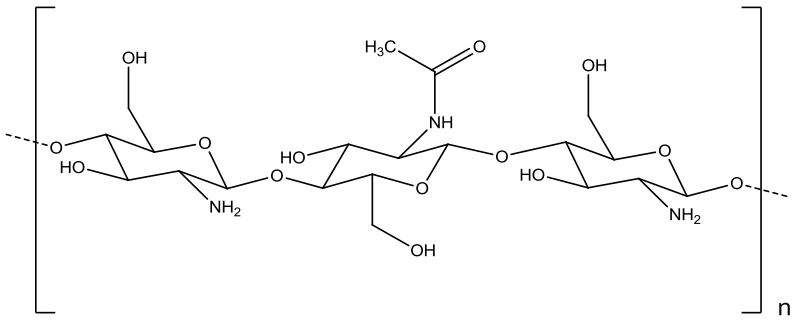


FIGURA 4. Estructura del CTS (Lárez, 2003).

El CTS de forma natural se encuentra en las paredes celulares de algunas levaduras; sin embargo, su principal fuente de producción es la hidrólisis de la quitina (proveniente de crustáceos) en medio alcalino a altas temperaturas (Lárez, 2003).

Una de las cualidades biológicas del CTS es su actividad antibacteriana cuyo mecanismo consiste en la interacción electrostática entre sus grupos amino cargados positivamente y una superficie cargada negativamente de la pared celular de los microorganismos. Esto conduce a la permeabilidad de la membrana celular de las bacterias y las fugas de los componentes intracelulares, que finalmente conduce a la apoptosis celular (Shahidi *et al*., 1999). Cuero *et al*. reportaron en 1991 que el CTS actúa como agente quelante uniéndose a metales, inhibiendo así, la producción de toxinas y el crecimiento microbiano, lo que contribuye a su actividad antibacteriana, especialmente en un medio ácido.

La actividad antibacteriana del CTS depende de su grado de acetilación, su peso molecular y el disolvente aplicado, el aumento de su grado de acetilación está acompañado por su mejora de la actividad (Zheng *et al*., 2003; Dutta *et al*, 2009).

La estructura rígida de la D-glucosamina del CTS, la alta cristalinidad y la capacidad de generar puentes de hidrógeno conducen a una escasa solubilidad del CTS en disolventes orgánicos comunes, limitando su manipulación. Reduciendo el peso molecular y cristalinidad por desacetilación, se ha mejorado su solubilidad en ácidos diluidos lo que permite un mejor procesamiento para la elaboración de membranas y fibras (Hirano-Hayashi, 2003; Ohkawa *et al*., 2004), permitiendo su aplicación dentro de los campos de ingeniería de tejidos y liberación de fármacos (Rojas *et al.* 2004).

Además, el CTS recibe actualmente un interés particular en aplicaciones médicas y farmacéuticas debido a su capacidad de combinarse con otros compuestos químicos para la mejora de la relación estructura-actividad (Martinová y Lubasov, 2008), así como por su potencial aplicación en sistemas de liberación de fármacos (Elsabee et al., 2012; Shukla *et al.*, 2013).

Las películas de CTS ejercen un efecto positivo sobre la textura de un producto alimenticio, mitiga los procesos de pardeamiento enzimático, reduce la producción de etileno y desempeña un papel de portador de sustancias activas

(Devlieghere, 2004; Zhang-Quantick, 1997). También ha sido combinado con extractos de plantas para su evaluación contra diferentes microorganismos. Bautista *et al*. (2000), reportaron pruebas con los extractos acuosos aislados de hojas de chirimoya (*Annona reticulata l*.) y papaya (*Carica papaya l*.) incorporando estos extractos al CTS. Estos inhibieron exitosamente la esporulación y el crecimiento del micelio de hongos como *Fusarium oxysporum, Penicillium digitatum* y *Rhizopus stolonifer*, causantes de pudrición de frutas y verduras durante su almacenamiento (Bautista *et al*., 2004). Bautista (2003), reportó la actividad antimicrobiana del CTS al proteger frutos como la fresa (Ghaouth *et al.*, 1991; 1992) y la papaya (Bautista, 2003), lo que induce una baja incidencia de enfermedades en los frutos por el ataque de dichos patógenos.

Además, la naturaleza policatiónica del CTS permite explicar los efectos analgésicos que le son atribuidos; pues los grupos amino de los residuos de D-glucosamina se protonan en presencia de ácido acético (AcOH) al 0.5% y se liberan en la zona inflamatoria, lo que resulta en dicha actividad (Okamoto *et al*., 2002).

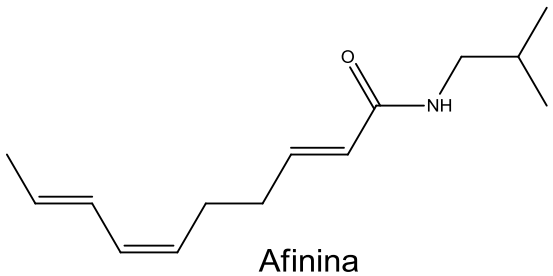
Para la generación de nuevos bionanocompuestos base CTS en forma de nanofibras se encuentran su combinación con productos naturales y nanopartículas metálicas. Resultando en combinaciones altamente atractivas

debido a las propiedades individuales que presentan cada uno de los componentes.

Dentro de los productos naturales altamente atractivos para su combinación con CTS se encuentran las alcamidas, a las que se les atribuyen notables efectos analgésicos y antimicrobianos. Desde el punto de vista biogenético, se forman al combinarse dos diferentes rutas metabólicas. Estas alcamidas se constituyen de un ácido graso de longitud de cadena que puede ser de 8 a 18 carbonos, generalmente alifática; éste, al condensarse con un aminoácido y en descarboxilación concomitante, resulta en la producción de una alcamida.

Las alcamidas olefínicas como la afinina han demostrado su eficacia como sustancias activas por lo que son un grupo de metabolitos secundarios vegetales de interés (Molina *et al*., 2001).

La afinina (*N*-isobutil-decatrien,*2E,6Z,8E*-amida), (Figura 5), se describe como un aceite amarillo, viscoso, soluble en disolventes no polares (cloroformo, éter, benceno, etc.) e insolubles en soluciones ácidas y alcalinas, posee un peso molecular de 221.33 g/mol (Molina *et al*., 1996). Este compuesto presenta una actividad característica que varios autores han denominado como “pungente”, que adormece o anestesia la zona corporal donde se aplica, dicha sensación está clasificada como un efecto bioactivo (Boonen *et al*., 2012).



Afinina

FIGURA 5. Estructura de la afinina (*N*-isobutil-2*E*, 6*Z*, 8*E* decatrienamida).

Algunas investigaciones sobre la afinina han demostrado su importante actividad biológica como agente antimicrobiano, que está dada por el reconocimiento específico de los dobles enlaces de la cadena del residuo de ácido graso por parte de la enzima tioester β-hidroxicanoildeshidratasa de *Echerichia coli*. Adicionalmente, se ha comprobado que para *E. coli*, *Pseudomona solanacearum* y algunos hongos, una insaturación *2E* presente en la cadena del ácido graso promueve esta actividad mientras que una insaturación adicional *6Z*, *8E* la disminuye (Molina *et al*., 1999). El efecto antiinflamatorio de la afinina se promueve cuando inactiva el NF-κB (factor nuclear de transcripción y regulador de respuesta inmune) mostrando un

significante efecto antiinflamatorio en ratones que presentan edema de oreja; y es la única N-alquilamida que tiene una influencia demostrada en la transcripción y traducción de las ciclooxigenasas (Boonen *et al*., 2012; Hernández *et al*., 2009). También son conocidas sus actividades como poderoso anestésico bucal (Molina *et al*., 2001), analgésico (Cilia *et al*., 2008), fungicida (Ramírez *et al*., 2000; Salgado *et al*., 2008), antipalúdico (Waizel *et al.,* 2011), insecticida (Hernández *et al*., 2012), y crioprotector de tejido vegetal (Hernández, 2009). Por lo que resulta de interés el continuo estudio de éste compuesto, principalmente en el área farmacológica.

Por otro lado, las nanopartículas metálicas (NPs) han adquirido particular interés debido a su alta relación volumen/superficie; recibiendo especial atención aquellas a base de oro y plata, debido a sus aplicaciones en biomedicina, catálisis, óptica y como sensores (Zeng *et al*., 2007). Estas son bien conocidas por su actividad antimicrobiana, (Gajbhiye *et al*., 2009; Sondi-Salopek, 2004). En pequeñas concentraciones, la plata es segura para células humanas, pero letal para la mayoría de las bacterias y virus, por lo tanto, es ampliamente usada para la desinfección de agua, alimentos y el control de infecciones (Batarseh, 2004).

La actividad biológica de las AgNPs se debe a la inhibición de enzimas respiratorias por los iones de plata que se liberan (Pal *et al.*, 2007).

El efecto antifúngico de las AgNPs no se ha explorado lo suficiente; sin embargo, (Kim *et al*., 2009) reportan que las AgNPs exhiben una excelente actividad contra *Candida albicans* alterando su membrana celular e inhibiendo su crecimiento.

En la última década, se ha comprobado su actividad contra virus de Inmunodeficiencia humana tipo I (Elechiguerra *et al*., 2005), hepatitis B (Lu *et al*., 2008), herpes simple (Baram-Pinto *et al*., 2009) y el virus de influenza A H1N1 (Mori *et al*., 2013).

Dentro de las técnicas descritas para la síntesis de AgNPs se encuentran: la microemulsión, irradiación de rayos *γ*, irradiación UV, microondas, ultrasónica, las reducciones química, electroquímica y fotoquímica (El-Sukkary *et al*., 2014).

En particular, la preparación de nanopartículas metálicas inmovilizadas en diversas matrices ha despertado el interés en la investigación, debido a una excelente sinergia y efectos bifuncionales (Manna *et al*., 2006). En cuanto a la mezcla de CTS con AgNPs se ha reportado que esta posee una excelente actividad antimicrobiana (López *et a*l., 2013)

Entre los compuestos químicos que actualmente generan interés en múltiples áreas de la ciencia, se encuentran aquellos constituidos de una parte orgánica y una metálica.

La utilidad de estas estructuras en la medicina moderna, ha sido estimulada por el descubrimiento fortuito del cisplatino® (Figura 6), que fue aportado por el conocimiento de las propiedades de coordinación y redox de iones metálicos (Xin-Lippard, 2003).

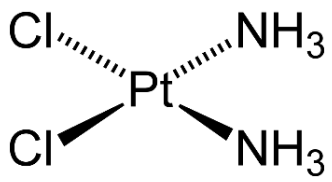


FIGURA 6. Estructura del cisplatino®.

La interacción controlada de biomoléculas con NPs se puede llevar a cabo por:

- La unión de la biomolécula a la superficie del núcleo de la NP a través de la unión mediada por ligando.

- Interacciones electrostáticas entre biomoléculas con carga positiva a una NP con carga negativa y viceversa.
- La unión covalente de grupos funcionales tanto en NPs y biomoléculas.
- Mediante la unión no covalente, sistemas receptor-ligando basados en la afinidad.

Para su conjugación, las NPs requieren un grupo funcional adecuado. Existen en la naturaleza una gran variedad de moléculas orgánicas de diferente composición, tamaño y complejidad que poseen una función en procesos biológicos. Los ejemplos incluyen moléculas pequeñas como lípidos, vitaminas, péptidos, azúcares; hasta los más grandes que incluyen proteínas, ADN y ARN.

La mayoría de las biomoléculas poseen grupos funcionales como ácido carboxílico, amina primaria, alcohol, fosfato o tioles, por lo tanto estas moléculas son susceptibles de unirse a la superficie de las NPs para hacerlas funcionales (Ravindran *et al*., 2013).

Los complejos metal-fármaco contribuyen potencialmente al mantenimiento y difusión de factores de resistencia a antibióticos. La unión de ciertos antibióticos con iones metálicos muestra potenciadas actividades antibacterianas, antivirales, antifúngicas y antitumorales (Ming, 2003; Ogunniran *et al*., 2007; El-Ajaily *et al*., 2007). Los complejos metal-antibióticos han ganado reconocimiento ya que son más eficaces que los fármacos puros (von Nussbaum *et al*., 2006; El-Megharbel-Refat, 2015).

La incorporación de centros metálicos dentro de compuestos orgánicos, promueve que estos últimos puedan adoptar diferentes números de coordinación, estados de oxidación, geometrías, tipos de unión (covalente o de coordinación); los cuales pueden impactar en las propiedades de esta clase de compuestos (Abd-El-Aziz *et al.*, 2010).

Por todo lo anterior, se propone la síntesis de nanofibras compuestas de CTS y afinina-AgNPs generadas mediante reacciones de foto-reducción, a partir del complejo afinina-$AgNO_3$. Para la generación de un bionanocompuesto con potencial actividad biológica proveniente de una combinación altamente atractiva, debido a las propiedades individuales que presentan cada uno de los componentes.

3. Justificación

La importancia de esta investigación radica en que los resultados de ésta contribuirán a ampliar el conocimiento de las interacciones químicas entre polímeros, metales y compuestos naturales; promoverá el estudio y aprovechamiento de la nanotecnología de los soportes de CTS en la generación de un material compuesto con potencial actividad biológica.

4. Hipótesis

La incorporación de afinina y sales de $AgNO_3$ (en forma de un complejo de coordinación capaz de generar AgNPs) sobre una matriz de CTS dará como resultado un novedoso bionanocompuesto en forma de nanofibras con potencial farmacológico.

5. Objetivo General

Sintetizar y caracterizar un bionanocompuesto en forma de nanofibras a base de quitosano/ afinina-nanopartículas de plata, así como evaluar de manera preliminar su potencial antimicrobiano.

6. Objetivos Particulares

- Obtener la afinina a partir de muestras de “raíz de oro” o Chilcuague e identificarla mediante métodos espectroscópicos.

- Sintetizar un complejo de coordinación a partir de afinina y $AgNO_3$ y obtener evidencia de su formación mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos.
- Sintetizar nanopartículas de plata a partir de un complejo de coordinación afinina-plata y de $AgNO_3$.
- Encontrar las condiciones óptimas para la elaboración de películas de CTS.
- Sintetizar el bionanocompuesto quitosano/ afinina-nanopartículas de plata en forma de nanofibras y caracterizarlo por medio de las técnicas de espectroscopia de infrarrojo (IR), ultravioleta (UV-Vis) y microscopía electrónica de barrido (SEM).
- Evaluar el potencial antimicrobiano del bionanocompuesto sintetizado, empleando cepas de *Escherichia coli* (BG-) ATCC 25922, *Staphyloccocus aureus* (CG+) ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* (BG-) ATCC 25619.

7. Discusión de Resultados

7.1. Obtención de la afinina

En el Mercado de Sonora de la Ciudad de México fueron adquiridas muestras de “raíz oro” (Chilcuague). Partiendo de un lote de raíces de 81.5 g (Figura 7A), se realizaron 5 maceraciones sucesivas en hexanos (Figura 7B), mismas que fueron filtradas y concentradas en rotavapor, obteniendo 1.445 g de una miel amarilla con un rendimiento del 1.79% (Figura 7C). Este extracto hexánico fue impregnado en gel de sílice y sometido a purificación mediante cromatografía en columna empleando gel de sílice como fase estacionaria y una mezcla de Hex-AcoEt (7:2) en orden creciente de polaridad (Figuras 8A y 8B), obteniendo fracciones de 5 mL cada una.

De la columna fueron recuperadas 60 fracciones, en las cuales se obtuvieron 1.07 g de afinina, lo que representó el 74% del extracto hexánico total obtenido de las raíces de Chilcuague (Figura 8C).

FIGURA 7. Obtención del extracto hexánico de raíces de Chilcuague. A) muestra de raíces de Chilcuague, B) macerado hexánico y C) extracto final.

Por medio de RMN de ^{1}H y ^{13}C se corroboró la presencia de afinina como producto mayoritario en el extracto hexánico (Figura 9B).

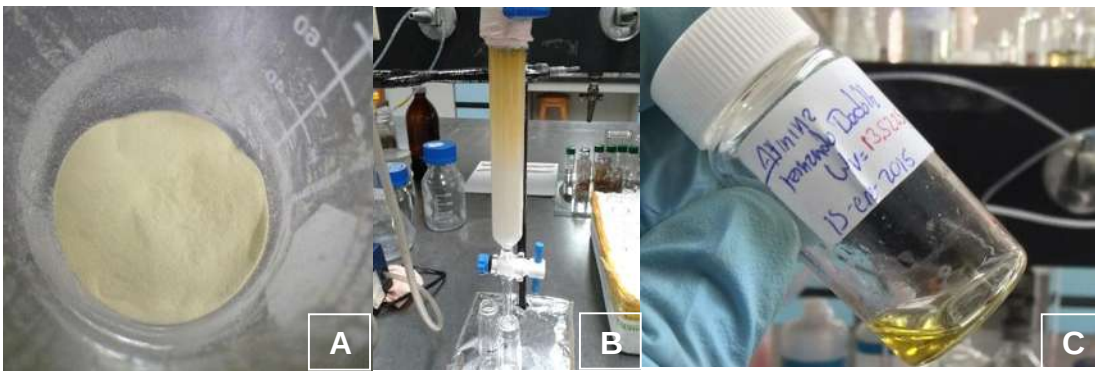
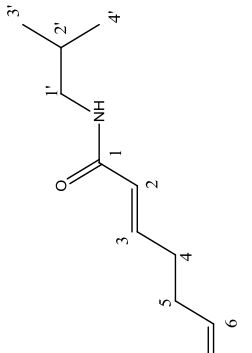


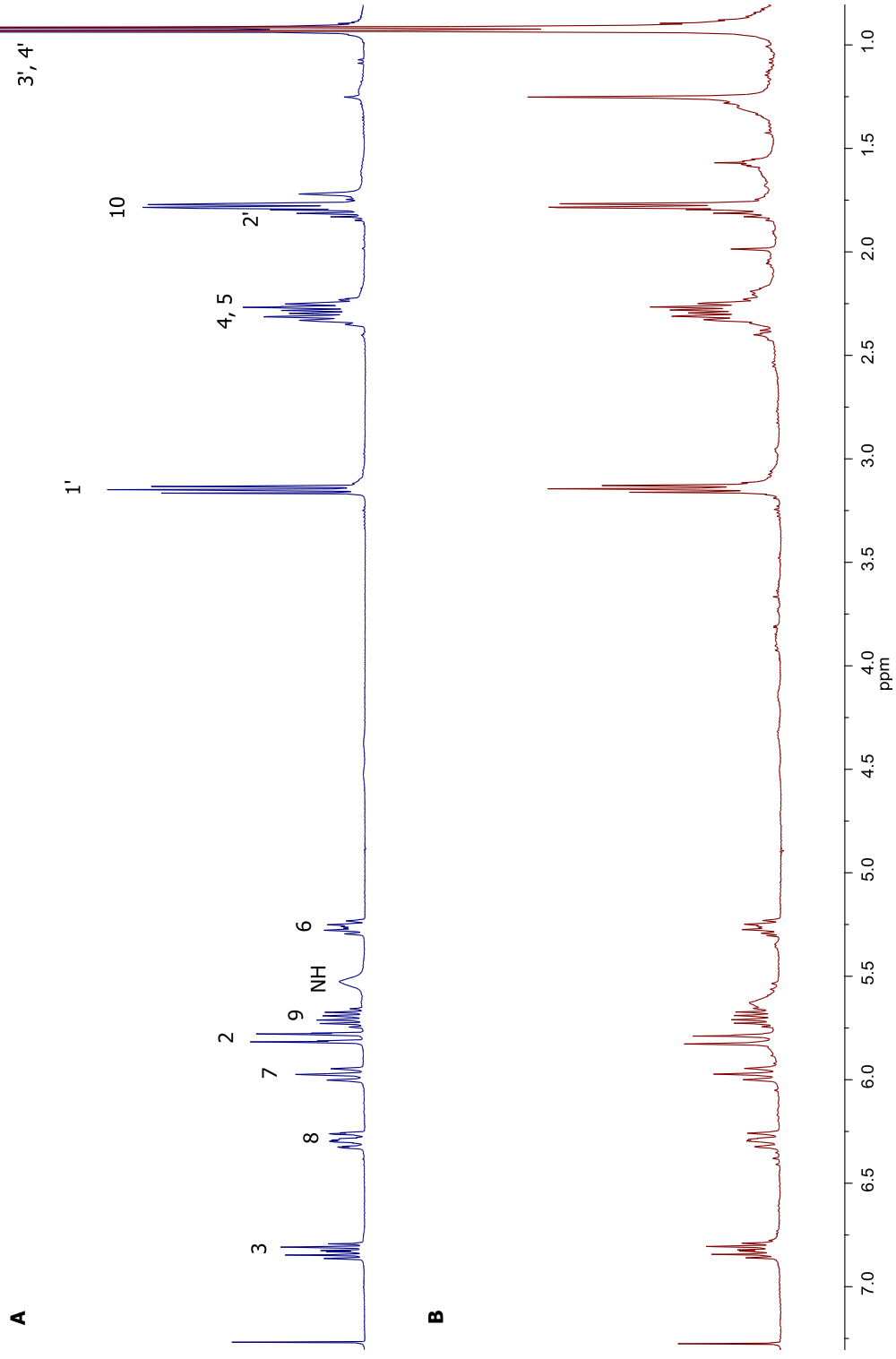
FIGURA 8. Purificación del extracto hexánico de Chilcuague. A) Extracto impregnado en gel de sílice, B) Columna cromatográfica eluyendo los componentes del extracto, C) Afinina purificada.

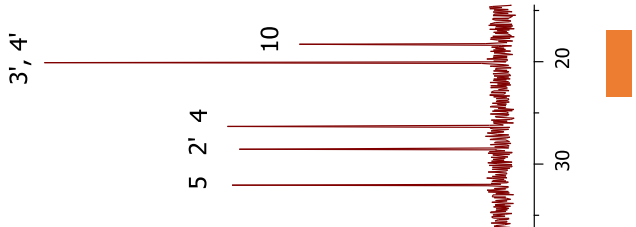
En el espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) se observó el patrón de señales descritas para la afinina (Nakatani-Nagashima, 1992; Calle *et al*. 1988, Ogura *et al.*, 1982). Se apreciaron protones vinílicos entre 6.83 y 5.26 ppm; de igual manera se observó una señal para el protón base de amida en 5.53 ppm; se encontraron señales múltiples para los protones de metilenos en 3.15 y 2.29 ppm y de un metino en 1.80 ppm, así como de los protones de grupos metilos en 1.78 y 0.93 ppm. (Figura 9A).

En el espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) de la afinina se observaron 13 señales; se apreció una señal en 165.88 ppm correspondiente al carbonilo de amida; entre 143.55 y 124.0 ppm se encontraron 6 señales pertenecientes a carbonos vinílicos; y entre 46.78 y 18.32 ppm aparecieron 6 señales de carbonos alifáticos, cabe destacar que en 20.10 ppm se empalman las señales, correspondientes a 3' y 4' (Figura 10).



Hz. en $CDCl_3$. (A) afinina purificada (B) Extracto crudo de Chilcuague

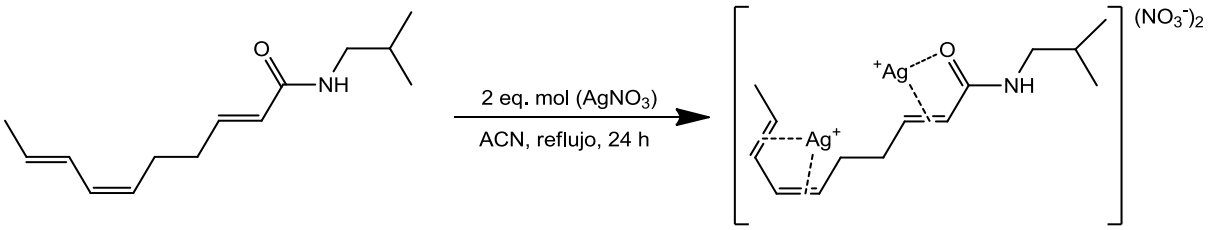

A
B
3', 4'
10
2'
4, 5
1'
3
8
7
2
9
NH
6
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5
4.0
4.5
5.0
5.5
6.0
6.5
7.0
ppm


3', 4'
10
5
2'
4
20
30

7.2. Obtención y caracterización del complejo $[Ag_2\text{-(afinina)}](NO_3)_2$

La reacción de complejación de afinina con $AgNO_3$ se llevó a cabo de la siguiente manera.

Primeramente, se procedió a la activación de 2 equivalentes de $AgNO_3$ en 10 mL de ACN, para después de 1 h adicionar 1 equivalente de afinina al matraz de reacción, esta mezcla se hirvió a reflujo en agitación constante durante 24 h (Esquema 1).



ESQUEMA 1. Reacción de complejación Ag-afinina.

Transcurrido este tiempo se evaporó el crudo de reacción a presión reducida en línea de vacío, para después realizarle lavados con hexano y CH_2Cl_2 de manera consecutiva (Figura 11A y 11B), obteniendo un sólido amorfo color café en un rendimiento del 51 (wt.-%). (Figura 11C).

Este sólido presentó un punto de fusión de 209-211 °C, y fue soluble en ACN, MeOH y DMSO. Por medio de Espectroscopia de IR se compararon los espectros de los productos de reacción con respecto a las materias de partida. El anión $(NO_3)^-$ del $AgNO_3$ (Figura 12A) posee seis grados de libertad vibratorios, que forman cuatro modos fundamentales: un estiramiento (ν_{as}) doble en 1262.38 cm^{-1}, un estiramiento (ν_s) en 1043.69 cm^{-1}; una flexión fuera del plano (δ_{oop}) en 798.58 cm^{-1} y una flexión doble en el plano (δ_{ip}) en 730 cm^{-1} (Shen y Sherman; 1992).

FIGURA 11. Producto de reacción Ag-afinina. A) Crudo de reacción después de 24 h, B) Lavado con CH_2Cl_2 y precipitación del producto de reacción, C) Aspecto físico del producto de reacción.

El espectro de IR de la afinina (Figura 12B) muestra bandas características de estiramientos (ν -N-H) en 3295.72 cm^{-1}, (ν =C-H) en 2956.44 cm^{-1}, (ν -CH_3) en 2924.62 cm^{-1}, (ν -CH_2) en 2854.27 cm^{-1}, (ν -C=C $_{\text{no conjugada}}$) en 1668.14 cm^{-1}, (ν -C=O) en 1628.76 cm^{-1}, (δ -N-H) en 1548.23 cm^{-1} y (ν -C-N) en 1246.86 cm^{-1}. Estas señales corresponden a las reportadas por Nakatani-Nagashima (1992) y Ogura *et al* (1982).

En el espectro del producto de reacción (Figura 12C), se puede observar el desplazamiento a frecuencias mayores de las bandas en 3446.37 cm^{-1} (ν -N-H), en 2997.41 cm^{-1} (ν =C-H), en 2935.67 cm^{-1} (ν -CH_3) y en 2850.70 cm^{-1} (ν -CH_2); el aumento del porcentaje de transmitancia de las bandas (ν -C=O) en 1632.65 cm^{-1}, así como la aparición de las bandas características del contraión ν_a $(NO_3)^-$ en 1262.53 cm^{-1}, una flexión fuera del plano (δ_{oop}) en 798.67 cm^{-1} y una flexión doble en el plano (δ_{ip}) en 732.89 cm^{-1}.

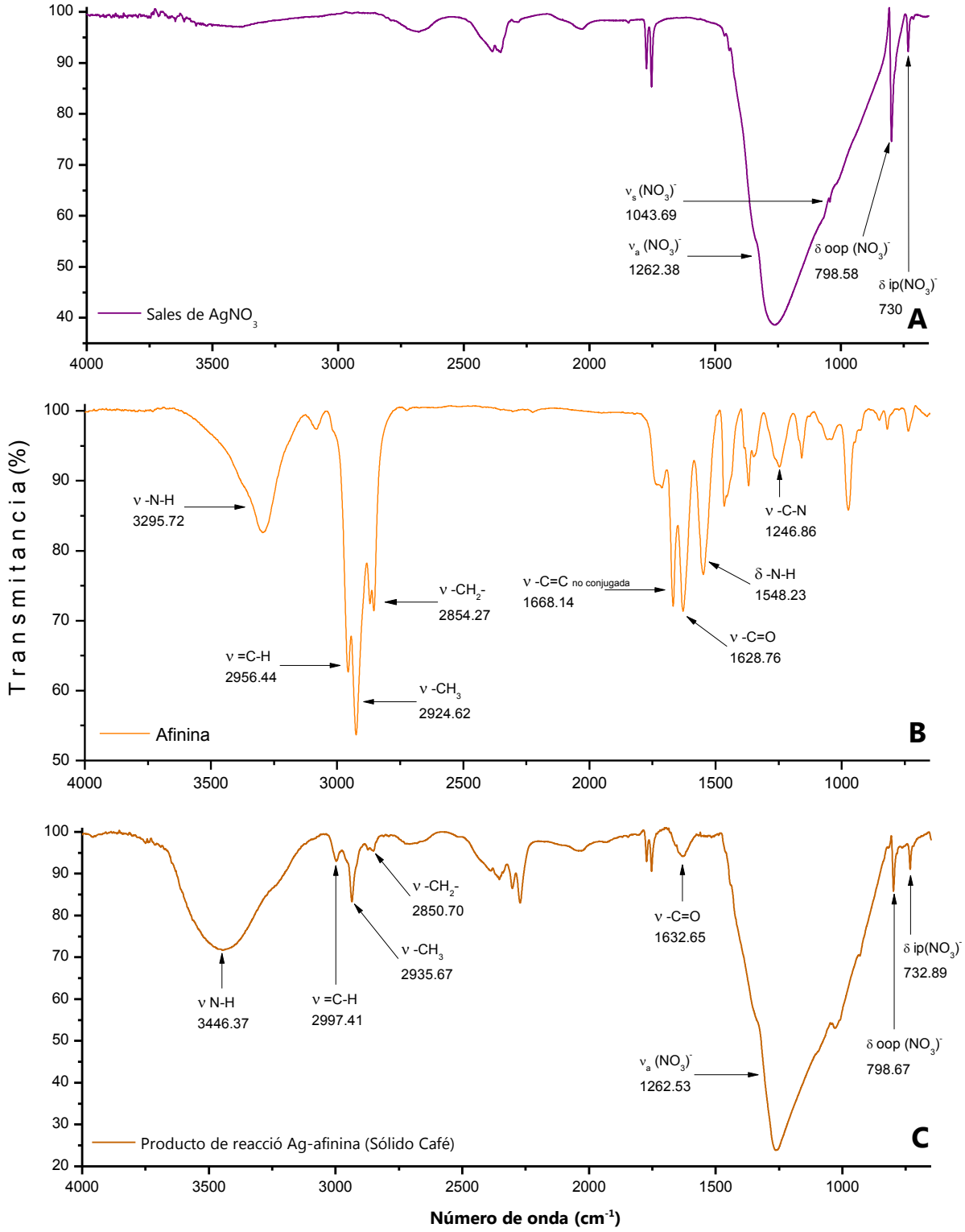


FIGURA 12. Espectros de IR del $AgNO_3$ (A), afinina (B) y producto de reacción Ag-afinina (C).

En la Tabla 1 se muestra la relación de (Δ_T) que guardan las señales (ν -CH_3)-(ν -C=C $_{\text{no conjugada}}$) y (ν -CH_3)-(ν =C-H), tomando como base la banda (ν -CH_3), cuya relación de (%$_T$) no se modifica en el espectro del producto de reacción. La diferencia en el desplazamiento de las bandas (ν =C-H) y (ν -C=C $_{\text{no conjugada}}$) en el producto de reacción sugiere que la coordinación de la plata se produce sobre los carbonos vinílicos de la afinina.

TABLA 1. Comparación de señales características de los espectros IR de la afinina y del producto de reacción.

	(Δ_T)		*número de onda (cm^{-1})*	
vibraciones	(ν -CH_3)-(ν -C=C)*	(ν -CH_3) - (ν =C-H)	ν =C-H	ν -C=C*
Afinina	9	18	2956.44	1668.14
Producto de reacción	9	11	2997.41	1632.65

* (ν -C=C $_{\text{no conjugada}}$).

Continuando con el análisis espectroscópico del producto de reacción, se obtuvo su espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, DMSO-$_{d6}$) el cual mostró un patrón de señales anchas, guardando poca relación con el espectro de la afinina (Figura 13B); es posible distinguir la señal del protón de amida en 8.20 ppm, además de dos señales anchas en 6.60 y 5.80 ppm atribuidas a protones vinílicos, una señal de metileno en 2.89 ppm, así como el patrón de señales del residuo isobutilo de la afinina en 0.80 ppm. Cabe destacar que las señales del resto de los protones de la afinina no pudieron ser asignadas debido a la complejidad del espectro. (Figura 13A). La comparación del producto de reacción con la materia prima fue posible al obtener el espectro de RMN de ^{1}H a 400 MHz en DMSO-$_{d6}$ de la afinina.

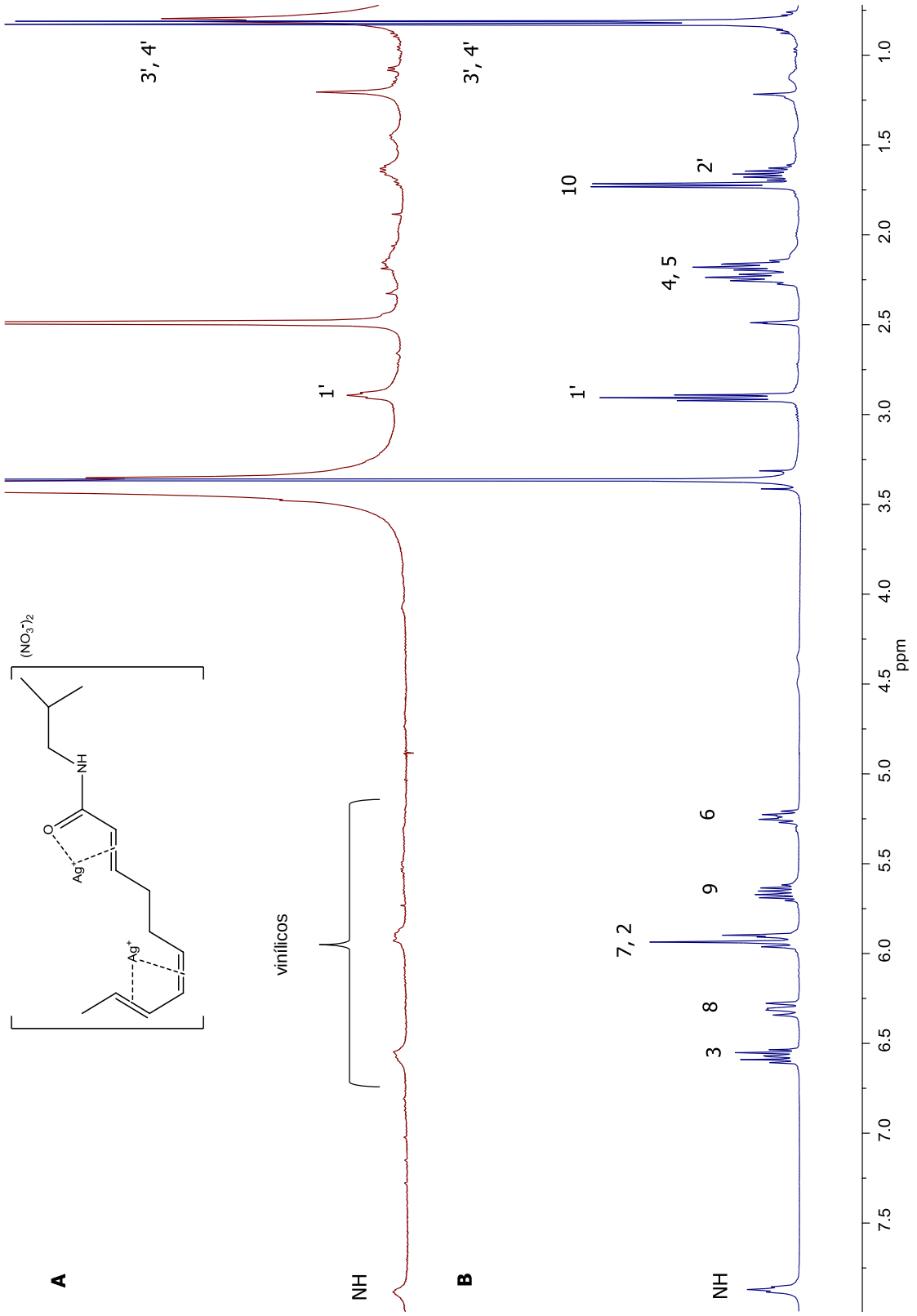


FIGURA 13. Espectros de RMN ^{1}H 400 MHz. en DMSO-$_{d6}$ (A) Producto de Reacción Ag-afinina, (B) Afinina purificada.

El espectro de masa del producto de reacción mediante la técnica de Electrospray (ESI-MS), arrojó un ion molecular [M^++ACN] 599 *m/z* (Figura 14) que corresponde a una molécula compuesta por 2 moléculas de $AgNO_3$ y una de afinina.

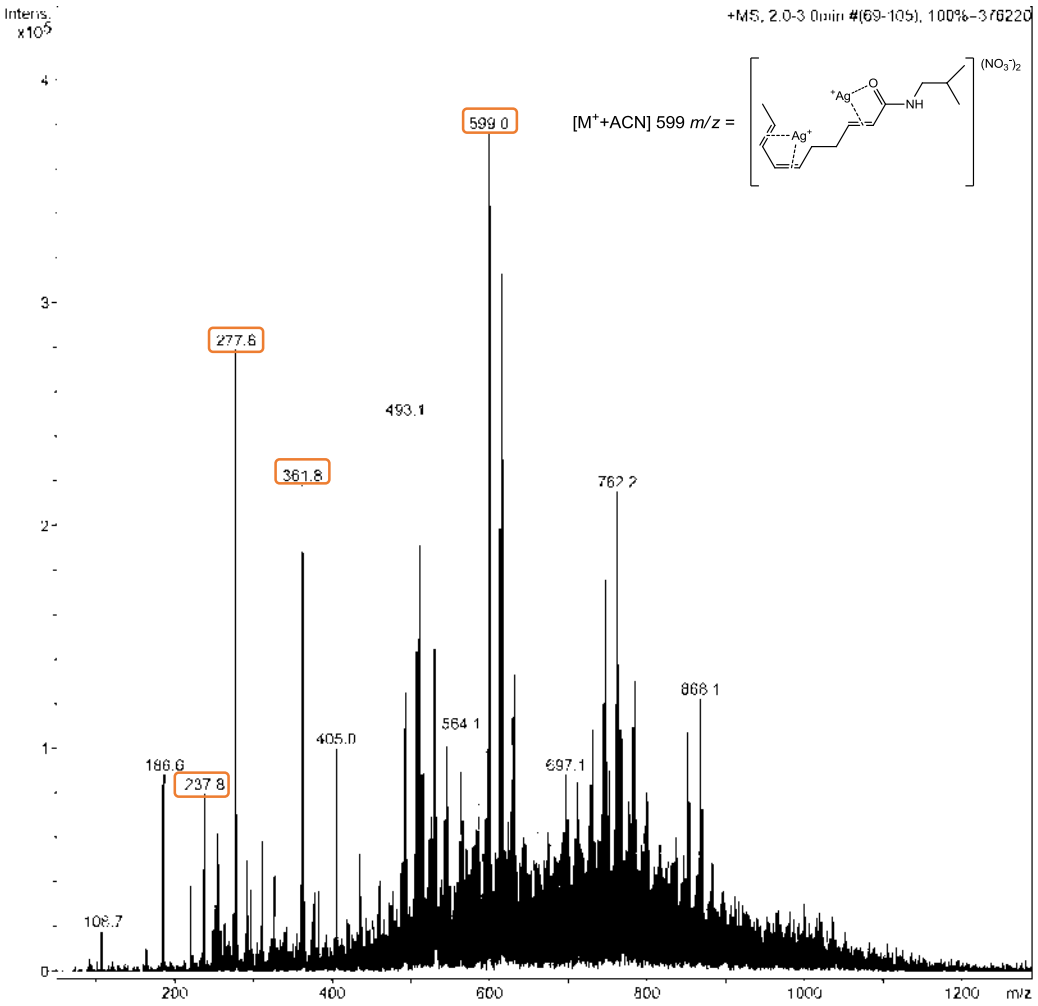


FIGURA 14. Espectro de Masa del complejo [Ag_2-(afinina)]$(NO_3)_2$.

Algunos fragmentos observados pudieron ser relacionados para la propuesta de coordinación; los fragmentos A y B corresponden a iones con *m/z* de

277.9 y 361 respectivamente, sugiriendo la coordinación η^2-2,3-κ-N hacia una molécula de

$AgNO_3$; mientras que el fragmento C con *m/z* de 237.8 sugirió la coordinación η^4-6,7,8,9 hacia otra molécula de $AgNO_3$, por lo que se plantea la formación de un complejo con fórmula $[Ag_2\text{-(afinina)}](NO_3)_2$ (Figura 15).

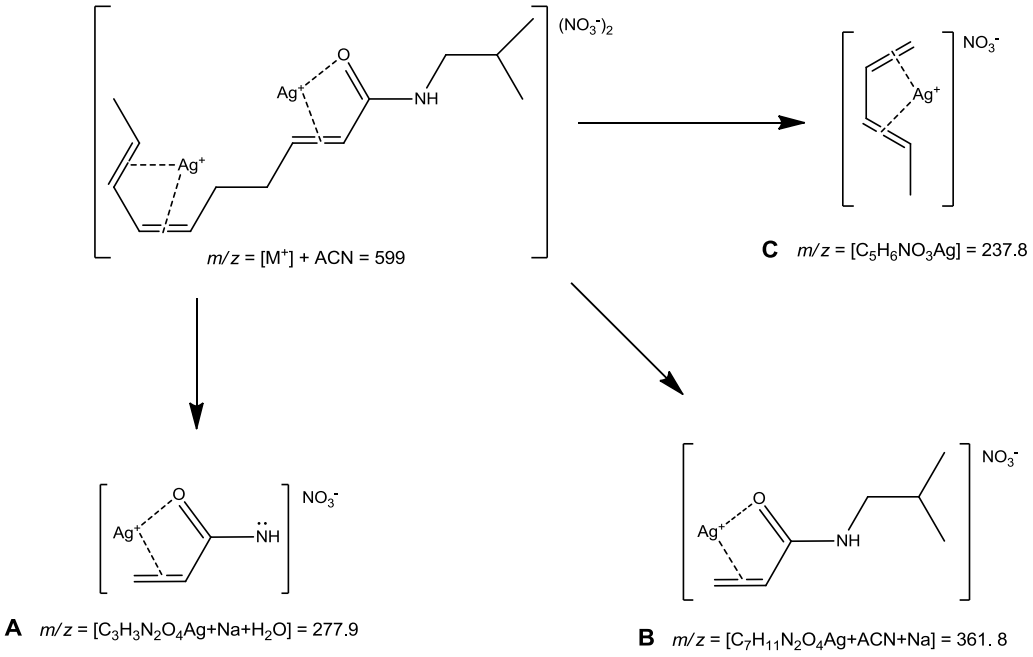


FIGURA 15. Propuesta del patrón de fragmentación del complejo $[Ag_2\text{-(afinina)}](NO_3)_2$.

7.3. Generación de nanofibras por el método de “Electrohilado”.

La generación de nanofibras poliméricas (Figura 16A) se llevó a cabo en la unidad NEU-01 de Nabond Technologies (Figura 16B). Como primer paso se inició la búsqueda de condiciones adecuadas para la generación de nanofibras, llevando a cabo variaciones en la concentración del (CTS) y del disolvente; cabe destacar que las soluciones poliméricas se prepararon en proporciones porcentuales (peso-peso). También se realizaron modificaciones de las variables del equipo que son: voltaje, velocidad de flujo másico, temperatura, distancia aguja-colector y tipo de colector.

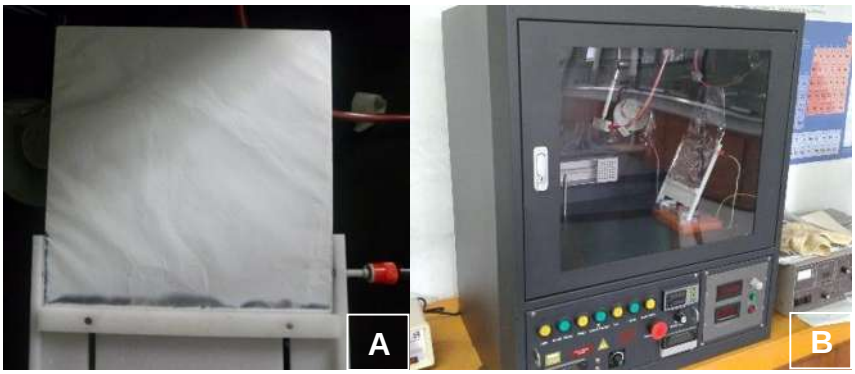


FIGURA 16. A) Equipo “Nabond Technologies”, empleado para la generación de nanofibras, B) Colector plano cubierto por fibra.

Primeramente, se ensayó la generación de nanofibras empleando diferentes concentraciones de CTS en soluciones de HCl y AcOH como disolventes. Sin embargo, debido a las características fisicoquímicas de estas soluciones no fue posible la obtención de fibras, solamente se generaron pequeñas gotas de solución polimérica sobre la superficie del colector plano, dando la apariencia de una biopelícula transparente, siendo este el resultado en la

mayoría de estos ensayos. Las condiciones de operación iniciales para la generación de fibras se resumen en la Tabla 2.

TABLA 2. Condiciones de operación iniciales para el Electrohilado de CTS puro

[CTS] *(wt.-%)*	2 - 4
Disolvente empleado	AcOH y HCl
[disolvente] *M*	0.4 (ambos)
Voltaje *(kV)*	8 – 23
Temperatura *(°C)*	50 - 75
Flujo másico (*mL/min)*	0.01 - 1
Distancia al colector *(cm)*	4 - 20

7.4. Generación y caracterización de nanofibras de PVA/CTS.

Para explorar la posibilidad de generar nanofibras compuestas con CTS, se decidió mezclarlo con alcohol poli-vinílico (PVA), un polímero fácilmente electrohilable que es soluble en agua y que al igual que el CTS es ampliamente utilizado en biomedicina debido a su biocompatibilidad (Zheng *et al*., 2001). Se trata de un polímero semicristalino con una buena estabilidad química y térmica, es altamente biocompatible y no tóxico, lo que conduce a una amplia gama de aplicaciones en medicina, cosmética, alimentos y en la industria farmacéutica.(Lee, 2009; Duan, 2007; Zhang, 2007).

El PVA se puede utilizar para mejorar las propiedades físicas de un sistema a través de su incorporación con otros materiales que poseen propiedades físicas pobres (Islam *et al*., 2015). De acuerdo a la teoría de Flory-Huggins, la miscibilidad y compatibilidad de dos polímeros depende de la habilidad para formar puentes de hidrógeno, los cuales pueden ocurrir entre grupos OH-OH, NH-OH, C=O-HO y C=O-HN (Boyd-Philips, 1993). Estudios previos reportan que la interacción entre el CTS y PVA se debe principalmente a los puentes de hidrógeno antes mencionados (Sionkowska *et al*., 2005).

Las soluciones de PVA que se emplearon fueron a concentraciones del 7.8 y 9% y se trabajó con diferentes proporciones PVA/CTS. La concentración de ácido en la solución polimérica es uno de los parámetros más importantes para llevar a cabo el electrohilado, ya que reduce la tensión superficial de la solución polimérica y al mismo tiempo aumenta la densidad de carga de chorro sin efecto significativo sobre la viscosidad (Geng *et al*., 2005); por tal motivo en los ensayos subsecuentes se incrementó la concentración de AcOH en la solución de CTS, del 80 al 90%.

Con el propósito de determinar la concentración máxima de CTS, se prepararon soluciones con distintas proporciones porcentuales de PVA/CTS (50:50, 60:40, 70:30, 80:20 y 90:10), a fin de generar fibras adecuadas con una menor

presencia de gotas de solución sobre la fibra y de un espesor adecuado para poder ser removidas del colector (Figura 17).

FIGURA 17. Generación de nanofibras. A) Solución PVA / CTS previa homogenización, B) Formación de fibras en papel aluminio del colector plano, C) Evidencia de la formación de fibra polimérica en el colector.

A través de las micrografías obtenidas en el Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo (MEB-EC) se pudo demostrar que la muestra PVA 7.8% / CTS8 % (70:30) no permitió la formación de nanofibras, sino una película delgada (Figura 18).

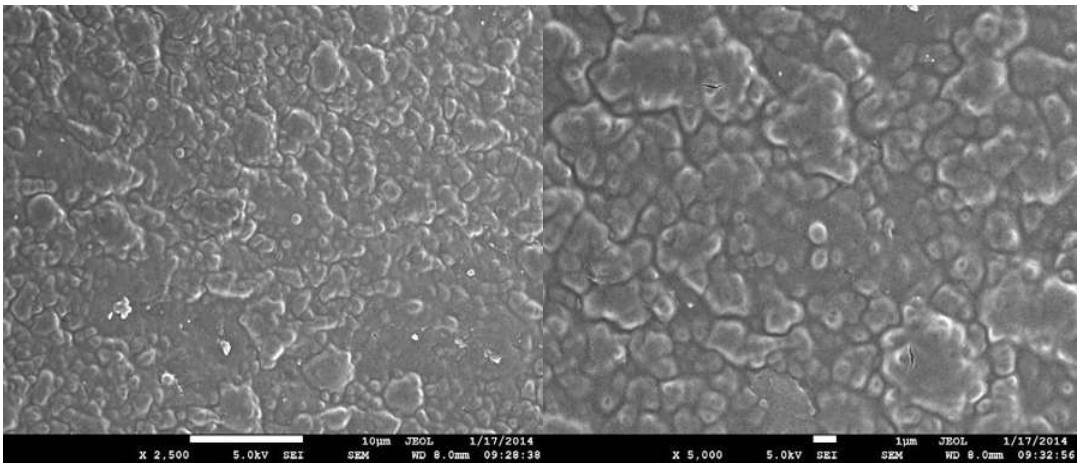


FIGURA 18. Micrografía de la muestra PVA 7.8% / CTS 8% (70:30) en AcOH, 90% (v.v), sin presencia de fibras.

Después de diferentes ensayos para la generación de nanofibras empleando la mezcla PVA/CTS se encontró que solamente con las soluciones 80:20 y 90:10 es posible producir nanofibras sobre el área del colector, las cuales presentaron una buena resistencia mecánica, aun cuando resultaron ser muy delgadas; sin embargo, la cantidad de CTS en ellas es mínima.

La micrografía de la muestra PVA 7.8% / CTS 8% (90:10) (Figura 19) reveló la presencia de fibras con diámetros en el orden de ~131 nm coexistiendo con perlas.

De la misma forma al incrementar la concentración de PVA y disminuir la relación PVA-CTS es posible notar una ligera disminución en la presencia de perlas sobre la muestra PVA 9% / CTS 8% (70:30), lo cual mejora la resistencia mecánica de las nanofibras (Figura 20). En la Figura 21, se muestra el compuesto PVA 9% / CTS 9% (80:20) en el cual se obtuvieron nanofibras de mejor calidad con diámetros alrededor de ~188 nm y una distribución homogénea de las nanofibras, así como la nula presencia de defectos.

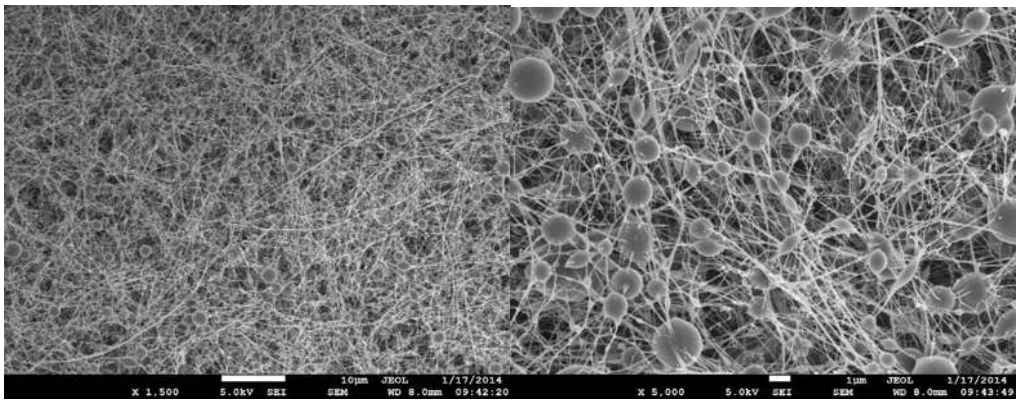


FIGURA 19. Micrografía de la muestra PVA 7.8% / CTS 8% (90:10) en AcOH, 90 % (v.v), fibras que coexisten con “perlas” poliméricas.

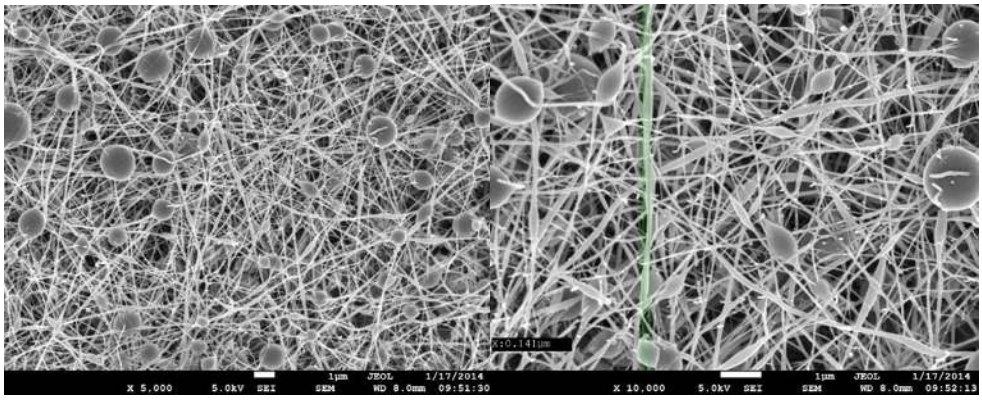


FIGURA 20. Micrografía de la muestra PVA 9% / CTS 8% (70:30) en AcOH, 90% (v.v) mostrando una mayor cantidad de fibras con respecto a perlas polimérica, nanofibras de diámetro de ~141 nm.

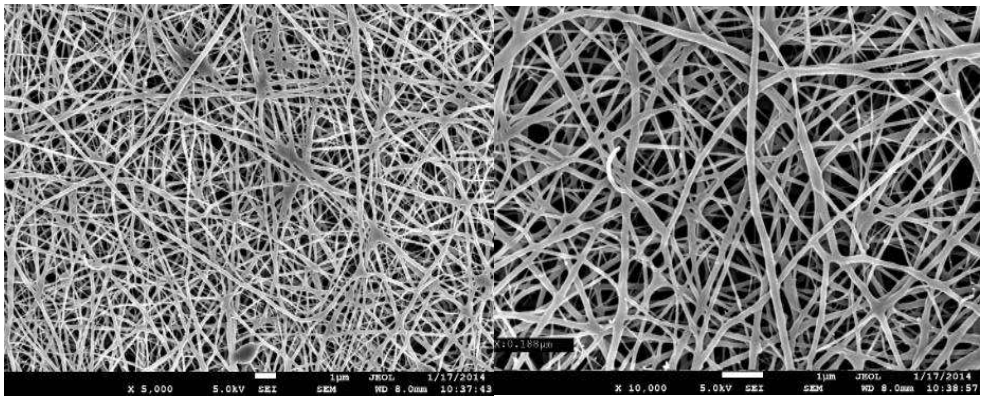


FIGURA 21. Micrografía de la muestra PVA 9% / CTS 9% (80:20) en AcOH, 90% (v.v) sin presencia de perlas y con un diámetro promedio de nanofibras de ~188 nm.

De los ensayos anteriores fue posible concluir que la incorporación de PVA al CTS no confiere una mejora en la generación de nanofibras de CTS, ya que las nanofibras de mejor calidad se obtuvieron a concentraciones muy bajas de CTS, representando solamente un 10% del material, por lo tanto se decidió probar con otras alternativas descritas a continuación.

En la siguiente Tabla se resumen las condiciones de operación para la generación de fibras de PVA/CTS.

TABLA 3. Condiciones de operación para el electrohilado de PVA/CTS.

Condiciones de operación	***Ensayadas***	***Óptimas***
[CTS] *(wt.-%)*	1-9	8 – 9
[PVA] *(wt.-%)*	7.8 - 9	9
Proporciones (PVA/CTS)	50:50 60:40 70:30 80:20 90:10	80:20 90:10
[AcOH]*(%v.v)*	80 - 90	90
[HCl] *M*	0.4	-
Voltaje *(kV)*	6 – 26	11.5 – 12.5
Temperatura *(°C)*	amb - 70	40
Flujo másico (*mL/min)*	0.0025 - 3	0.01 – 0.015
Distancia al colector *(cm)*	4 - 20	15

7.5. Generación y caracterización de nanofibras de quitosano puro.

Dado que las concentraciones de CTS en la nanofibras obtenidas en la combinación PVA/CTS eran bajas se decidió explorar otra metodología para el electrohilado de CTS, la cual emplea una mezcla de ATF y CH_2Cl_2 como disolventes, ya que se describen algunos factores que pudiesen favorecer un electrohilado de calidad (Hasegawa *et al.*, 1992):

- El ATF forma sales con los grupos amino del CTS lo que destruye la interacción rígida entre las moléculas de CTS, facilitando así el electrohilado.
- La alta volatilidad de ATF es propicia para la rápida solidificación del chorro electrificado de la disolución de CTS-ATF.

Por lo tanto, se procedió a la elaboración de una batería de soluciones de CTS a diferentes concentraciones a fin de alcanzar la óptima para el electrohilado, disolviendo el biopolímero en una mezcla de ATF-CH_2Cl_2 (7:3).

Las soluciones se mantuvieron en agitación constante hasta por 24 h para disolver completamente el CTS (Figura 22).

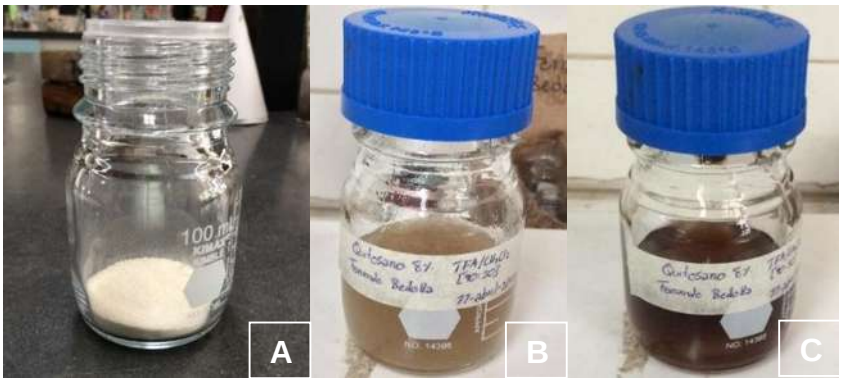


FIGURA 22. Apariencia del CTS antes y después de su disolución. A) CTS en polvo, B) CTS al momento de agregar la mezcla de disolventes (ATF/CH_2Cl_2) y C) solución de CTS después de 24 h.

Al intentar electrohilar las soluciones de CTS, la acidez de las soluciones produjo el endurecimiento y deterioro de las mangueras de PVC que se emplean para el transporte de la soluciones poliméricas desde la bomba de infusión a la aguja eyectora del equipo de electrohilado; por lo que se probaron algunos materiales más resistentes, encontrando que las mangueras de nylon eran capaces de resistir el transporte de dichas soluciones.

Nuevamente se inició con la búsqueda de las condiciones adecuadas para la formación de nanofibras, tomando como base las condiciones de operación ensayadas anteriormente (Tabla 4). Continuamente, fueron modificadas las variables tanto de la solución como las del equipo a fin de encontrar las condiciones óptimas para el electrohilado, las cuales se muestran en la Tabla 4.

TABLA 4. Condiciones ensayadas para el electrohilado de CTS en ATF/CH_2Cl_2.

Solución		***Variaciones en el Equipo***	
Concentración	CTS: 4, 5, 6, 7, 8 (wt.- %)	***Voltaje***	15 - 24 kV.
Disolvente	ATF: CH_2Cl_2 (7:3)	***Temperatura***	38 - 49° C.
		Flujo másico	0.01 – 0.1 mL/min.
pH	0 – 2	***Tipo de colector***	Plano y tambor rotatorio
		Distancia al colector	10 – 22 cm.

Inicialmente se utilizó un colector plano debido a la facilidad que presenta su manejo. Por medio de una simple inspección óptica fue posible observar la generación adecuada del jet para la formación de nanofibras al modificar las variables del equipo.

La formación del cono de Taylor junto con el aspersor de la solución polimérica produjo casi de manera instantánea la formación de nanofibras en el colector. Sin embargo, no fue posible obtener fibras poliméricas homogéneamente depositadas sobre la totalidad del área del colector (Figura 23).

Estos ensayos dieron como resultado la obtención de nanofibras no adecuadas que se encontraron depositadas tanto en las superficies metálicas del equipo como en el centro del colector plano, lo cual producía una acumulación (Figura 23C); aun cuando se retiraron fácilmente de la cubierta de aluminio del colector debido a su espesor.

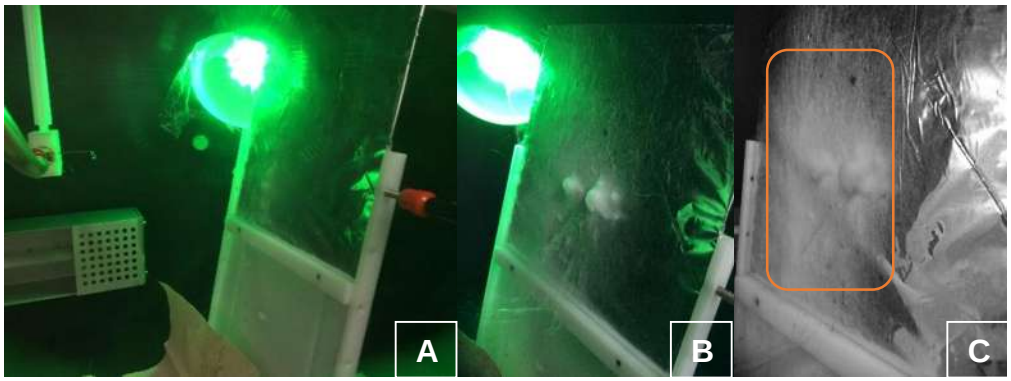


FIGURA 23. Electrohilado de la solución CTS-ATF/CH_2Cl_2 empleando el colector plano.
A) Formación del como de Taylor, B) y C) Recuadro naranja donde se observa la zona con presencia de fibras en el colector.

En el siguiente ensayo se empleó un colector de tambor rotatorio, (Figura 24A), con velocidad de giro entre 1800-3600 rpm. Los resultados fueron satisfactorios ya que se favoreció la dispersión de la solución polimérica sobre la

totalidad del área del colector (Figura 24C) obteniendo una fibra con un espesor adecuado, resistente y fácilmente extraíble del soporte.

Después de múltiples ensayos se determinaron y optimizaron las condiciones adecuadas para la obtención de nanofibras de CTS, las cuales se presentan en la Tabla 5.

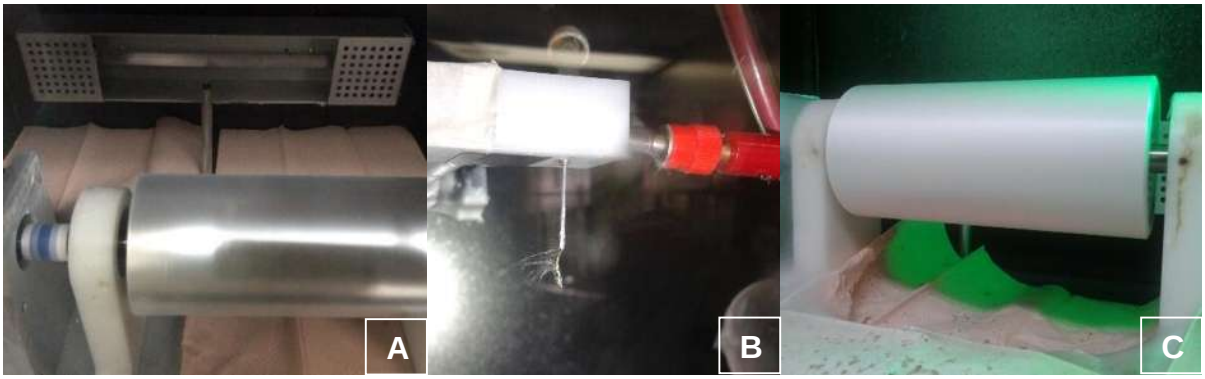


FIGURA 24. Electrohilado de la solución CTS-ATF/CH_2Cl_2 empleando el colector rotatorio. A) Colector sin fibras en la superficie metálica, B) Aspersión de la solución polimérica y C) Formación de nanofibras sobre el colector.

TABLA 5. Condiciones adecuadas para el electrohilado de CTS en ATF/CH_2Cl_2.

Solución		***Equipo***	
Concentración	CTS: 8 (wt.- %)	***Voltaje***	21 - 23 kV.
Disolvente	ATF: CH_2Cl_2 (7:3)	***Temperatura***	45 ° C.
pH	0 – 2	***Flujo másico***	0.08 mL/min.
		Tipo de colector	Tambor rotatorio
		Distancia al colector	20 cm.
		Velocidad del colector	1800 – 2000 rpm

Las nanofibras generadas empleando ambos colectores se sometieron a un tratamiento térmico en estufa (72 °C) por 16h para retirar el remanente de disolvente. Finalmente, las fibras fueron analizadas por Microscopía Electrónica de Barrido por Emisión de Campo (MEB-EC) (Figura 25).

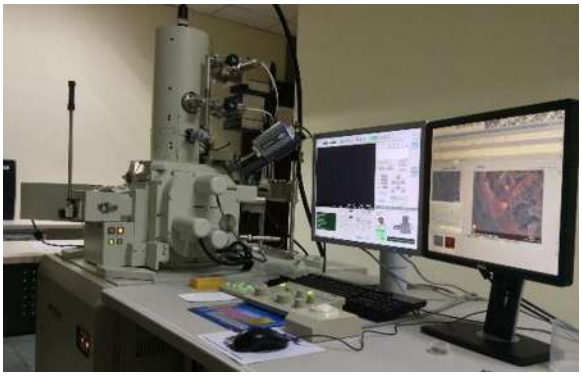


FIGURA 25. Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo (MEB-EC).

Las nanofibras obtenidas al utilizar el colector plano tiene una apariencia algodonosa y sus propiedades mecánicas no son adecuadas para su manipulación (Figura 26A), las micrografías obtenidas por MEB-EC muestran nanofibras que nos son rectas y más bien presentan ondulaciones, además se observa la existencia de múltiples espacios libres, lo cual reduce considerablemente su resistencia y la capacidad de funcionar como soporte (Figuras 26B y 26C).

El diámetro de las fibras se ubicó en un rango de 5–25 µm (Figura 26C), lo cual es considerablemente grande tomando en cuenta que las fibras que

funcionan adecuadamente como soporte tienen un diámetro no superior a los 0.5 µm (Sill *et al.,* 2008); sin embargo, es importante resaltar que estas fibras no presentan “perlas”.

Por su parte, la caracterización microscópica de las nanofibras obtenidas con el tambor rotatorio (Figuras 27A y 27B), demostró que la mayoría de estas se disponen en una dirección, lo cual se debe a la rotación en un solo sentido del colector.

La disposición homogénea de las nanofibras, la baja porosidad y la poca o nula presencia de defectos las convierte en candidatas potenciales para actuar como soporte del complejo [Ag_2-(afinina)](NO_3)$_2$. El diámetro promedio de las nanofibras es de 0.5 -1 µm, sin embargo fue posible observar fibras de hasta 3.17 µm de diámetro (Figura 27E).

De esta forma se determinaron los parámetros adecuados tanto del equipo como de la solución de CTS puro para la producción de nanofibras de buena calidad.

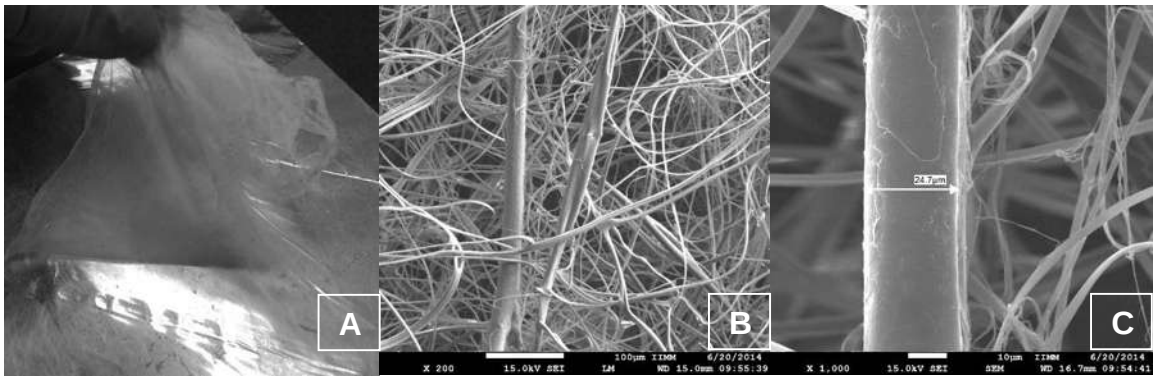


FIGURA 26. Nanofibras de CTS-ATF/CH_2Cl_2 obtenidas empleando el colector plano.
A) Consistencia algodonosa y facilidad de extracción de la fibra, B) y C) Micrografías de las nanofibras y espacios vacíos, nanofibras más gruesas con diámetros aprox. 25 µm.

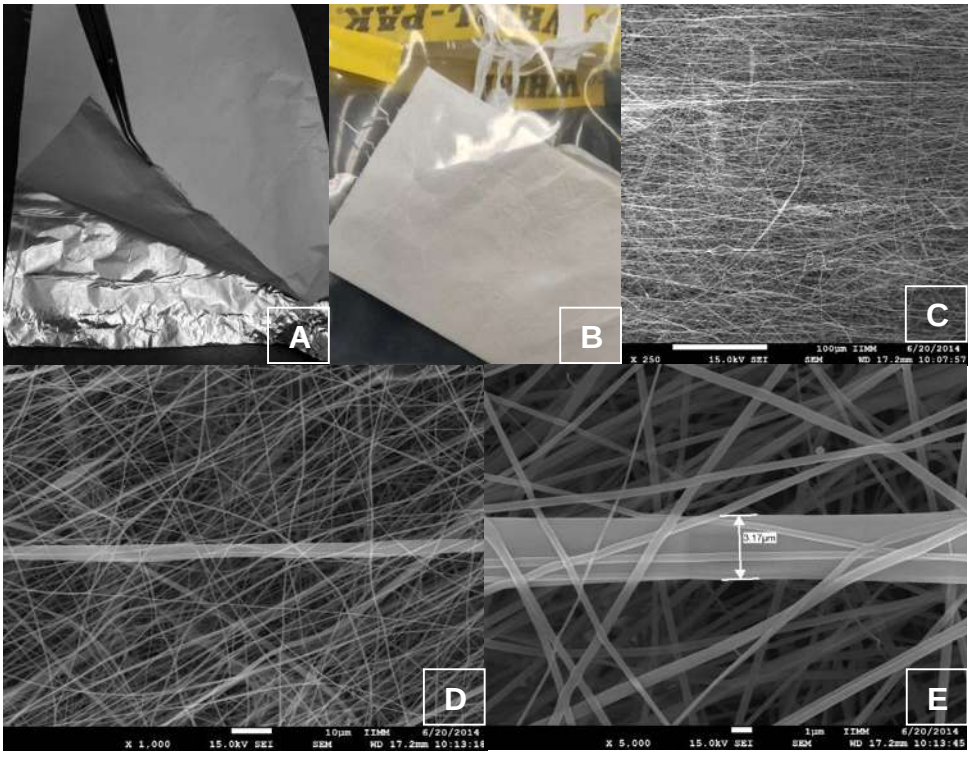


FIGURA 27. Nanofibras de CTS-ATF/CH_2Cl_2 obtenidas empleando el colector de tambor rotatorio. A) Facilidad de extracción de la fibra, B) uniformidad de la fibra electrohilada C), D) y E) micrografías de nanofibras, donde las más gruesas presentan un diámetro aprox. de 3.17 µm.

Una vez definidas las condiciones óptimas para la obtención de nanofibras de CTS, se exploró el electrohilado de CTS con afinina y de CTS con $AgNO_3$, con el propósito de determinar el comportamiento de la solución ácida de CTS y del proceso de electrohilado con la adición de cada uno de los componentes.

Para la generación de nanofibras de CTS-afinina se tomó como base la DL_{50} de la afinina que corresponde a 75 µg/mL para definir su concentración; cabe recordar que dicha concentración inhibe completamente el desarrollo del micelio de varias especies de hongos fitopatogénos (Molina *et al.*, 2004). Al adicionar la afinina en la solución CTS-ATF/CH_2Cl_2 (Figura 28 A y 28B), esta se disolvió tras agitarse durante algunos minutos. La solución no presentó cambio aparente por lo que resultó ser electrohilable empleando las condiciones de operación descritas anteriormente para el electrohilado de CTS puro.

Por medio de MEB-EC se observaron diferencias significativas en la morfología de las nanofibras CTS-afinina, respecto de las nanofibras de CTS puro, se resalta la función de estas como soporte para las moléculas de afinina que recubren casi la totalidad de la nanofibra, ya que es posible apreciar aglomerados de moléculas de afinina, los cuales poseen un aspecto oval compactado debido presumiblemente al vacío ejercido durante el análisis por MEB-EC; adicionalmente, se observan la presencia de algunas perlas de CTS en las nanofibras (Figura 28D).

En la Figura 29 se muestra el microanálisis por Dispersión de Energías de Rayos X (EDX) de la nanofibra de CTS-afinina, llevado a cabo en el MEB-EC. En este análisis se demuestra cualitativamente la presencia de átomos de C, N y O; los cuales constituyen a la afinina y al CTS; adicionalmente, se evidencia la presencia de flúor procedente de la mezcla de disolventes de ATF/CH_2Cl_2 empleado para solubilizar el CTS.

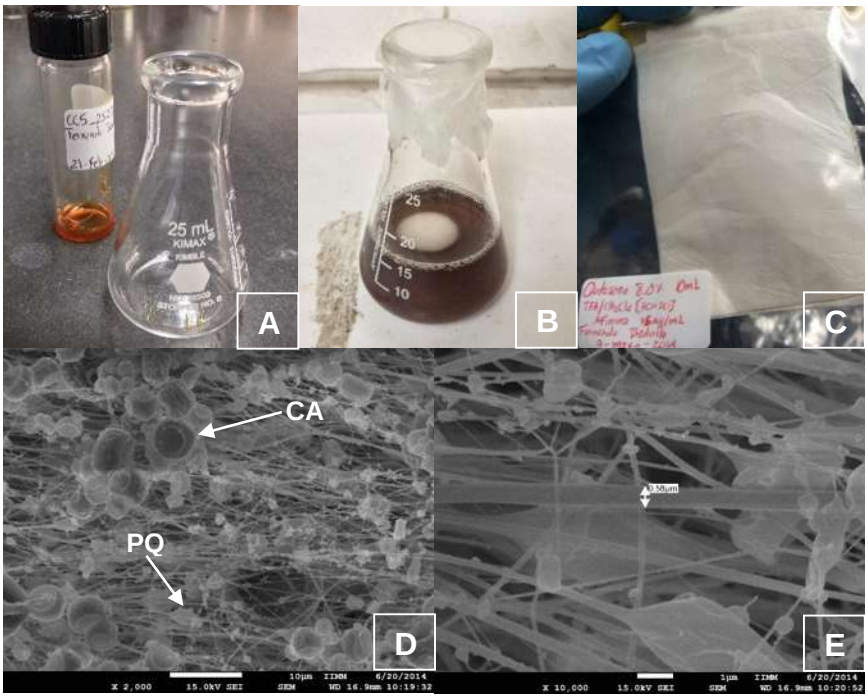


FIGURA 28. Nanofibras de CTS-afinina.
A) y B) Adición y mezcla de afinina con la solución de CTS-ATF/CH_2Cl_2 C) Nanofibra de CTS-afinina, D) micrografías de cúmulos de afinina (CA) sobre nanofibras y presencia de algunas perlas (PQ) y E) Diámetro máximo de las nanofibras aprox. de 580 nm.

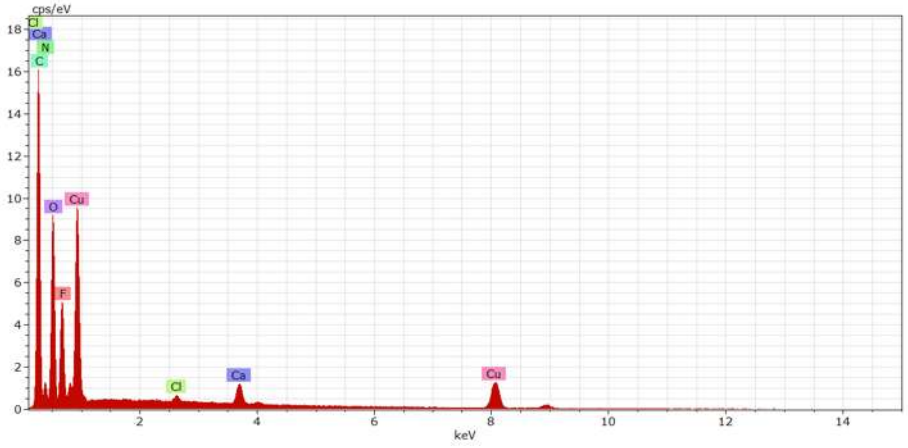


FIGURA 29. Microanálisis por Dispersión de Energías de Rayos X (EDX) de las nanofibras de CTS-afinina.

7.6. Ensayos para la síntesis de AgNPs en soluciones de quitosano

La obtención de AgNPs en solución de CTS fue explorada mediante dos técnicas. Después de obtener una solución adecuada se llevó a cabo el electrohilado de una solución de CTS-AgNPs.

La primer técnica examinada fue propuesta por Moharram *et al*. (2014), en la cual se preparan dos soluciones, una de CTS (6.92 mg/mL) en AcOH y otra de $AgNO_3$ (8.84 mg/mL) en agua desionizada. Al mezclar ambas soluciones en una proporción 2:1, respectivamente, se obtiene una solución homogénea la cual se mantiene en agitación constante y calentamiento por 16 h para obtener las AgNPs en solución. De acuerdo a sus resultados, el análisis por medio de espectroscopia UV-Vis y Microscopía Electrónica de Transmitancia (TEM) mostró que la temperatura y tiempo de calentamiento influyen en el tamaño y distribución final de

las AgNPs. A mayor temperatura, mayor tamaño y menor distribución de las nanopartículas.

Esta técnica fue ajustada a los requerimientos del electrohilado de las soluciones de CTS en ATF. Con el fin de mantener la relación de las concentraciones de CTS-$AgNO_3$ y dado que la de CTS en la solución de ATF/CH_2Cl_2 es del 8%, la concentración final de la sal de $AgNO_3$ empleada fue de 2.947 mg/mL. Se modificaron el tiempo de agitación a 8 h y la temperatura de calentamiento a alrededor de 50 °C ya que el empleo de ATF requiere de condiciones más suaves de operación debido a que es más volátil que el AcOH. Modificando las proporciones de CTS-$AgNO_3$ (2:1 y 3:1) se obtuvieron soluciones homogéneas, de baja viscosidad y acidez, las cuales al reducirse la plata se tiñeron de un morado opaco a beige (Figura 30).

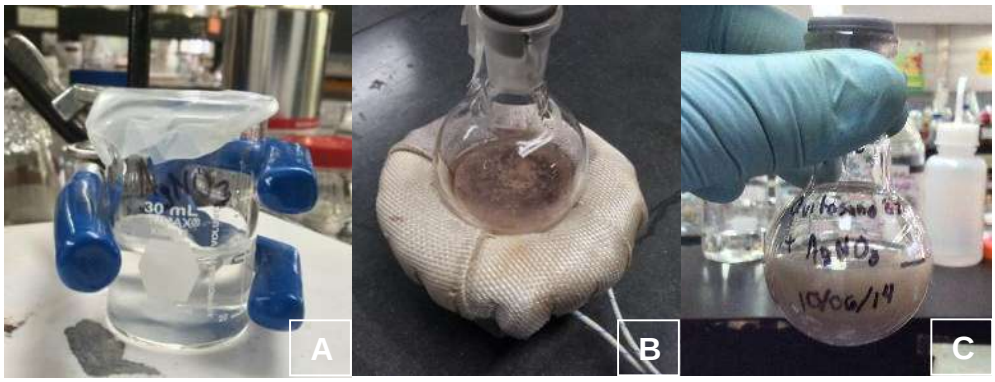


FIGURA 30. Producción de solución de CTS-$AgNO_3$.
A) Solución de $AgNO_3$, B) Adición del $AgNO_3$ a la solución de CTS-ATF/CH_2Cl_2 C) Solución final tras 8 h de calentamiento y agitación constante.

En el electrohilado de las soluciones preparadas se emplearon tanto el colector plano como el colector de tambor rotatorio. Fue posible apreciar la escasa formación de nanofibras en una sección cuando se empleó el colector plano, así

como una capa formada por la eyección de gotas de solución polimérica hacia el colector. Al intentar encontrar las condiciones adecuadas de electrohilado, con el incremento en la diferencia de potencial aplicada sobre la solución polimérica se propiciaba la formación de aglomerados de plata dentro de la solución, lo que continuamente bloqueaba el paso de la solución de la punta metálica al colector evitando la generación de nanofibras, aunado a una mayor carga electrostática en la superficie de la manguera lo cual provocaba descargas eléctricas que pudieran dañar tanto al equipo de electrohilado como a la bomba inyectora. Las condiciones de operación exploradas para el electrohilado se muestran en la Tabla 6.

La segunda técnica empleada para la producción de nanopartículas de plata consistió en la exposición directa de la solución de CTS-$AgNO_3$ en una proporción (2:1) a radiación solar por 30 minutos. Transcurrido este tiempo la solución marrón se tornó morada indicando la reducción de la plata. Sin embargo, esta solución presentó las mismas complicaciones que la anterior al ensayar el electrohilado (Figura 31).

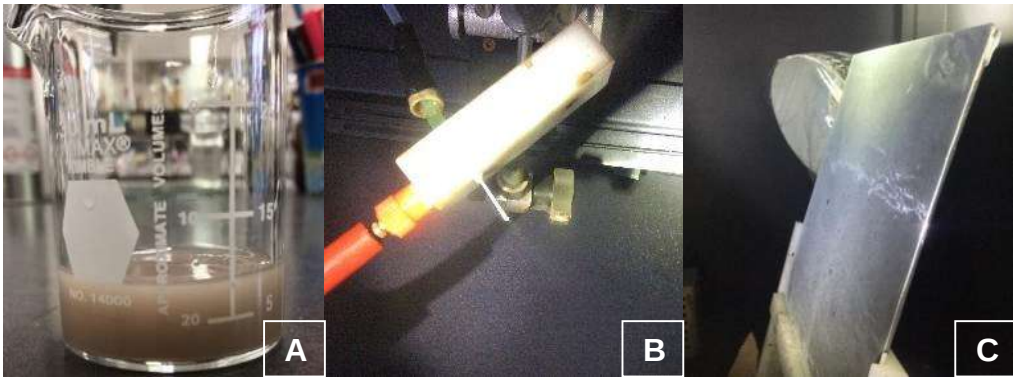


FIGURA 31. Ensayo de electrohilado de la solución CTS-$AgNO_3$ reducida por radiación solar. A) Aspecto de la solución reducida B) Aspersión de la solución polimérica hacia el colector, C) Evidencia iniciales de la formación de nanofibras sobre la base del colector.

Solución		***Equipo***	
Concentración	CTS: 8 (wt.- %) Sal de $AgNO_3$: 2.947 mg/mL	***Voltaje***	20 - 25 kV.
		Temperatura	42 - 45 ° C.

Disolvente	ATF: CH_2Cl_2 (7:3)	***Flujo másico***	0.05 - 0.1 mL/min.
		Tipo de colector	Plano y tambor rotatorio
pH	0 – 2	***Distancia al colector***	20 - 25 cm.
		Velocidad del colector	1200 – 2000 rpm

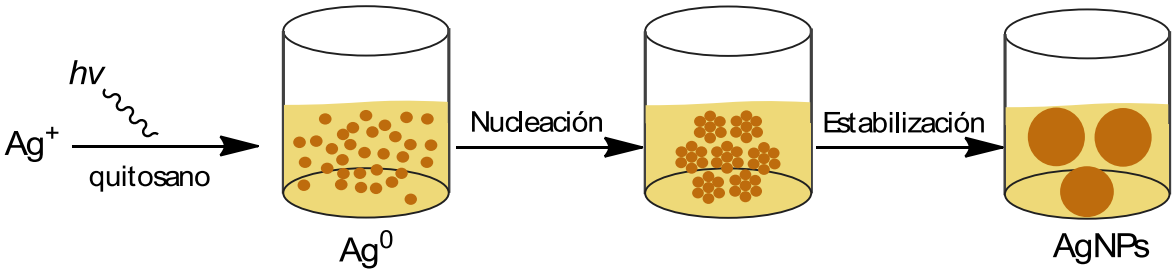
TABLA 6. Condiciones ensayadas para el electrohilado de la solución CTS-$AgNO_3$.

7.7 Síntesis y caracterización de AgNPs en solución de quitosano por el método de foto-reducción

Por medio del método de foto-reducción fue posible generar AgNPs a partir de soluciones de CTS 2% en AcOH 1%, con diferentes concentraciones de $AgNO_3$ (1, 5 y 10 mM), las cuales exhiben una importante actividad antimicrobiana (Hong *et al.*, 2007), de igual manera, se realizó la reducción del $AgNO_3$ presente en el complejo $[Ag_2$-(afinina)$](NO_3)_2$ (75 µg/mL) sintetizado.

El método de foto-reducción consistió en exponer las soluciones de CTS antes mencionadas a la radiación solar durante 2 h, para asegurar una óptima absorción de luz ultravioleta (UV) (Esquema 2). Pasado este tiempo las soluciones turbias se colorearon de anaranjado a morado, y hasta un café intenso dependiendo de la concentración de $AgNO_3$ empleada (Figura 32). Las

interacciones de coordinación entre los iones de plata y los grupos amino del CTS se llevan a cabo por quelación (López *et al*., 2013).



ESQUEMA 2. Generación de las AgNPs por Foto-reducción en solución de CTS.

Posteriormente, por medio del espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific, Genesys 10S) se obtuvieron los espectros de absorbancia de las soluciones (Figura 33), encontrando para todas ellas una banda de absorción característica que revela la presencia de las AgNPs entre 390-420 nm (El-Rafie *et al*., 2011; Lee *et al*., 2014).

FIGURA 32. Soluciones de CTS 2% en AcOH 1%, antes y después de la irradiación solar. A) Consistencia lechosa que presentan las soluciones con $AgNO_3$, B) con complejo $[Ag_2\text{-(afinina)}](NO_3)_2$, C) con $AgNO_3$ a concentraciones 1y 10 mM.

De esta forma se verifica la eficacia de la técnica en la síntesis de nanopartículas metálicas donde el polímero actúa como agente reductor,

dispersante y estabilizante de las mismas. Cabe recordar que la reducción de la sal metálica se lleva a cabo empleando AcOH.

Una vez verificada la formación de AgNPs en todas las soluciones poliméricas preparadas en AcOH, se prosiguió con la elaboración biopelículas a partir de estas soluciones; las cuales se preparan vertiendo las soluciones poliméricas en cajas Petri y tratadas térmicamente en una estufa a 68 °C durante 6 h para evaporar el disolvente (Figura 34A). Una vez obtenidas las biopelículas se fragmentaron en trozos más pequeños para facilitar su redisolución en ATF/CH_2Cl_2 en agitación constante, lo cual tomó de 3 a 4 días hasta la obtención de una solución homogénea y sin residuos (Figuras 34B y 34C).

Es importante mencionar que este paso es necesario realizarlo debido a que las soluciones poliméricas de AcOH no son viables para la producción de nanofibras por el método de electrohilado de acuerdo los resultados experimentales, además de que las soluciones de ATF/CH_2Cl_2 no permiten la reducción de la sal metálica.

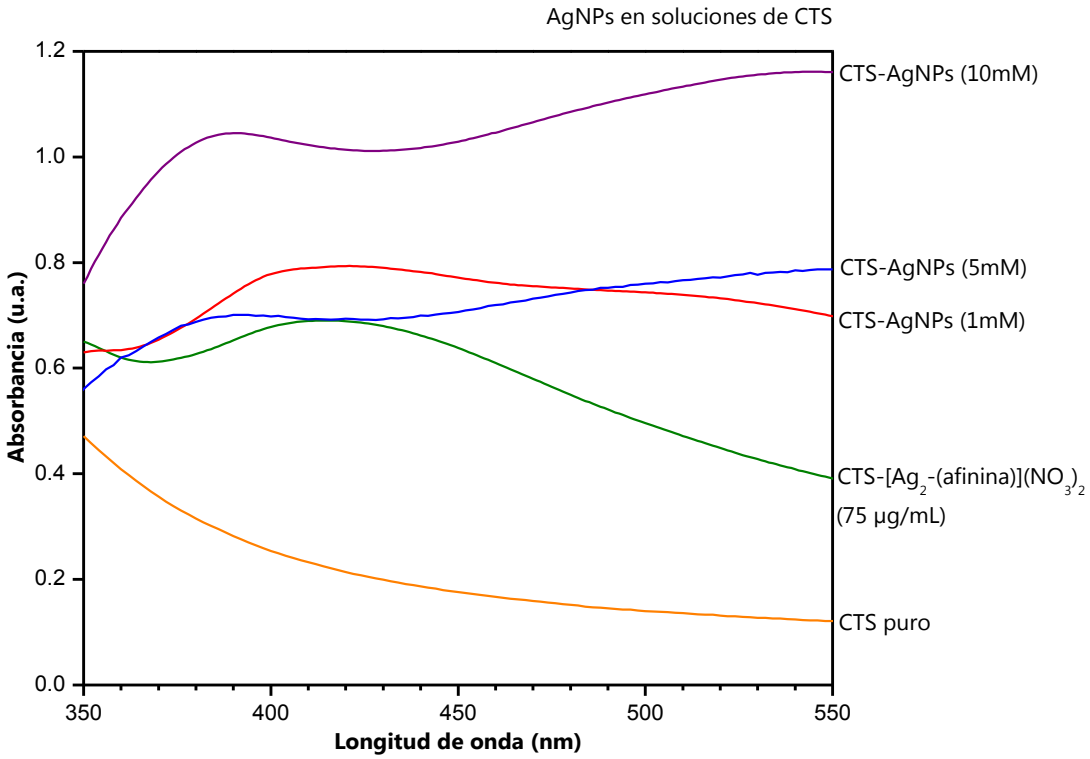


FIGURA 33. Espectros Uv-Vis de las soluciones de CTS 2% en AcOH 1%, empleando el complejo [Ag_2-(afinina)](NO_3)$_2$, diferentes concentraciones de $AgNO_3$, y CTS puro, donde se revela la presencia de AgNPs gracias a la banda de absorción entre 390 – 420 nm.

FIGURA 34. Preparación de soluciones para Electrohilado.
A) Soluciones de CTS con diferentes concentraciones de $AgNO_3$, B) Reducción de tamaño de las biopelículas, C) Redisolución de las biopelículas en ATF/CH_2Cl_2.

7.8 Generación de nanofibras con AgNPs provenientes de $AgNO_3$ y del complejo $[Ag_2\text{-(afinina)}](NO_3)_2$

Posteriormente se inició con la búsqueda de las condiciones óptimas para el electrohilado de las soluciones preparadas, tomando como base las encontradas previamente para CTS puro en ATF/CH_2Cl_2. Las soluciones en ATF de CTS con sal de $AgNO_3$ y de CTS/afinina-AgNPs (complejo $[Ag_2\text{-(afinina)}](NO_3)_2$) presentaron una menor viscosidad comparadas con las soluciones de CTS puro, obteniendo inicialmente delgadas capas de material polimérico sobre el área superficial del colector, que diferían a las nanofibras de CTS (Figura 35). Debido a la baja concentración de CTS en la solución, la viscosidad disminuye, y debido a esto se produce un efecto denominado "electrospraying" en la cual se forman partículas en vez de fibras sobre el colector (Li-Wang, 2013); por lo cual se optó por incrementar la concentración de CTS en cada una de las soluciones (Figura 36).

Asimismo se encontró una relación entre la concentración de Ag^+ en las soluciones y la viscosidad; a mayor concentración de Ag^+ en las soluciones, menor viscosidad y por consiguiente mayor concentración de CTS necesaria para obtener una nanofibras de calidad.

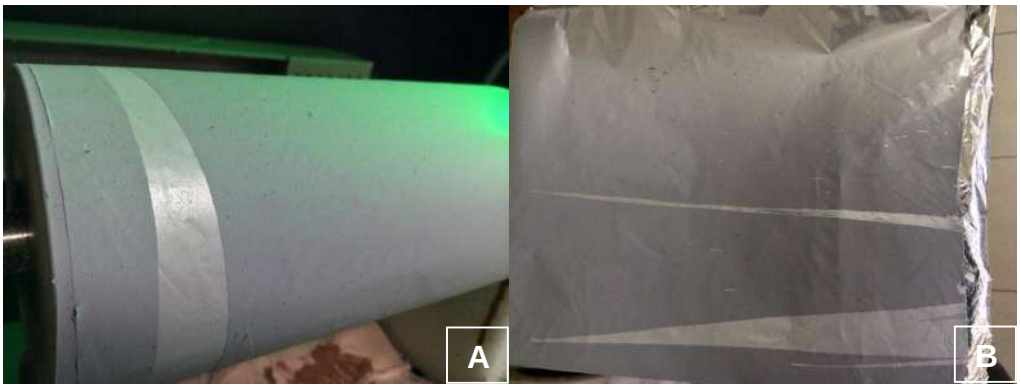


FIGURA 35. Ensayo de Electrohilado de soluciones de CTS con $AgNO_3$.
A) Capa polvosa uniforme sobre el colector metálico, B) Detalle del escaso grosor de la capa polvosa y coloración morada de la solución empleada.

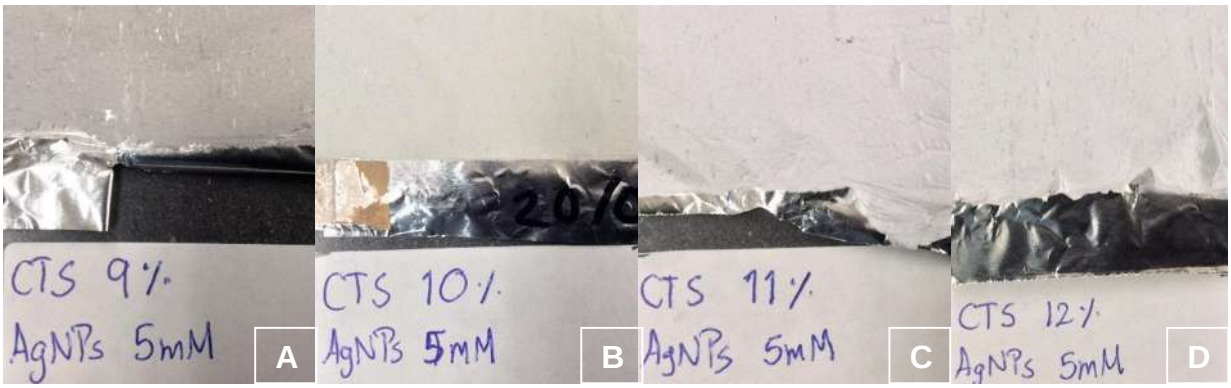


FIGURA 36. Detalle morfológico de fibras electrohiladas, con creciente concentración de CTS y constante concentración de AgNPs. El grosor en A no es suficiente puesto que se logra apreciar la base metálica. El grosor en D es óptimo debido a que la fibra recubre el área superficial de la base.

Para cada película de nanofibras generada (CTS, CTS-afinina, CTS- $AgNO_3$ CTS-AgNPs, CTS/afinina-AgNPs y CTS/afinina+AgNPs se emplearon alrededor de 14 mL de solución polimérica, produciendo así nanofibras de buena calidad con resistencia mecánica, de fácil manejo y fácilmente extraíbles del colector metálico (Figura 37).

En la Tabla 7 se presentan las condiciones de operación óptimas para el electrohilado de las soluciones poliméricas, las concentraciones de CTS, afinina y $AgNO_3$ empleadas, así como los parámetros de operación del equipo.

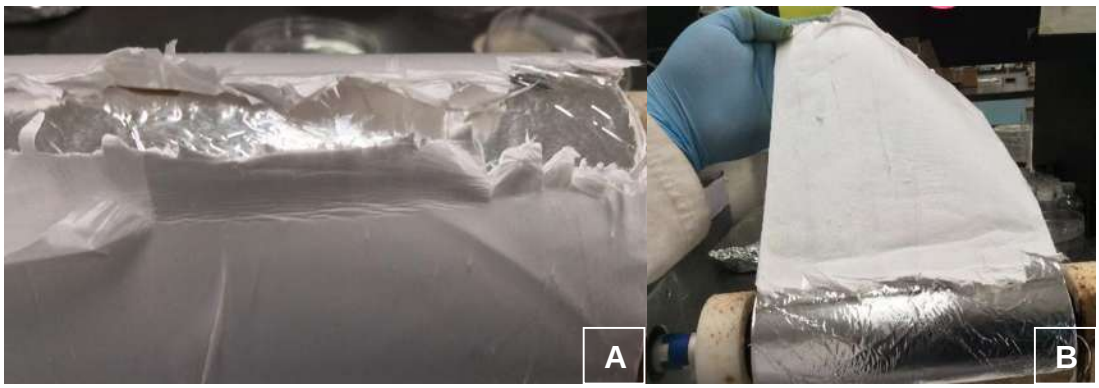


FIGURA 37. Fibra de CTS 9% en ATF/CH_2Cl_2 con [Ag_2-(afinina)]$(NO_3)_2$.
A) Se detalla el grosor de la fibra que cubre el aluminio del colector metálico B) Fibra que cubre la totalidad del colector siendo retirada de este.

A continuación se muestran las condiciones de operación de seis nanofibras, en las cuales se puede observar que al modificar la presencia y/o concentración de alguno de los componentes empleados los parámetros del equipo deben ser modificados a fin de obtener nanofibras adecuadas.

TABLA 7. Condiciones de operación para el Electrohilado de las soluciones poliméricas.

Condiciones de operación	***Soluciones***					
[Complejo [Ag_2-(afinina)]$(NO_3)_2$] *µg/mL*	-	-	75	-	-	-
[CTS] *(wt.-%)*	8	8	9	9	12	12
[Afinina] *µg/mL*	-	75	-	75	-	-
[$AgNO_3$] *mM*	-	-	-	0.667	1	5
Voltaje *(kV)*	21 – 23	21 – 23	33.3	35	30	36.13
Temperatura *(°C)*	Ambiente					
Flujo másico *mL/min)*	0.08	0.08	0.025	0.01	0.045	0.038
Distancia al colector *(cm)*	20	20	20 - 22	20 - 22	20 - 22	20 - 22
Velocidad del colector *(rpm)*	1800-2000	1800-2000	~1700	1800-2000	~2600	~2300

Por otro lado, debido a la toxicidad que representa el ATF remanente en las nanofibras, resulta necesario explorar una técnica que permita retirarlo, asimismo analizar los efectos macro y microscópicos de este tratamiento sobre las nanofibras.

7.9 Tratamiento alcalino para la neutralización del ATF presente en las nanofibras de quitosano

Inicialmente se realizaron ensayos empleando distintos disolventes a fin de encontrar aquel que no solubilizara la fibra y la deformara lo menos posible ya que al contacto con estos la fibra pierde su resistencia mecánica y flexibilidad (Tabla 8).

El CTS en su estado puro es soluble solo en soluciones ácidas por lo que en agua y demás solventes polares y no polares es insoluble; sin embargo, la solubilidad del CTS se modifica al estar en forma de fibra, lo cual la hace soluble en agua debido a la interacción del ion trifluroacetato con el grupo amino protonado del CTS; al emplear una base fuerte se extrae al ATF en forma de sal y se desprotona el grupo amino dejándolo neutro, de esta forma vuelve a ser insoluble en agua (Supaphol *et al*, 2006) (Figura 38).

Dentro de las bases examinadas destacan las soluciones acuosas de NaOH 1M y Na_2CO_3 5M así como la solución NaOH 1M en metanol; encontrando hasta el momento a esta última como la opción más viable para llevar a cabo la neutralización puesto que no deterioraba en gran medida las fibras.

Disolvente		***Disolvente***	
ÁcOH	✔	*ATF/CH_2Cl_2*	✔
Acetona	✘	*CH_2Cl_2*	✘
Agua	✔	*CH_3CN*	✘
AcoEt	✘	*THF*	✔
Hexano	✘	*CH_3OH*	✘

$CHCl_3$	✕		

TABLA 8. Solubilidad de las fibras de CTS.

Soluble (✔), no soluble (✕)

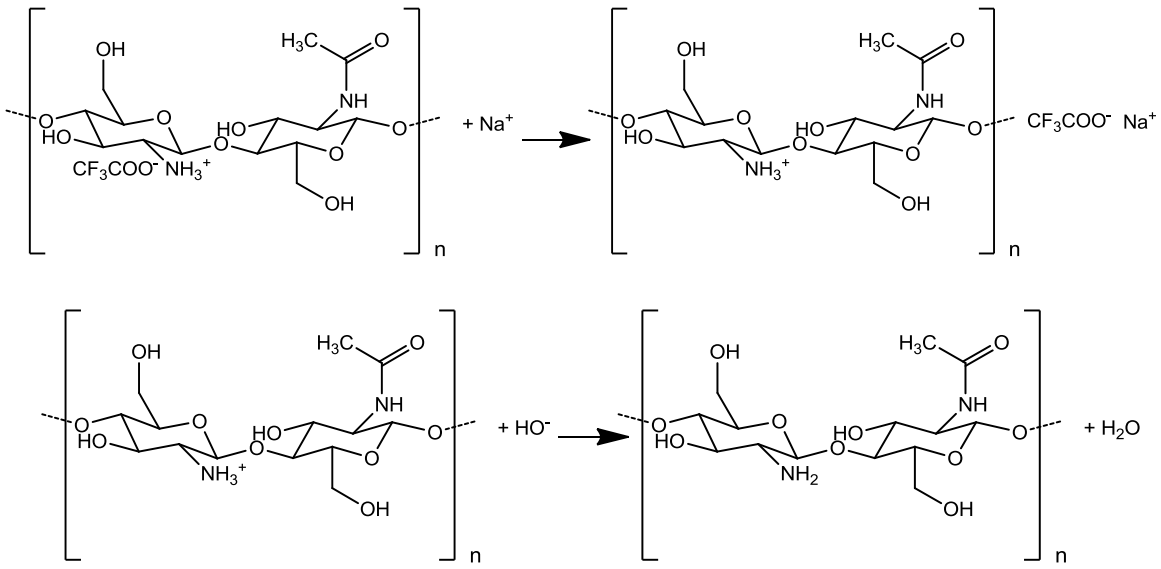


FIGURA 38. Esquema de reacción de la neutralización de las fibras de CTS al utilizar NaOH (Supaphol *et al*, 2006).

La neutralización se llevó a cabo en un recipiente cerrado en donde la fibra fue inmovilizada para evitar su deformación (Figura 39A), posteriormente se sumergió en la solución alcalina por 30 minutos para después lavar repetidamente la fibra con agua destilada hasta alcanzar un pH neutro (Figura 39B). Durante este

proceso se perdió la estructura elástica y resistente de la fibra dejando como resultado una película semitransparente (Figura 39C).

Una vez optimizada la técnica de neutralización se tomaron muestras de cada una de las fibras electrohiladas para realizarles este tratamiento, teniendo como propósito la comparación microscópica de la morfología de las fibras así como la presencia de las AgNPs entre las fibras tratadas y no tratadas.

El análisis por MEB-EC permite examinar de forma detallada la morfología de una muestra por medio de la técnica de Electrones Secundarios (ESI), la técnica de Electrones Retrodispersados (BSE) permite detectar en una imagen diferentes elementos químicos diferenciándolos por contraste de brillo, iluminándose de esta manera las zonas con presencia de átomos más pesados que el resto.

Asimismo es posible realizar un análisis semi-cuantitativo de la composición química de una muestra por medio del detector de Energía Dispersiva de Rayos X (EDX).

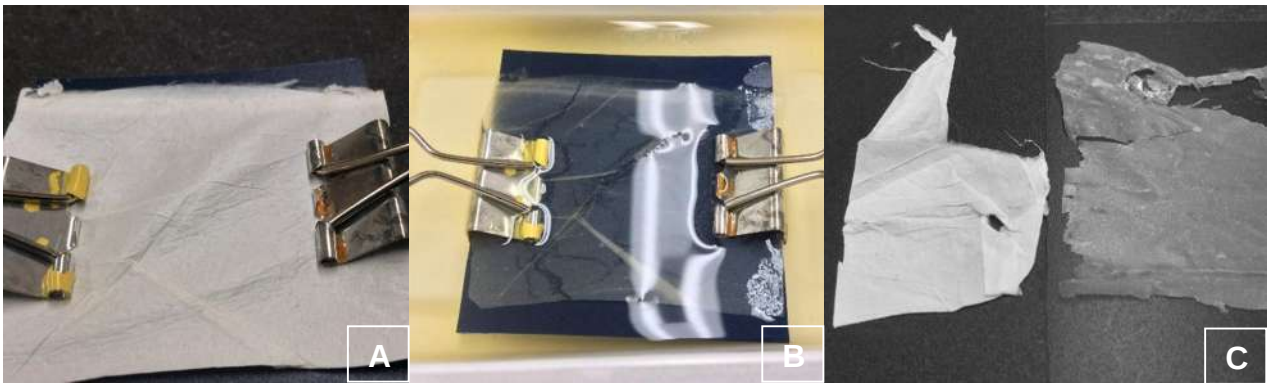


FIGURA 39. Proceso de neutralización de las fibras.
A) Inmovilización de la fibra para evitar su deformación, B) Introducción de la fibra en la solución alcalina, C) Comparación entre fibra antes y después del tratamiento alcalino.

Si bien estas herramientas permiten revelar la presencia y disposición de las AgNPs en las fibras, resulta imposible observarlas con detalle debido entre otras cosas: a su tamaño nanométrico, la resolución del equipo, el límite de detección para el análisis EDX, así como por el tratamiento de metalizado aplicado a las muestras no conductoras (orgánicas) para poder ser observadas, ya que el metalizado sobre las nanofibras puede llegar a confundirse visualmente con las AgNPs.

7.10 Caracterización microscópica de biopelículas y nanofibras que contienen sal de $AgNO_3$ y complejo $[Ag_2\text{-(afinina)}](NO_3)_2$

Entre de las numerosas fibras y biopelículas generadas, se eligió un grupo representativo para ser examinado en MEB-EC (Tablas 9 y 10), debido a que algunas de ellas no difieren tanto en su composición por lo cual se puede llegar a inferir las características morfológicas a partir de muestras similares

	Biopelículas		
No. de muestra	1	2	3
[Complejo [Ag_2-(afinina)](NO_3)$_2$)] *µg/mL*		75	75
[CTS] *(wt.-%)*	2	2	2
[Afinina] *µg/mL*			
[$AgNO_3$] *mM*	5		
Irradiación solar [1]*	✔	✔	✔
Tratamiento alcalino [2]*	✖	✖	✔

TABLA 9. Composición de las biopelículas analizadas por MEB-EC.

	Nanofibras							
No. de muestra	4	5	6	7	8	9	10	11
[Complejo [Ag_2-(afinina)]($(NO_3)_2$)] *µg/mL*								75
[CTS] *(wt.-%)*	12	12	8	8	8.5	8.5	9	9
[Afinina] *µg/mL*					75	75	75	
[$AgNO_3$] *mM*	5	5	10	10	0.667	0.667	0.667	
Irradiación solar [1]*	✓	✓	✓	✓	✗	✗	✓	✓
Tratamiento alcalino [2]*	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✗

TABLA 10. Composición de las nanofibras analizadas por MEB-EC.

[1]* para la generación de AgNPs en soluciones de CTS-AcOH aq
[2]* llevado a cabo una vez preparadas las biopelículas y electrohiladas las nanofibras
(✓) se llevó a cabo
(✗) no se llevó a cabo

El análisis SEI de la muestra 1 (Figura 40) muestra la uniformidad y morfología planar de la biopelícula, mientras que el análisis BSE (Figura 40B y 42C) por su parte muestra la presencia de AgNPs distribuidas homogéneamente sobre el área de la biopelícula. El microanálisis EDX (Figura 41) confirma la presencia de plata en la muestra.

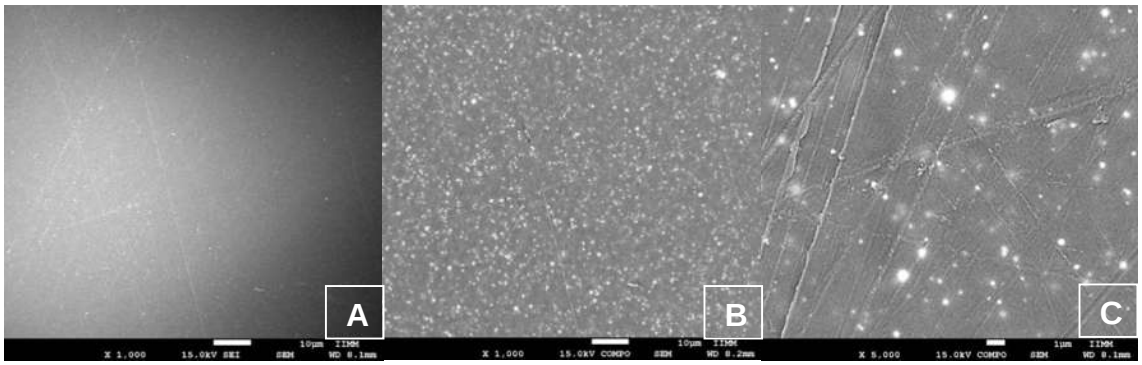
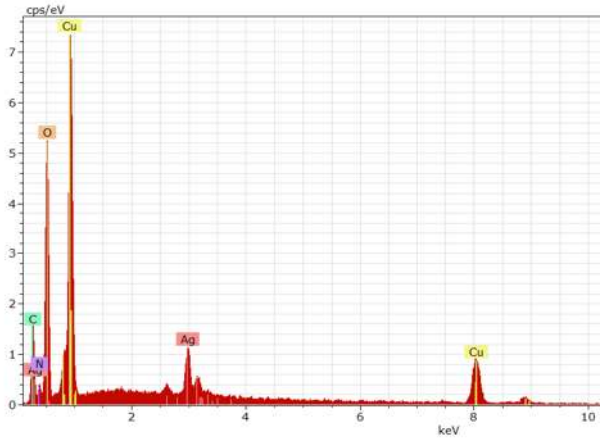


FIGURA 40. Micrografías de muestra 1 (biopelícula, CTS-AgNPS, 5mM). A) Obtenida por análisis SEI, mostrando la morfología uniforme y plana de la biopelícula B) y C) Evidencia por análisis BSE de la presencia de plata.



Análisis EDX Quantax Bruker Nano GmbH

Elemento	**[norm. at.%]**
Oxígeno	72.56576
Carbono	18.60242
Nitrógeno	5.400441
Plata	3.431378
Total	100

FIGURA 41. Microanálisis por Dispersión de Energías de Rayos X (EDX) de la muestra 1 (Figura 40C) y el porcentaje de los componentes elementales presentes en la muestra.

La muestra 2 es una biopelícula que contiene AgNPs provenientes de la fotoreducción del complejo $[Ag_2\text{-(afinina)}](NO_3)_2$ y su morfología se aprecia en la Figura 42A, se observa que la cantidad de AgNPs es significativamente menor al presentado en la muestra 1, lo cual se distingue por la menor cantidad de puntos luminosos sobre el área superficial de la biopelícula (Figura 42B).

Aun cuando la cantidad de AgNPs es menor, la presencia de la plata está dispersa de manera uniforme sobre la biopelícula lo cual se denota con el análisis EDX mostrado en la Figura 43.

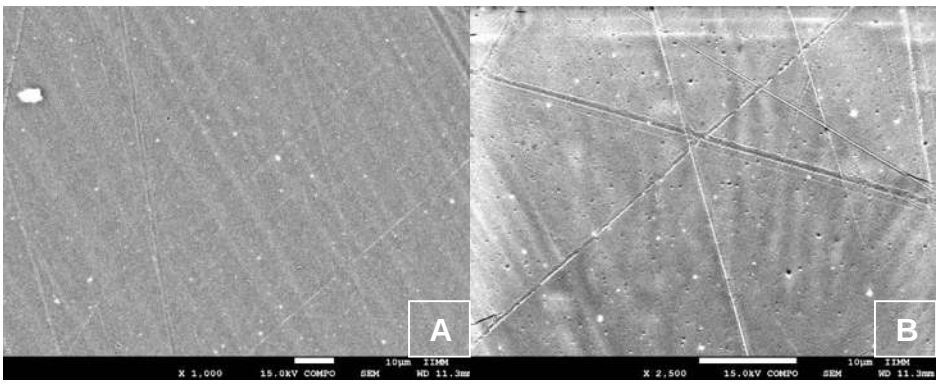
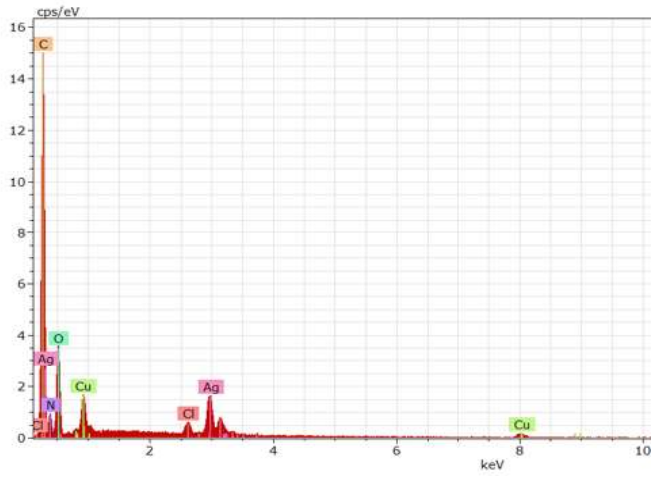


FIGURA 42. Micrografías de muestra 2 (biopelícula, CTS/afinina-AgNPs, 75µg/mL).
A) a 1000x y B) 2500x se observa la morfología uniforme y plana de la biopelícula, así como la evidencia de la presencia de plata por análisis BSE.



Análisis EDX Quantax Bruker Nano GmbH

Elemento	**[norm. at.%]**
Oxigeno	27.1179973
Carbono	56.7459403
Nitrógeno	13.9173328
Plata	1.82019482
Cloro	0.39853478
Total	100

FIGURA 43. Microanálisis por Dispersión de Energías de Rayos X (EDX) de la muestra 2 (Figura 42B) y el porcentaje de los componentes elementales presentes en la muestra.

La muestra 3 es la biopelícula de la muestra 2 a la cual se le realizó el tratamiento alcalino con NaOH 1M en MeOH para retirar el AcOH remanente, proveniente de la solución de CTS. Este procedimiento se realizó con el propósito de observar los efectos macro y microscópicos del tratamiento sobre las biopelículas.

Macroscópicamente se observó que al realizar el tratamiento alcalino las biopelículas se deforman, pierden elasticidad y se vuelven rígidas tras el secado.

Como se observa en la Figura 44 la morfología de la biopelícula se vio modificada por este tratamiento, donde es posible observar dos texturas dentro de la muestra, en la cual la biopelícula parece experimentar degradación.

Por otra parte también es posible apreciar que se mantiene la presencia de plata sobre la biopelícula, lo que indica que el tratamiento alcalino no remueve las AgNPs, esta evidencia también es soportada por el análisis EDX (Figura 45).

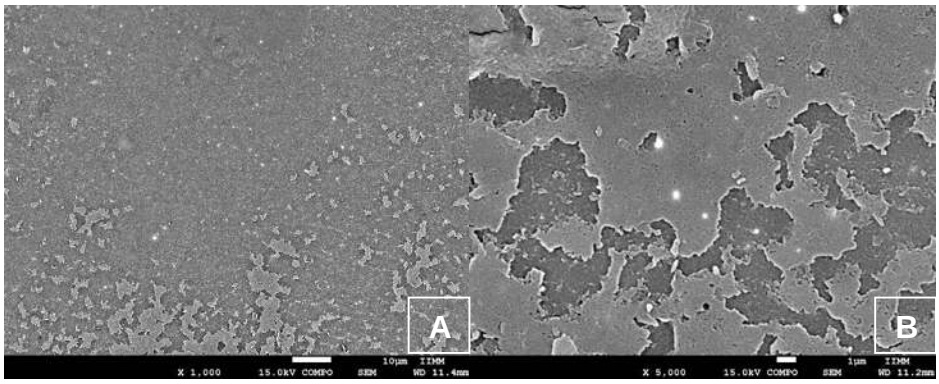
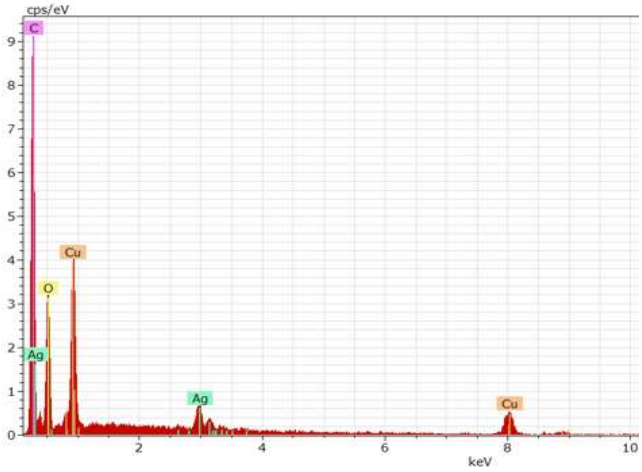


FIGURA 44. Micrografías de muestra 3 (biopelícula, CTS/afinina-AgNPs, 75µg/mL- tratamiento alcalino). A) a 1000x y B) 5000x se observa una modificación en morfología de la biopelícula, así como la evidencia de la presencia de plata tras el tratamiento alcalino.

No fue posible obtener micrografías de las biopelículas a un mayor aumento, ya que el haz de electrones del MEB-EC originaba una fisura dentro de la biopelícula, la cual se expandía anulando la posibilidad de analizar esa sección con mayor detalle debido a la degradación de la muestra por el haz.



Análisis EDX Quantax Bruker Nano GmbH

Elemento	[norm. at.%]
Oxigeno	36.55652
Carbono	62.19638
Plata	1.2471
Total	100

FIGURA 45. Microanálisis por Dispersión de Energías de Rayos X (EDX) de la muestra 3 (Figura 44) y el porcentaje de los componentes elementales presentes en la muestra.

Las micrografías de la muestra 4 (Figura 46) la cual contiene AgNPs en una concentración 5 mM exhibe una red de nanofibras ligeramente alineadas en una

dirección y otras de mayor diámetro curveadas. En las Figuras 46B y 46C se muestra la homogeneidad en los tamaños de las nanofibras, pocos espacios vacíos, así como la presencia de cúmulos sobre algunas de las nanofibras.

La Figura 47A muestra nanofibras con diámetros un rango de 0.27-0.88 µm; asimismo haciendo una ampliación de esta micrografía, en las Figuras 47B y 47C es posible observar aglomerados de plata (visibles por análisis BSE) tanto embebidos como sobre la superficie de las fibras. El microanálisis EDX de la muestra 4 (Figura 48) confirma la presencia de plata.

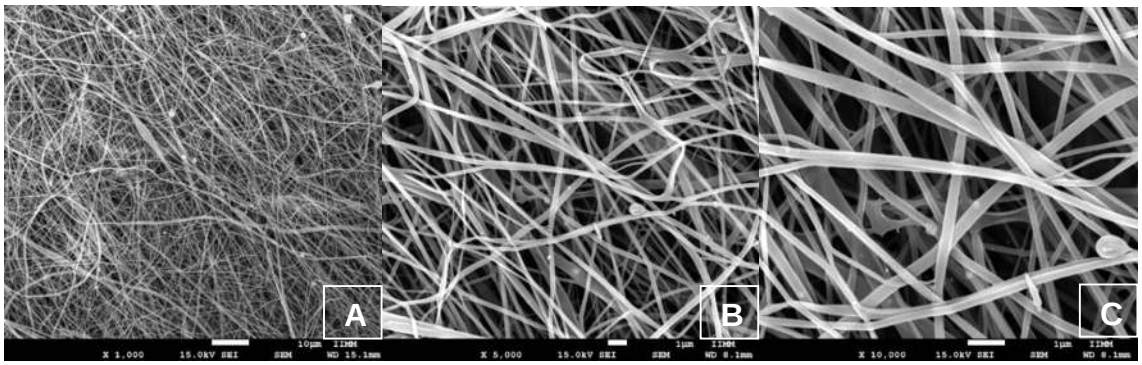


FIGURA 46. Micrografías de muestra 4 (nanofibra, CTS/AgNPs, 5mM). A) Obtenida por análisis SEI, B) Mostrando nanofibras ligeramente curveadas, C) Mostrando pocos espacios vacíos y relativa homogeneidad en los tamaños de las nanofibras.

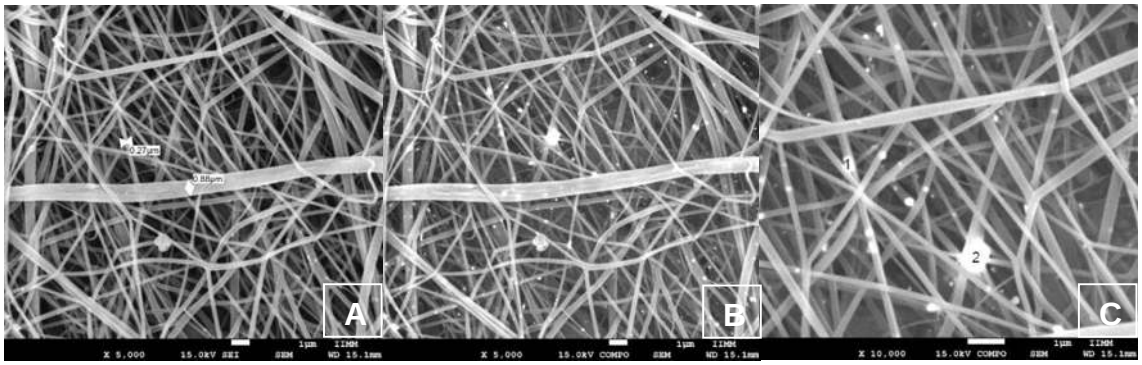
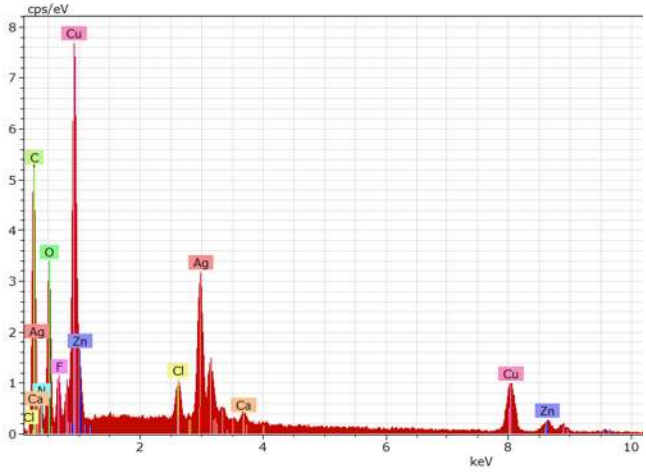


FIGURA 47. Micrografías de muestra 4 (nanofibra, CTS/AgNPs, 5mM). A) Obtenida por análisis SEI, mostrando diferentes diámetros de las nanofibras B) y C) Evidencia por análisis BSE de la presencia de plata sobre cúmulos de la nanofibra.



Análisis EDX Quantax Bruker Nano GmbH

Elemento	**[norm. at.%]**
Carbono	36.12581
Oxigeno	37.53742
Flúor	9.918512
Plata	5.892063
Nitrógeno	9.568682
Calcio	0.957505
Total	100

FIGURA 48. Microanálisis por Dispersión de Energías de Rayos X (EDX) de la muestra 4 (Figura 47C) y el porcentaje de los componentes elementales presentes en la muestra.

La muestra 5 representa la muestra 4 a la cual se le realizó el tratamiento alcalino para retirar el ATF remanente del proceso de generación de las nanofibras. Como se observa en la Figura 49A y 49B las nanofibras neutralizadas presentan una morfología similar a las recién electrohiladas, sin embargo estas sufren un ensanchamiento debido a la fusión entre fibras cercanas. Este acumulamiento de material, macroscópicamente se traduce en la perdida de las propiedades mecánicas de la nanofibra así como un cambio de apariencia la cual es más cercana a una biopelícula.

Por otra parte en la Figura 49C (obtenida por análisis BSE) es posible apreciar la presencia de algunos puntos luminosos sobre la película de nanofibras tratada; por lo que mediante el análisis EDX se confirma la presencia de plata sobre la muestra (Figura 50).

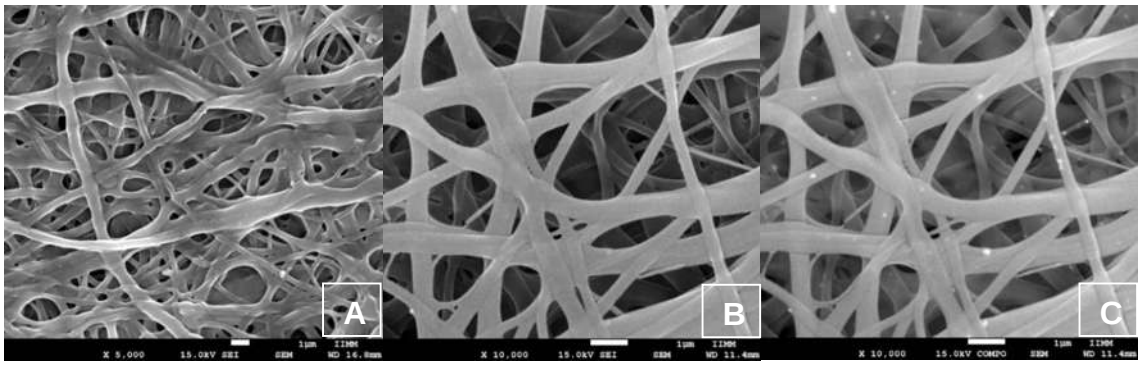
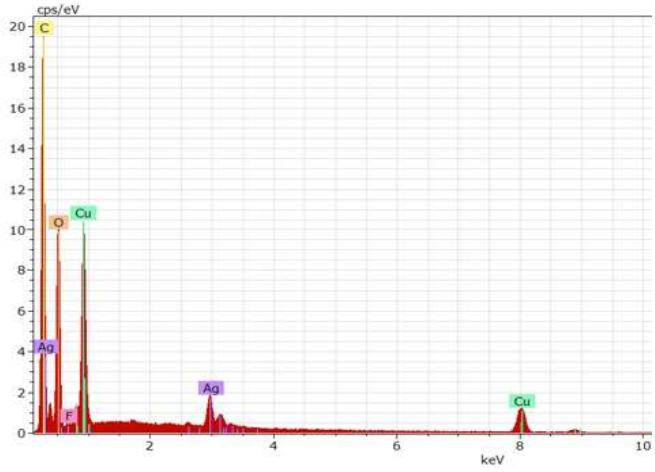


FIGURA 49. Micrografías de muestra 5 (nanofibra, CTS/AgNPs, 5mM – tratamiento alcalino). A) Obtenida por análisis SEI, nanofibras ensanchadas por B) y C) Evidencia por análisis BSE de la presencia de plata sobre cúmulos de la nanofibra.

Si se comparan las muestras que recibieron el tratamiento alcalino respecto de las que no, de acuerdo al análisis EDX, se observa que a las que se les aplicó el tratamiento poseen un menor porcentaje de plata. Esta disminución podría atribuirse a la disolución de la plata en el medio durante el tratamiento alcalino, lo que indica la liberación de AgNPs en biopelículas y nanofibras necesaria para poder presentar su actividad biológica (Figura 50).

El análisis EDX de la nanofibra muestra la presencia de Fluor que no fue retirado en su totalidad de la nanofibra. Si bien la concentración porcentual de este elemento disminuyó en comparación a las nanofibras que no recibieron el tratamiento, se puede asumir que el tratamiento requiere de más tiempo para liberar al ATF de la nanofibra.



Análisis EDX Quantax Bruker Nano GmbH

Elemento	[norm. at.%]
Carbono	54.78251
Oxigeno	42.37869
Flúor	1.511804
Plata	1.326996
Total	100

FIGURA 50 Microanálisis por Dispersión de Energías de Rayos X (EDX) de la muestra 5 (Figura 49C) y el porcentaje de los componentes elementales presentes en la muestra.

El siguiente análisis corresponde a la muestra 6, la cual contiene una concentración 10 mM de $AgNO_3$, la cual se adicionó a la solución de CTS 8% en ATF/CH_2Cl_2. Esta mezcla fue expuesta a la radiación solar directa, sin embargo, debido a la formación de la sal de trifluoroacetato de CTS la formación de las AgNPs no fue favorecida lo que se comprobó mediante por Espectroscopia UV-Vis. Sin embargo, se observó una importante disminución en la viscosidad de la solución.

En la Figura 51, se observan fibras curveadas dispuestas aleatoriamente, de tamaño homogéneo y con pocos espacios vacíos. Es posible apreciar en la Figura 51B cúmulos concentrados de plata soportadas sobre algunos sitios de las nanofibras; caso contrario cuando hay presencia de AgNPs, las cuales dispersan a todo lo largo y ancho de las nanofibras.

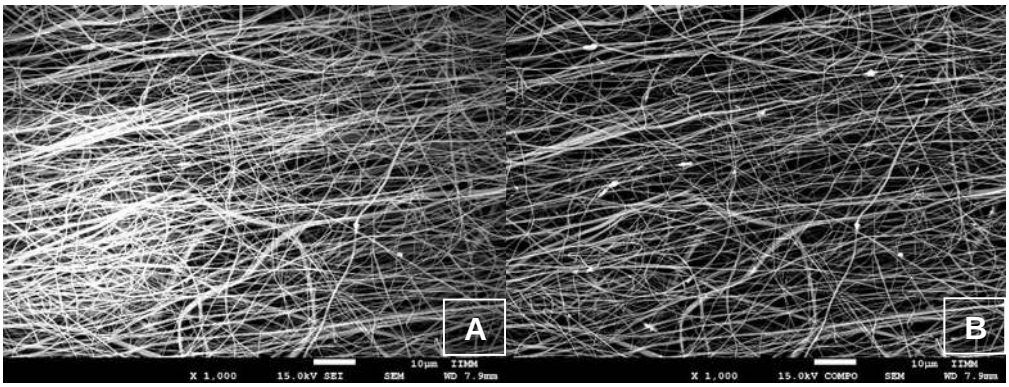


FIGURA 51. Micrografías de muestra 6 (nanofibra, CTS/$AgNO_3$, 10mM). A) Obtenida por análisis SEI, B) Obtenida por análisis BSE donde los puntos luminosos corresponden a cúmulos de plata.

En la Figura 52A se aprecia un aglomerado de material sobre una de las nanofibras antes mencionadas; el análisis BSE de la Figura 52B confirma la presencia de $AgNO_3$ en forma de aglomerados así como en otros espacios igualmente iluminados, asimismo se observa un relativo diámetro homogéneo de las nanofibras (0.27-0.32 µm). En la Figura 52C, un acercamiento a este aglomerado permite observar con buena resolución el metalizado sobre el área superficial de las nanofibras, además el análisis EDX de la muestra 6 (Figura 53) confirma la presencia de plata sobre las nanofibras.

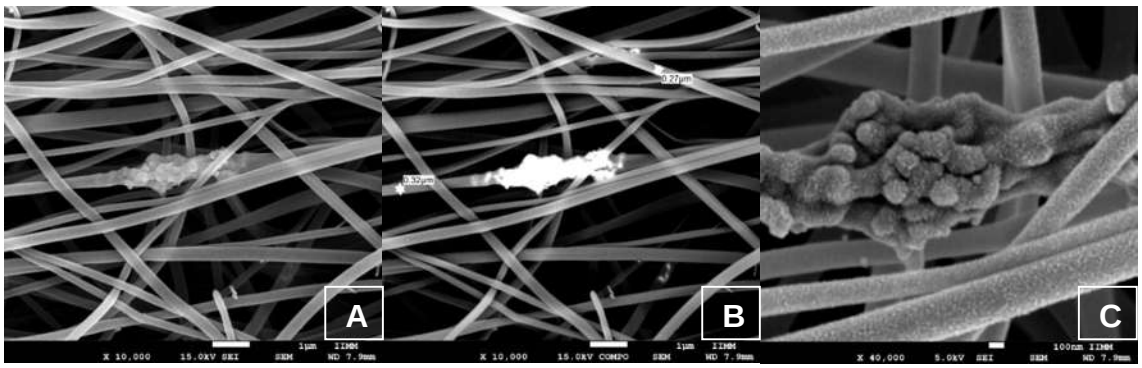
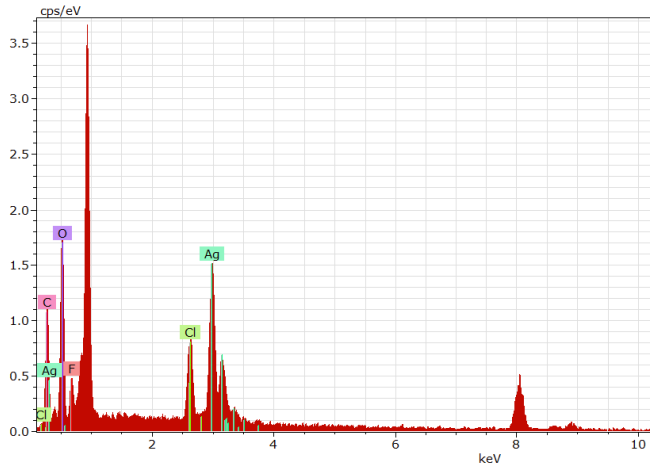


FIGURA 52. Micrografías de muestra 6 (nanofibra, CTS/$AgNO_3$, 10mM). A) Obtenida por análisis SEI, B) Obtenida por análisis BSE y mostrando tamaño de los diámetros de las nanofibras, C) Detalle del metalizado sobre las nanofibras y el aglomerado de $AgNO_3$.



Análisis EDX Quantax Bruker Nano GmbH

Elemento	**[norm. at.%]**
Carbono	27.23516525
Oxigeno	50.03629968
Flúor	11.41478585
Plata	7.55164351
Cloro	3.762105722
Total	100

FIGURA 53. Microanálisis por Dispersión de Energías de Rayos X (EDX) de la muestra 6 (Figura 52B) y el porcentaje de los componentes elementales presentes en la muestra.

La siguiente muestra analizada consiste en la película de nanofibras compuesta por CTS y sal de $AgNO_3$ a una concentración de 10mM, a la cual se le realizó el tratamiento alcalino. En la Figura 54A es posible apreciar el ensanchamiento de las nanofibras tal y como ocurrió en la muestra 5, con la diferencia de que los aglomerados de plata están muy distantes entre sí. Un acercamiento a 5000x permite observar con mayor detalle la fusión de algunas fibras lo que produce fibras de mayor diámetro (Figura 54B). Por medio del análisis BSE es posible apreciar en la misma sección algunos aglomerados de plata sobre la superficie y dentro de las fibras, los diámetros de las fibras oscilan entre 0.27–1.16 µm (Figura 54C).

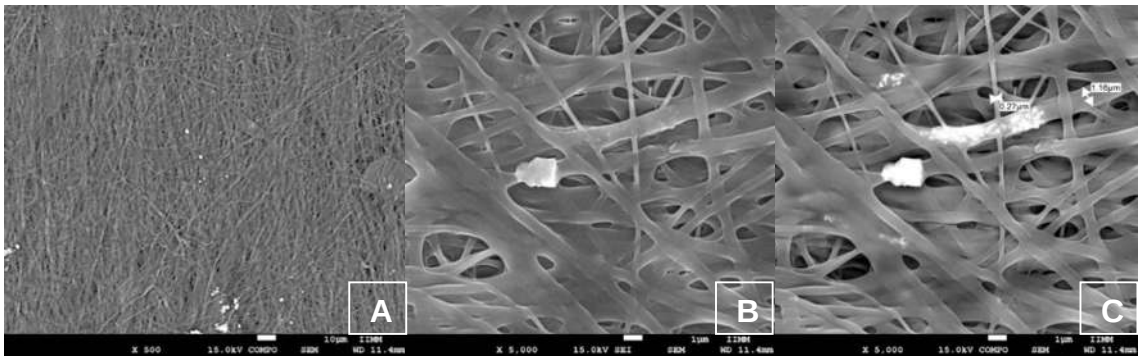
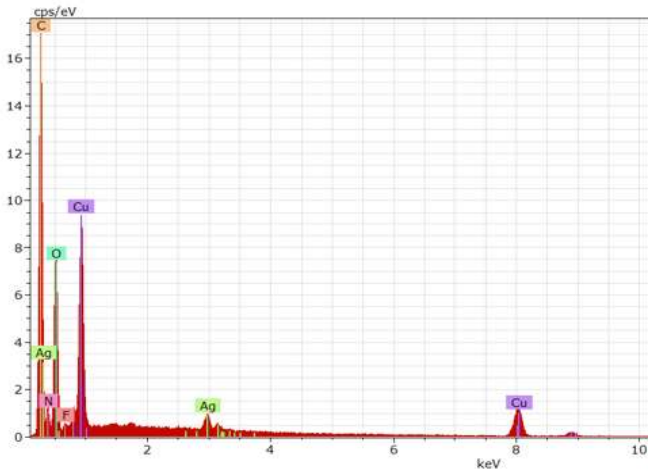


FIGURA 54. Micrografías de muestra 7 (nanofibra, CTS/$AgNO_3$, 10mM – tratamiento alcalino). A) Obtenida por análisis SEI, B) Obtenida por análisis BSE y mostrando tamaño de los diámetros de las nanofibras, C) Detalle del metalizado sobre la nanofibra y el cumulo de $AgNO_3$.

El análisis EDX de la muestra 7 (Figura 55) permitió confirmar la presencia de plata en las nanofibras, aun después del tratamiento alcalino. La presencia de Fluor en la nanofibra (como en la muestra 5), indica que el tratamiento alcalino requiere realizarse por más de 30 minutos para liberar al ATF remanente. Sin embargo la concentración porcentual del Fluor disminuyo del 11.41 al 2.25% de la muestra 6 a la 7.



Análisis EDX Quantax Bruker Nano GmbH

Elemento	[norm. at.%]
Carbono	58.59027
Oxigeno	38.48833
Flúor	2.250791
Plata	0.67061
Total	100

FIGURA 55. Microanálisis por Dispersión de Energías de Rayos X (EDX) de la muestra 7 (Figura 54C) y el porcentaje de los componentes elementales presentes en la muestra.

La muestra 8 es en una película de nanofibras, la cual contiene afinina y $AgNO_3$ sin coordinar pero en la misma proporción, emulando la concentración del complejo $[Ag_2\text{-(afinina)}](NO_3)_2$.

La sal de $AgNO_3$ no se sometió a irradiación solar con el propósito de observar un posible efecto sinérgico entre la afinina y el $AgNO_3$. En la Figura 56A se observan fibras de diámetros aproximados entre 0.11 - 0.18 µm, así como aglomerados de afinina, y algunas perlas presentes en las nanofibras.

La baja concentración del $AgNO_3$ produce que en las imágenes de BSE (Figuras 56B y 56C) no se perciba fácilmente la presencia de la plata en forma de nanopartículas, ya que esta se puede confundir con el tratamiento de “metalizado con Cu” de las muestras; cabe mencionar que dicho metalizado es requerido para visualizar a la muestra problema mediante esta técnica.

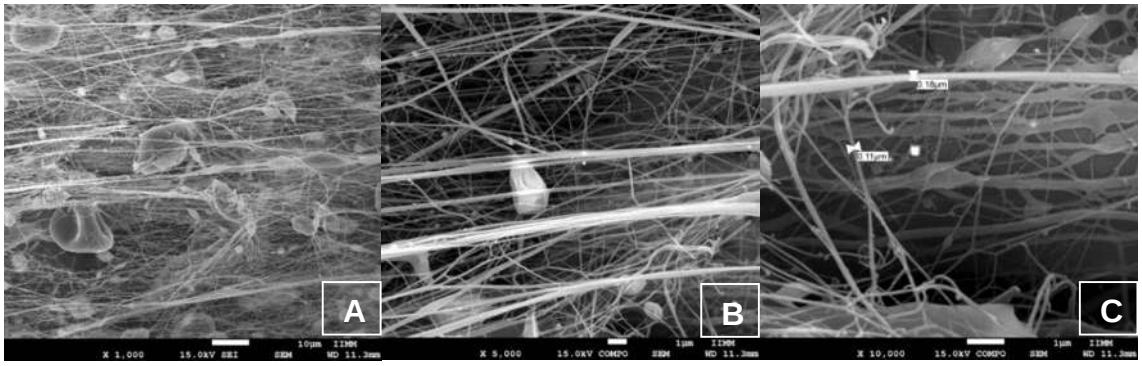
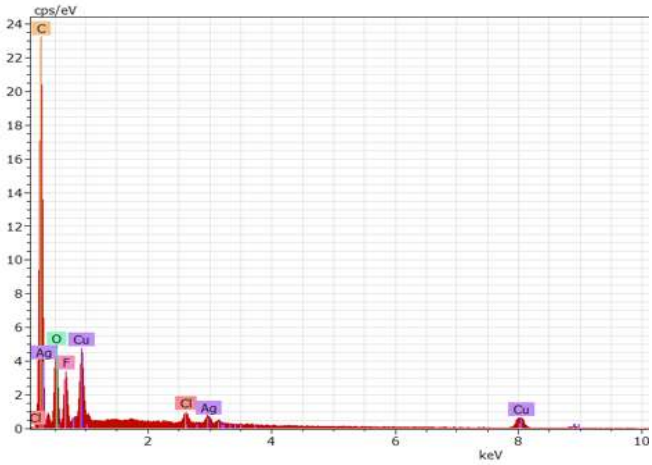


FIGURA 56. Micrografías de muestra 8 (nanofibra, CTS/afinina/$AgNO_3$, (75µg/mL) y (0.667mM) respectivamente). A) Obtenida por análisis SEI, B) Obtenida por análisis BSE y, C) Diámetros de tamaños aproximados de fibras y su alta presencia de deformidades.

La considerable porosidad y deformaciones no garantizan que la fibra pueda funcionar como soporte para otros compuestos. Por otro lado, con un

pequeño porcentaje, en comparación a las muestras anteriores, se confirma la presencia de plata en la fibra por medio del análisis EDX (Figura 57).



Análisis EDX Quantax Bruker Nano GmbH

Elemento	[norm. at.%]
Carbono	70.65878
Oxigeno	17.89959
Flúor	7.453193
Plata	0.204651
Cloro	0.255554
Total	100

FIGURA 57. Microanálisis por Dispersión de Energías de Rayos X (EDX) de la muestra 8 (Figura 56B) y el porcentaje de los componentes elementales presentes en la muestra.

En la Figura 58 se muestran las micrografías correspondientes a la muestra 9 la cual contiene afinina y $AgNO_3$ sin coordinar pero en la misma proporción emulando la concentración del complejo $[Ag_2$-(afinina)$](NO_3)_2$. Se puede apreciar que no hubo generación de AgNPs debido a que esta muestra no se expuso a la radiación solar.

En las Figuras 58A y 58B se distingue la descomposición de la estructura fibrilar y consecuente la formación de aglomerados que se interconectan por algunas fibras remanentes (Figura 58C).

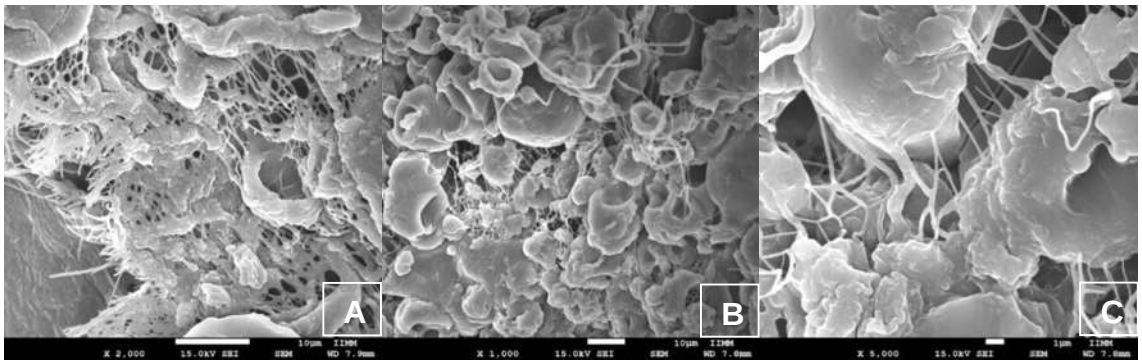


FIGURA 58. Micrografías de muestra 9 (nanofibra, CTS/afinina/$AgNO_3$, (75µg/mL) y (0.667mM) respectivamente)- tratamiento alcalino). A) Se muestra la presencia de fibras con cúmulos de material polimérico, B) Mayoría de cúmulos en comparación con nanofibras, C) Cúmulos poliméricos interconectados por fibras.

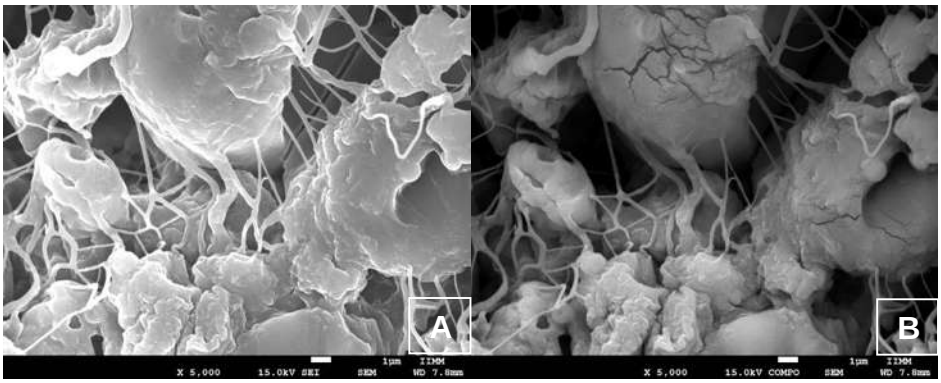
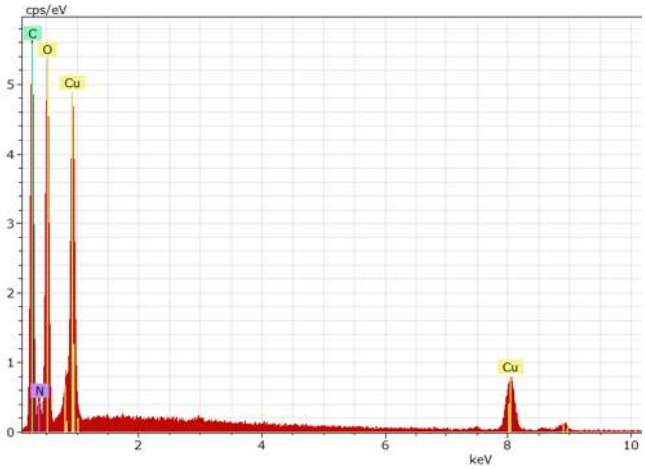


FIGURA 59. Micrografías de muestra 9 (nanofibra, CTS/afinina/$AgNO_3$, (75µg/mL) y (0.667mM) respectivamente)- tratamiento alcalino). A) Obtenida por análisis SEI, mostrando cúmulos interconectados por nanofibras B) Análisis BSE sin evidencia de la presencia de plata en los cúmulos y nanofibras presentes.

El análisis por BSE de la muestra 9 (Figura 59B) no permitió observar presencia de plata mediante el análisis EDX (Figura 60). Se sugiere que la concentración de plata en la muestra es muy pequeña por lo cual no es posible su detección, otra alternativa es que posiblemente se encuentra dentro de los aglomerados que se presentan.



Análisis EDX Quantax Bruker Nano GmbH

Elemento	**[norm. at.%]**
Oxigeno	47.38288
Carbono	42.2244
Nitrógeno	10.39272
Total	100

FIGURA 60. Microanálisis por Dispersión de Energías de Rayos X (EDX) de la muestra 9 (Figura 59B) y el porcentaje de los componentes elementales presentes en la muestra.

Las siguientes micrografías corresponden a la película de nanofibras de la muestra 10, la cual contiene afinina y $AgNO_3$ sin coordinar pero en la misma proporción emulando la concentración del complejo $[Ag_2$-(afinina)$](NO_3)_2$. Se generaron AgNPs por foto-reducción de la sal de $AgNO_3$ presente en solución de CTS. En la Figura 61A se observa la disposición aleatoria y recta de las nanofibras, con baja porosidad y algunos aglomerados de afinina dispersos. En la Figura 61B se muestra una micrografía obtenida por SEI donde se observan nanofibras de diámetros similares, así como su disposición recta, además de baja porosidad y deformidades. La Figura 61C, obtenida por BSE muestra la presencia de plata, misma que se confirma en el análisis EDX (Figura 62), y la cual se encuentra dispersa sobre la superficie de las nanofibras.

Comparando esta muestra con la muestra 8, se observa claramente la dispersión uniforme de la plata en forma de nanopartículas sobre las nanofibras en contraste de cuando no se lleva a cabo la foto reducción. Esto indica que al no exponerse la muestra a la radiación solar, la plata se acumula y no se dispersa sobre las nanofibras.

Por otra parte se observa que la generación de las AgNPs , o la combinación de ambos componentes en forma de complejo favorece la dispersión de la afinina sobre las nanofibras, de tal manera que no es posible apreciar aglomerados de esta sobre las nanofibras sino que posiblemente se encuentre formando parte de estas.

Esto es fácilmente distinguible al comparar las muestras en las que la afinina y el $AgNO_3$ fueron adicionados individualmente.

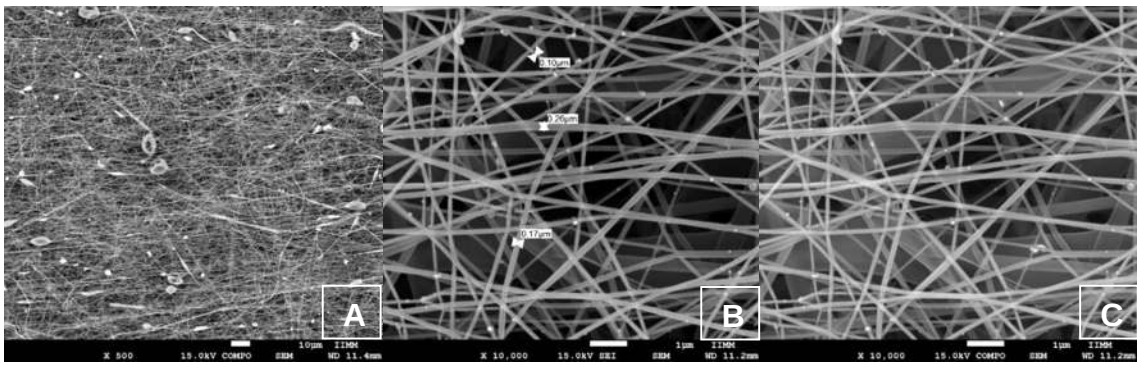
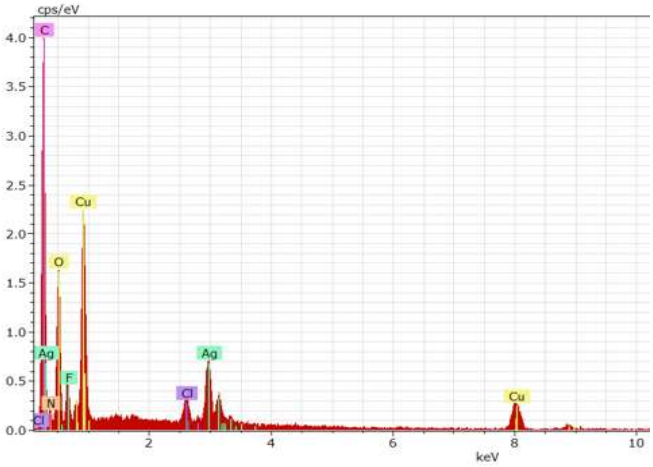


FIGURA 61. Micrografías de muestra 10 ((nanofibra, CTS/afinina+AgNPs, (75µg/mL) y (0.667mM) respectivamente). A) Obtenida por análisis BSE, mostrando cúmulos dispersos de afinina, así como presencia de plata B) Obtenida por SEI, se muestran nanofibras sin deformidades presentes y de diámetros similares y C) Análisis BSE que confirma la presencia de plata en las nanofibras.



Análisis EDX Quantax Bruker Nano GmbH

Elemento	[norm. at.%]
Carbono	50.92154
Oxigeno	31.17016
Flúor	7.125815
Plata	2.286908
Cloro	0.753843
Nitrogeno	7.741733
Total	100

FIGURA 62. Microanálisis por Dispersión de Energías de Rayos X (EDX) de la muestra 10 (Figura 61C) y el porcentaje de los componentes elementales presentes en la muestra.

Finalmente, en las micrografías correspondientes a la muestra 11 (Figura 63), la cual contiene al complejo $[Ag_2$-(afinina)$](NO_3)_2$, se aprecian nanofibras rectas y alineadas en todas direcciones (Figura 63A), a diferencia de las muestras 2 y 3, baja porosidad, donde coexisten fibras con diámetros variados, lo que podría afectar las propiedades mecánicas del compuesto (Figura 63B); sin embargo, se muestran en mayor proporción nanofibras con diámetros homogéneos (Figura 63C).

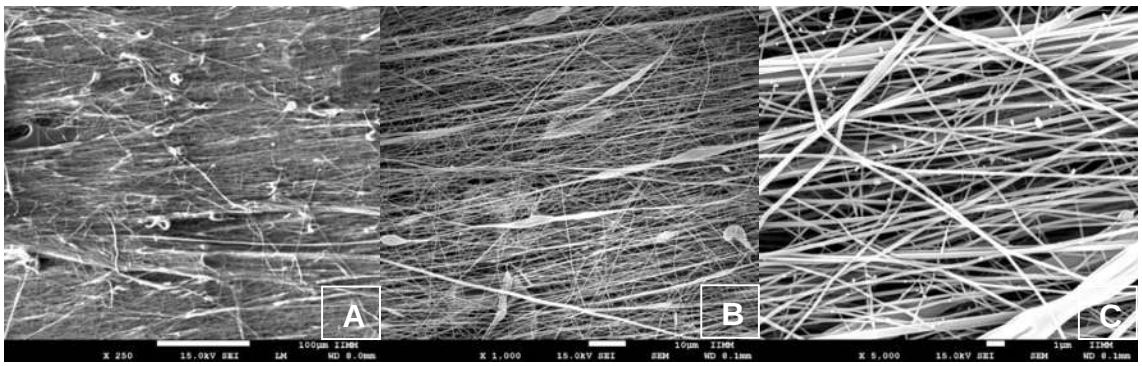


FIGURA 63. Micrografías de muestra 11 (nanofibra, CTS/afinina+AgNPs, 75µg/mL). A) Obtenida por análisis SEI, B) Mostrando nanofibras rectas, alineadas y algunos cúmulos sobre algunas de las nanofibras, C) Mostrando pocos espacios vacíos y relativa homogeneidad en los tamaños de las nanofibras.

Es probable que dentro de las nanofibras se encuentre embebida la afinina; ya que como se había reportado anteriormente en las muestras donde la afinina no se encuentra en forma de complejo (Figura 28), los aglomerados de afinina eran soportados sobre una red de nanofibras, sin embargo ahora no son observados.

En la Figura 64 se muestran dos micrografías de la misma área, donde por medio del análisis BSE se confirma la presencia de un átomo de un alto peso molecular, así también por medio del análisis EDX (Figura 65) se comprueba la

presencia de plata en la nanofibra, la cual al parecer se encuentra embebida formando parte de la nanofibra y no de manera superficial. Además, es posible apreciar el detalle del metalizado sobre las nanofibras.

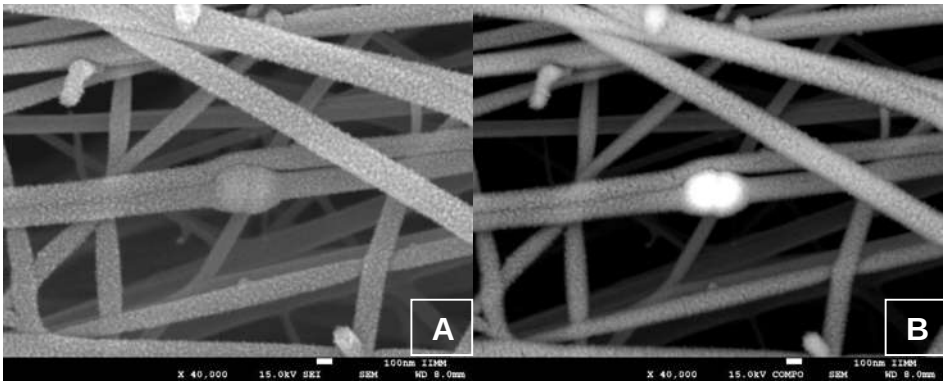
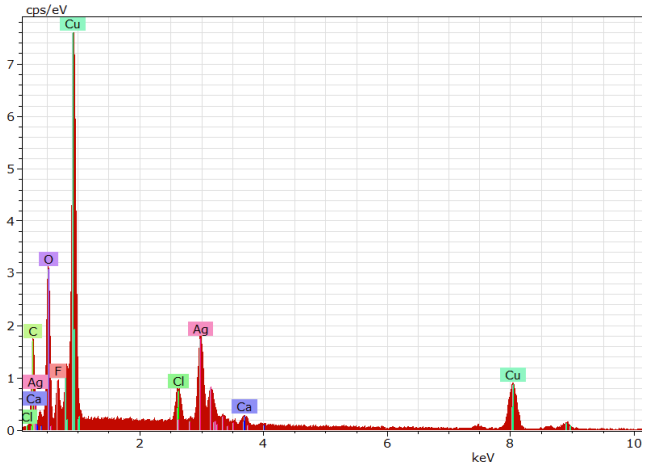


FIGURA 64. Micrografías de muestra 11 (nanofibra, CTS/afinina-AgNPs, 75µg/mL).
A) Obtenida por análisis SEI, B) Evidencia de la presencia de plata en análisis BSE y mostrando detalle del metalizado sobre la nanofibra.



Análisis EDX Quantax Bruker Nano GmbH

Elemento	**[norm. at.%]**
Carbono	25.13909
Oxigeno	51.513
Flúor	14.40749
Plata	5.736189
Cloro	2.052104
Calcio	1.152129
Total	100

FIGURA 65. Microanálisis por Dispersión de Energías de Rayos X (EDX) de la muestra 11 (Figura 64B) y el porcentaje de los componentes elementales presentes en la muestra.

Finalmente, se analizaron los espectros de IR de las nanofibras: CTS, CTS/afinina-AgNPs y CTS/afinina-AgNPs (después del tratamiento alcalino),

donde fue posible observar interesantes cambios que llevan a la confirmación de la remoción del ATF presente en las nanofibras.

En la Figura 66A se muestra el espectro de IR correspondiente al CTS puro, donde se observan bandas características de estiramientos (ν -N-H) en 3359.08 cm^{-1}, (ν -O-H) en 3277.77 cm^{-1}, (ν $-CH_2$) en 2873.28 cm^{-1}, carbonilo de amida (ν -C=O)

en 1648.48 cm^{-1}, vibraciones de flexión de (δ $-NH_2$) en 1587.38 cm^{-1}, de metilos (δ $-CH_3$) y metilenos (δ $-CH_2-$) en 1417.70 y 1374.89 cm^{-1} respectivamente, un estiramiento (ν -C-N) en 1315.11 cm^{-1}, la banda (ν_{as} -C-O-C) en 1150.38 cm^{-1} está relacionada a vibraciones asimétricas (-C-O) en los puentes de oxígeno resultante de la desacetilación del quitosano. Las bandas entre 1026 y 1061 cm^{-1} se atribuyen a vibraciones (ν_s -C-O-C) del esqueleto del quitosano y la pequeña banda situada en 895 cm^{-1} corresponde a vibraciones de aleteo (ω -C-H); estos desplazamientos coinciden con los reportados por Staroszczyk *et al*., 2014; Zakaria *et al.*, 2012; Paluszkiewicz *et al*., 2011; Yuan *et al*., 2010.

La Figura 66B muestra el espectro de IR de la película de nanofibras de CTS/afinina-AgNPs. Se aprecian algunas diferencias, como el incremento en la intensidad de la banda (ν -C=O), lo cual está relacionado con la presencia del carbonilo de amida de la afinina; sin embargo se atribuye en mayor medida al trifluoroacetato del ATF, se aprecian las tres bandas entre 722 y 838 cm^{-1} que se atribuyen a estiramientos (ν -C-F) (Hasegawa *et al*., 1992). La banda situada en 1531.73 cm^{-1} corresponde a vibraciones de flexión de los grupos amino en su forma protonada (δ $-NH_3^+$) (Staroszczyk *et al*., 2014). Asimismo, se aprecia el incremento en la intensidad de las bandas (ν_{as} -C-O-C) y (ν_s -C-O-C) debido a la interacción del esqueleto del CTS con el trifluoroacetato.

Por otro lado, después de llevar a cabo el tratamiento alcalino sobre la nanofibra CTS/afinina-AgNPs, se obtuvo el espectro de la Figura 66C, el cual es similar al del CTS puro analizado anteriormente, en este espectro, las bandas que

se atribuyen a la presencia e interacción del trifluoroacetato del ATF con el CTS desaparecen, lo que confirma la remoción del ATF presente en la película compuesta por nanofibras.

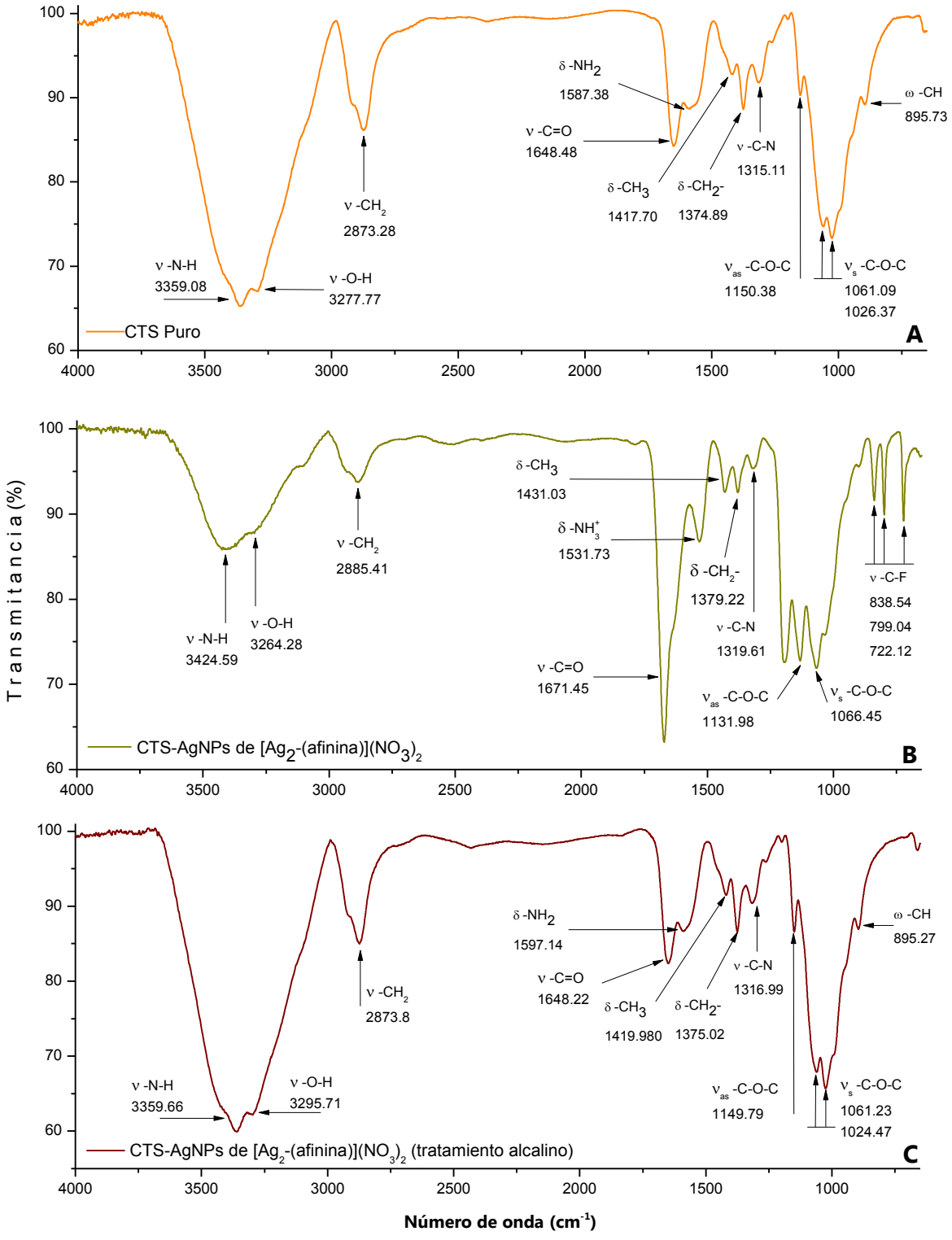


FIGURA 66. Espectros de IR de las nanofibras de CTS puro (A), CTS/afinina-AgNPs (B) y CTS/afinina-AgNPs después del tratamiento alcalino (C).

7.11 Análisis preliminar de la actividad antimicrobiana de biopelículas y nanofibras

Recientemente se ha probado el efecto antimicrobiano que presentan los compuestos de AgNPs embebidas en una matriz de CTS empleando concentraciones desde 40 µg/mL hasta 10 mg/mL contra cepas de *Candida albicans, E. coli P. aeruginosa* y *S. aureus,* principalmente (Lee *et al*., 2014; Jena *et al*., 2012 An *et al*., 2009; Son *et al.*, 2009; Devlieghere *et al*., 2004), cuyos halos de inhibición alcanzan diámetros de 10 a 17mm (Lee *et al*., 2014; Thomas *et al.*, 2009). Así también compuestos en donde las AgNPs se encuentran embebidas en una matriz de PVA/CTS con una concentración efectiva de AgNPs de 3.14 mg/mL (Abdelgawad *et al.*, 2013). Fouda *et al*., (2013) reportaron una potenciada actividad antibacteriana debido a la adición de AgNPs (0.1 mg/mL) sobre nanofibras de carboximetil quitosano/oxido de polietileno contra *S. aureus, P. aeruginosa* y *E. coli*; estos compuestos generaron halos de inhibición de 20, 18 y 15 mm, respectivamente, mientras que en ausencia de AgNPs, estas nanofibras generaron halos de inhibición de 13, 7 y 6 mm respectivamente.

Hasta el momento, no se había explorado la adición de un componente bioactivo como la afinina a esta combinación CTS-AgNPs, con lo que se pudiera presentar una actividad antimicrobiana análoga o superior a las ya reportadas.

Con el propósito de evaluar el potencial antimicrobiano de las biopelículas y nanofibras sintetizadas, se realizó un análisis antimicrobiano, donde se emplearon las siguientes cepas tipificadas:

- *Escherichia coli* (BG-) ATCC 25922
- *Staphyloccocus aureus* (CG+) ATCC 25923
- *Pseudomonas aeruginosa* (BG-) ATCC 25619

Las biopelículas y nanofibras evaluadas fueron los siguientes:

- CTS
- CTS-afinina
- CTS-AgNPs
- CTS/afinina+AgNPs
- CTS/afinina-AgNPs

Sobre discos de papel filtro (D= 5mm), se impregnaron 100 µL de cada solución polimérica, mientras que las biopelículas y nanofibras fueron previamente neutralizadas (NaOH 1M) y lavadas con agua destilada para alcanzar un pH neutro, finalmente estas muestras fueron recortadas en forma circular (D= 5 mm).

Sensidiscos (D= 5mm) del antibiótico Meropenem® (c= 12.72 µg/cm^2) fueron empleados como control positivo, de manera que cada sensidisco estuviera presente en cada tipo de muestra y microorganismo. Al término del periodo de incubación (24 h) se verificó la generación de halos de inhibición producidos por los compuestos sintetizados.

En la siguiente Tabla se enlistan las muestras analizadas.

unidades	**CTS**	**CTS-afinina**	**CTS-AgNPs**	**CTS/afinina +AgNPs**	**CTS/ afinina-AgNPs**	**Tipo de muestra**
µg/cm^2	4.28 *1	15.95	180	a: 15.95 b: 24.5	15.95	Biopelícula
mg/mL	20 *2	0.075	0.849	a: 0.075 b: 0.115	0.075	Solución
µg/cm^2	3.58 *3	3	33.75	a: 3 b: 4.57	3	Nanofibra

TABLA 11. Concentraciones de los componentes en las diferentes matrices poliméricas.

*1 CTS 2% AcOH (mg/cm^2)
*2 CTS 2% AcOH (mg/mL)

*3 CTS 9% ATF/CH_2Cl_2 (mg/cm^2)
a: afinina, b: $AgNO_3$
área de sensidisco, A= 0.2cm^2
La concentración de los componentes en biopelículas y nanofibras se determinó estimando que dichos componentes se encuentran uniformemente dispersados.

Las muestras en forma de biopelículas presentaron poca o nula inhibición; sin embargo el compuesto CTS/afinina+AgNPs mostró halos de inhibición de 1 mm contra *E. Coli* y *P. aeruginosa*, mientras que los compuestos CTS-afinina y CTS/afinina-AgNPs mostraron halos de 1 mm contra *E. Coli* y *P. aeruginosa* respectivamente. Ninguna de las muestras presentó halos de inhibición contra *S. aureus*.

En la Figura 67 se observa que los compuestos en forma de soluciones poliméricas exhibieron halos de inhibición (≥1mm), siendo mayores los presentados por los compuestos CTS/afinina+AgNPs y CTS/afinina-AgNPs con 5 y 4 mm, contra *E. coli* (Figura 67A), de 4 y 3 mm contra *P. aeruginosa* (Figura 67B), de 3 y 2 mm contra *S. aureus* (Figura 67C), respectivamente. Cabe resaltar que el compuesto CTS/afinina-AgNPs posee una concentración 2.5 veces menor de los componentes adicionados con respecto al compuesto CTS/afinina+AgNPs, lo que sugiere una mayor inhibición debido al efecto potenciado que presenta el complejo $[Ag_2\text{-(afinina)}](NO_3)_2$.

FIGURA 67. Halos de inhibición de soluciones poliméricas contra A) *E. Coli,* B) *P. aeruginosa y* C) *S. aureus* y halo de inhibición del Meropenem® en C); CTS-af y CTS comp= CTS/afinina-AgNPs, CTS-AgNPs= CTS/afinina+AgNPs.

En la Figura 68 se muestra la actividad antimicrobiana producida por los compuestos en forma de nanofibras, cabe señalar que todas las muestras

produjeron halos de inhibición (≥ 1mm), donde los mejores resultados se obtuvieron con las muestras CTS/afinina+AgNPs y CTS/afinina-AgNPs; siendo de 7 y 6 mm, contra *E. coli* (Figura 68A), de 6 y 4 mm contra *P. aeruginosa* (Figura 68B), de 6 y 5 mm contra *S. aureus* (Figura 68C), respectivamente. De forma análoga al resultado obtenido con las soluciones poliméricas el compuesto CTS/afinina-AgNPs exhibe una mayor inhibición debido al efecto potenciado que presenta el complejo $[Ag_2\text{-(afinina)}](NO_3)_2$.

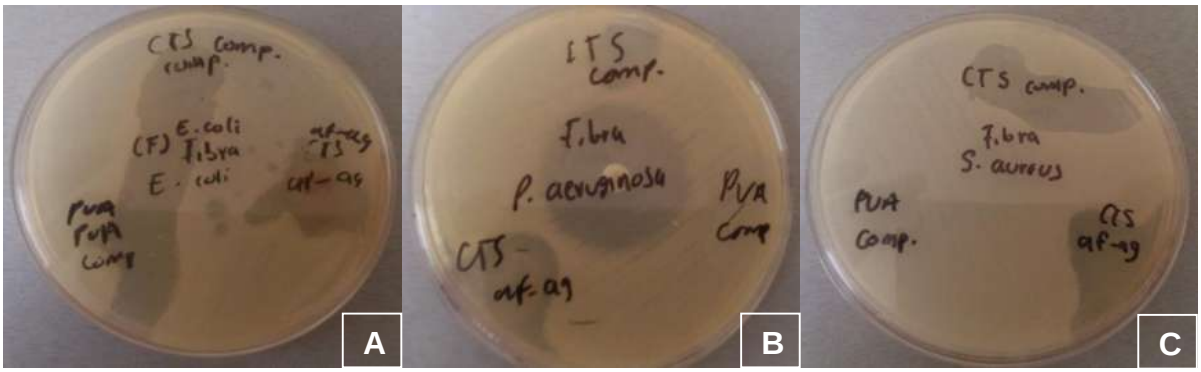


FIGURA 68. Halos de inhibición de nanofibras contra A) *E. Coli,* B) *P. aeruginosa y* C) *S. aureus* y halo de inhibición del Meropenem® en B); CTS comp= CTS/afinina-AgNPs, CTS-af-ag= CTS/afinina+AgNPs.

Si bien, los compuestos CTS, CTS-afinina y CTS-AgNPs en forma de soluciones poliméricas y nanofibras exhibieron halos de inhibición, estos fueron menores con respecto a CTS/afinina+AgNPs y CTS/afinina-AgNPs, a cuando actúan en conjunto, o en forma de un complejo.

En esta evaluación *E. coli* fue el microorganismo más susceptible, mientras que *S. aureus* el más resistente.

Por otro lado se ha comprobado que parte de la actividad antimicrobiana presentada por las nanofibras electrohiladas se debe al ATF remanente cuando este es empleado (Martínez *et al*., 2011), de ahí la importancia de realizar un

tratamiento alcalino que remueva este compuesto para comparar de manera efectiva la actividad que presentan los compuestos adicionados.

A continuación se muestran los halos de inhibición observados en el ensayo.

TABLA 12. Halos de inhibición (expresados en mm) de biopelículas, soluciones poliméricas y nanofibras obtenidos en la evaluación microbiológica.

Micro-organismo	**CTS ***	**CTS-afinina ***	**CTS-AgNPs ***	**CTS/afinina +AgNPs***	**CTS/ afinina-AgNPs***	**AB ***	**Tipo de muestra**
E. coli	---	---	1	1	---		Biopelícula
S. aureus	---	---	---	---	---	11	
P. aeruginosa	---	---	---	1	1		
E. coli	1	2	3	5	4	13	Solución
S. aureus	1	1	2	3	2		
P. aeruginosa	1	1	2	4	3		
E. coli	1	3	3	7	6		Nanofibra
S. aureus	1	2	3	6	5		
P. aeruginosa	1	3	5	6	4	11	

CTS, concentración: 20 mg/µL (solución), 4.28 µg/cm^2 (biopelícula), 3.58 µg/cm^2 (nanofibra).
CTS-afinina, concentración: 0.075 mg/µL (solución), 15.95 µg/cm^2 (biopelícula), 3 µg/cm^2 (nanofibra).
CTS-AgNPs, concentración: 0.849 mg/µL (solución), 180 µg/cm^2 (biopelícula), 33.75 µg/cm^2 (nanofibra).
CTS/afinina+AgNPs, concentración afinina: 0.075 mg/µL (solución), 15.95 µg/cm^2 (biopelícula), 3 µg/cm^2 (nanofibra), AgNPs: 0.115 mg/µL (solución), 24.5 µg/cm^2 (biopelícula), 4.57 µg/cm^2 (nanofibra).
CTS/afinina-AgNPs (complejo), concentración: 0.075 mg/µL (solución), 15.95 µg/cm^2 (biopelícula), 3 µg/cm^2 (nanofibra).
AB: Antibiótico control (Meropenem), concentración: 10 µg/unidad ó 12.72 µg/cm^2.

En el ensayo realizado se puede descartar el efecto antimicrobiano del ATF al analizar los halos de inhibición generados con la muestra CTS (Tabla 12), donde se observan inhibiciones de 1 mm, las cuales son menores a aquellas que contienen uno o más componentes empleados en la elaboración de las nanofibras CTS/afinina-AgNPs.

8. Conclusiones

- La afinina fue exitosamente aislada e identificada, proveniente de muestras de “raíz de oro” (Chilcuague) del Mercado de Sonora.
- El novedoso complejo de coordinación ($[Ag_2$-(afinina)$](NO_3)_2$) fue sintetizado a partir de una reacción de complejación de afinina con $AgNO_3$, se obtuvo evidencia de su formación por Resonancia Magnética Nuclear, Espectroscopia de Infrarrojo y Espectrometría de Masa.
- A partir de la combinación PVA/CTS en diferentes proporciones se generaron y caracterizaron nanofibras, donde se observó que el PVA no le confiere al CTS una mejora en la generación de nanofibras cuando se emplea ácido acético como disolvente.
- El electrohilado de CTS puro se llevó a cabo empleando una mezcla de disolventes ATF/CH_2Cl_2, modificando las variables: voltaje, flujo másico, distancia ajuga-colector, temperatura y velocidad del colector rotatorio, a fin de obtener una nanofibra de buena calidad.
- Por medio del método de foto-reducción se generaron AgNPs en soluciones de CTS a partir del complejo $[Ag_2$-(afinina)$](NO_3)_2$ y de diferentes concentraciones $AgNO_3$; estas fueron caracterizadas por Espectroscopia UV-Vis.
- A partir de la modificación en las variables del electrohilado fue posible encontrar las condiciones óptimas para electrohilar soluciones CTS-$AgNO_3$ y CTS/afinina-AgNPs (Complejo).

- La generación de materiales compuestos en forma de nanofibras con distintas cualidades, se realizó de acuerdo a la composición y disposición de los materiales de partida. Las nanofibras generadas fueron: CTS-afinina, CTS/afinina+AgNPs y CTS/afinina-AgNPs (Complejo). Se observó que la afinina y el $AgNO_3$ en forma de complejo favorece la dispersión tanto de las AgNPs generados por fotoreducción como de la afinina, produciendo un material compuesto en forma de nanofibras mucho más homogéneo.
- El tratamiento alcalino aplicado a las muestras poliméricas (biopelículas y nanofibras) mostró la degradación parcial de estas, así como la perdida de sus propiedades mecánicas. Además, el análisis microscópico permitió comprobar que el tratamiento alcalino no remueve en gran medida los componentes adicionados a la matriz polimérica, lo que sugiere que el quitosano es capaz de liberar los compuestos activos dentro de la matriz polimérica.
- Las nanofibras y soluciones poliméricas mostraron buenas actividades antimicrobianas contra cepas de *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. aureus*. La nanofibra compuesta por CTS/afinina+AgNPs fue la que presentó la mayor actividad, sin embargo el compuesto CTS/afinina-AgNPs mostró un mejor efecto potenciado.

9. Parte experimental

Instrumental

Los espectros de RMN de 1D de la afinina y del complejo de coordinación $[Ag_2\text{-(afinina)}](NO_3)_2$ se obtuvieron en el Espectrómetro "Varian Mercury Plus-400", empleando $CDCl_3$ y $DMSO_{\text{-d6}}$ como disolvente. Los desplazamientos químicos se reportan con respecto al TMS, el cual fue empleado como referencia interna. Los espectros fueron procesados en el software "MestReNova".

Los espectros de IR se obtuvieron empleando el espectrofotómetro "Thermo Scientific Nicolet iS10" y fueron procesados en el software "Origin 8.0".

Los espectros de UV-Vis se obtuvieron en el espectrofotómetro "Thermo Scientific Genesys 10S". Se empleó una solución acuosa de AcOH 1% como línea base. Los espectros fueron procesados en el software "Origin 8.0".

El espectro de Masa del complejo $[Ag_2\text{-(afinina)}](NO_3)_2$ se obtuvo empleando el equipo "JEOL JMS-SX 102A", mediante la técnica de Electrospray.

Los puntos de fusión y descomposición se determinaron empleando el aparato "Fisher Johns" y no están corregidos.

Las nanofibras poliméricas fueron producidas en el equipo de electrohilado "NaBond NEU-01".

Las biopelículas y nanofibras fueron examinadas en el "MEB-EC JEOL JSM-7600F FEG-SEM" del Instituto de Investigaciones Metalúrgicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Materiales

Las muestras de "Raíz de Oro" o Chilcuague, Se adquirieron en el mercado de Sonora en la Ciudad de México.

Los reactivos empleados durante la experimentación fueron los siguientes:

Sal de $AgNO_3$, Sigma-Aldrich®, CAS: 7761-88-8.

ATF, Sigma-Aldrich® ReagentPlus®, CAS: 76-05-1.

PVA, Sigma-Aldrich®, PM: 89,000-98,000, 99 g/mol +% hidrolizado, CAS: 9002-89-5.

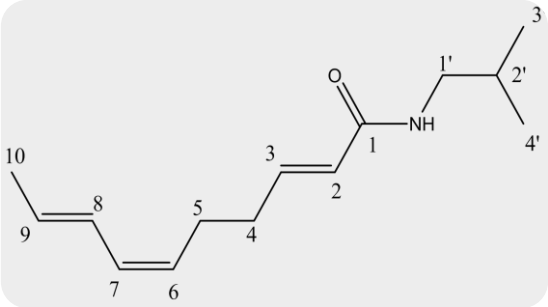
CTS, Sigma-Aldrich® de caparazones de camarones en polvo, ≥75% (desacetilado), CAS: 901276-4.

Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo empleando gel de sílice Merck de 230-400 mallas.

Obtención de Afinina

A partir de un lote de 81.5 g de raíz de Chilcuague se realizaron 5 maceraciones sucesivas en hexanos (250 mL), mismas que fueron filtradas y concentradas en rotavapor, obteniendo 1.445 g de una miel verde-amarilla con un rendimiento del 1.79%. Este extracto fue impregnado en gel de sílice y sometido a purificación mediante cromatografía en columna empleando gel de sílice como

fase estacionaria y una mezcla de Hex-AcoEt (7:2), obteniendo 1.070 g de afinina; una miel amarilla que representó un 74% del extracto hexánico y 1.31% del total de raíz de Chilcuague empleada.



RMN de ^{1}H (400 MHz, $\underline{CDCl_3}$) δ ppm 6.83 (dt, *J* = 15.3, 6.5 Hz, 1H, H-3), 6.29 (m, 1H, H-8), 5.97 (t, *J* = 10.9 Hz, 1H, H-7), 5.80 (dt, *J* = 15.3, 1.5 Hz, 1H, H-2), 5.70 (dq, *J* = 13.5, 6.7 Hz, 1H, H-9), 5.53 (sa, 1H, NH), 5.26 (dt, *J* = 10.9, 7.0 Hz, 1H, H-6), 3.15 (dt, *J* = 11.6, 5.8 Hz, 2H, H-1'), 2.29 (m, 4H, H-4 y H-5), 1.82 (dd, *J* = 13.5, 6.7 Hz, 1H, H-2'), 1.78 (dd, *J* = 6.7, 1.3 Hz, 3H, H-10), 0.93 (d, *J* = 6.7, 6H, H-3' y H-4').

RMN de ^{1}H (400 MHz, $\underline{DMSO_{-d6}}$) δ ppm 7.87 (ta, *J* = 5.7 Hz, 1H, NH), 6.57 (dt, *J* = 15.2, 6.6 Hz, 1H, H-3), 6.31 (m, 1H, H-8), 5.95 (d, *J* = 10.6 Hz, 1H, H-7), 5.90 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H, H-2), 5.66 (td, *J* = 13.6, 6.6 Hz, 1H, H-9), 5.24 (dt, *J* = 10.6, 7.2 Hz, 1H, H-6), 2.91 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, H-1'), 2.25 (dd, *J* = 14.4, 7.2 Hz, 2H, H-4), 2.17 (dd, *J* = 13.8, 7.1 Hz, 2H, H-5), 1.72 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, H-10), 1.65 (td, *J* = 13.4, 6.7 Hz, 1H, H-2'), 0.83 (s, *J* = 6.6 Hz, 3H, H-3'), 0.81 (s, *J* = 14.5, 5.8 Hz, 3H, H-4').

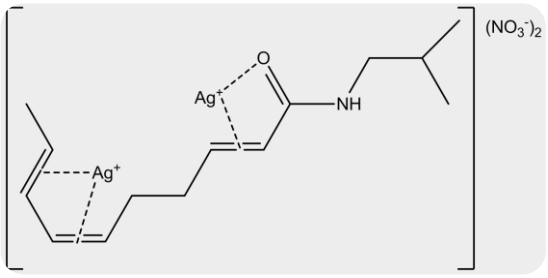
RMN de ^{13}C (100 MHz, $\underline{CDCl_3}$) δ ppm 165.8 (C=O, C-1), 143.5 (CH, C-3), 129.9 (CH, C-9), 129.4 (CH, C-7), 127.6 (CH, C-6), 126.6 (CH, C-8), 124.0 (CH, C-2), 46.78 (CH_2, C-1'), 32.1 (CH_2, C-5), 28.5 (CH, C-2'), 26.3 (CH_2, C-4), 20.1 (CH_3, C-3' y C-4'), 18.3 (CH_3, C-10).

IR $\nu_{máx}$ (cm^{-1}): 3296 (ν -N-H), 2956 (ν =C-H), 2925 (ν -CH_3), 2854 (ν -CH_2-), 1668 (ν -C=C no conjugada), 1629 (ν -C=O), 1548 (δ -N-H), 1247 (ν -C-N).

Reacción de Complejación de afinina con sal de $AgNO_3$

Partiendo de 89.7 mg de afinina se realiza el cálculo para determinar la cantidad de sal de $AgNO_3$ necesaria para obtener el complejo $[Ag_2$-(afinina)$](NO_3)_2$. En la reacción de coordinación 2 moles de $AgNO_3$ entran en contacto con 1 mol de afinina, por lo que la cantidad de $AgNO_3$ necesaria para llevar a cabo la reacción es de 137.7 mg.

Dentro de un matraz protegido de la luz, se adicionó $AgNO_3$ y ACN como disolvente, esta solución se mantuvo a reflujo y en agitación constante por 1 h para después adicionar la afinina, llevando la reacción por 24 h a reflujo y en agitación constante. Transcurrido este tiempo se evaporó el crudo de reacción, obteniendo una miel anaranjada. Se realizaron tres lavados al crudo de reacción empleando Hex y CH_2Cl_2, obteniendo finalmente un precipitado café claro.



RMN de ^{1}H (400 MHz, DMSO$_{-d6}$) δ ppm 8.20 (sa, 1H, NH), 2.89 (t, 2H, H-1'), 0.81 (s, 3H, H-3'), 0.80 (s, 3H, H-4').

IR $\nu_{máx}$ (cm^{-1}): 3346 (ν -N-H), 2997 (ν =C-H), 2936 (ν $-CH_3$), 2851 (ν $-CH_2-$), 1633 (ν -C=O), 1263 (ν_a NO_3^-), 799 (δ_{oop} NO_3^-), 733 (δ_{ip} NO_3^-).

ESI-MS 70 eV *m/z* (%): 599 ([M^++ACN], 100), 564.1 (28), 493.1 (66), 405 (27), 361.8 ([$C_7H_{11}N_2O_4Ag$+ACN+Na], 58), 277.8 ([$C_3H_3N_2O_4Ag$+Na+H_2O], 74), 237.8 ([$C_5H_6NO_3Ag$], 21), 186.6 (23), 108.7 (5).

Generación de AgNPs a partir de solución de CTS 2%, AcOH 1%

Partiendo de 100 mL de una solución acuosa de CTS 2% en AcOH 1%, se calculó la cantidad necesaria de $AgNO_3$ para obtener una concentración de: 1mM

(16.98 mg de $AgNO_3$), 5mM (84.93 mg de $AgNO_3$) o 10 mM (169.86 mg de $AgNO_3$); en el caso del complejo $[Ag_2$-(afinina)$](NO_3)_2$, (7.5 mg) para obtener una concentración de 75 µg/mL (DL_{50} de la afinina).

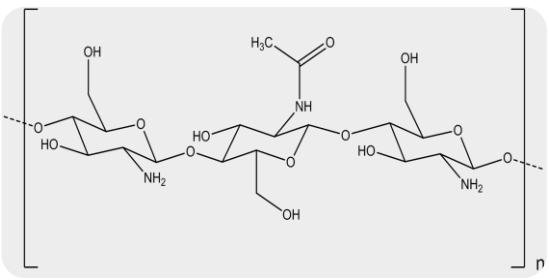
Una vez adicionada la sal de $AgNO_3$ o el complejo $[Ag_2$-(afinina)$](NO_3)_2$, la solución se protegió de la luz, manteniéndola en agitación por 30 minutos para después llevar esta solución (blanquecina) al contacto con la radiación solar por un lapso de 2 h, fue indispensable que esto se realizara en un día soleado.

Transcurrido este tiempo la solución se colorea de morado hasta gris oscuro, dependiendo de la concentración de la sal de $AgNO_3$ o de complejo $[Ag_2$-(afinina)$](NO_3)_2$ empleada. Posteriormente, se verificó la presencia de AgNPs en las soluciones irradiadas empleando el Espectrofotómetro UV-Vis, utilizando una solución acuosa de AcOH 1% como línea base.

UV-Vis $\nu_{máx}$ AgNPs: (AcOH 1%): 390 – 420 nm.

Obtención de Biopelículas poliméricas

Partiendo de 100 mL de una solución acuosa de CTS 2% en AcOH 1%, dicha solución se mantuvo en agitación por 24 h hasta que el CTS se disolvió por completo. La solución fue vertida en cajas Petri y llevada a la estufa para que por medio de la evaporación se obtuvieran las biopelículas, las cuales son delgadas, flexibles, transparentes y de color amarillo. Parte de estas biopelículas fueron posteriormente empleadas para la generación de nanofibras de CTS. Los espectros de IR de CTS, CTS-AgNPs y CTS/afinina-AgNPs muestran señales similares en sus desplazamientos y porcentaje de transmitancia.



IR CTS puro $\nu_{máx}$ (cm^{-1}): 3359 (ν -N-H), 3278 (ν -O-H), 2873 (ν -CH_2), 1648 (ν -

C=O), 1587 (δ -NH_2), 1418 (δ -CH_3), 1375 (δ -CH_2-), 1315 (ν -C-N), 1150 (ν_{as} -C-O-C), 1059 y 1026 (ν_s -C-O-C), 895 (ω -C-H).

Generación de nanofibras poliméricas

La generación de nanofibras de PVA se realizó partiendo de 100 mL de una solución de PVA al 7.8% en agua destilada, esta solución se mantuvo en agitación constante y a 90 °C durante 1 h.

Posteriormente, se llenó una jeringa de plástico de 10 mL con la solución preparada y se montó en la bomba de infusión.

En la punta de la jeringa se conectó una manguera cuyo extremo opuesto se acopló a una aguja metálica dentro del equipo. La aguja metálica es entonces conectada al polo positivo, mientras que el colector metálico al polo negativo.

A continuación se presentan los valores óptimos de los parámetros empleados para la generación de nanofibras poliméricas, los cuales se aplican a las concentraciones de los compuestos empleados en las soluciones poliméricas

El rango óptimo de voltaje en el equipo está entre 11 - 45 kV.

El rango de operación óptimo de la bomba inyectora de $\dot{m}$ se encuentra entre 0.001 – 0.08 mL/min.

La distancia máxima de separación entre la aguja y el colector depende del tamaño del equipo, 30 cm en este caso.

Puesto que se desea que la totalidad del área superficial del colector sea cubierta de nanofibras, una velocidad de rotación del colector <3000 rpm resulta

recomendable, velocidades más altas producirán nanofibras uniformes en una dirección.

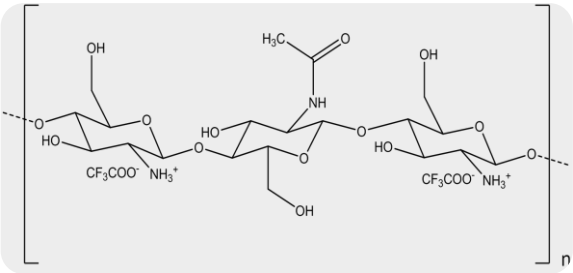
La temperatura estará en función de la volatilidad y punto de ebullición de cada disolvente.

Para la generación de nanofibras de CTS puro se partió de 20 mL de una solución de CTS al 8% en peso en una solución de ácido trifluoroacético/dicloro metano ATF/CH_2Cl_2 (70:30), esta solución se mantuvo en agitación por 24 h hasta que el CTS se disolvió por completo. Posteriormente se siguió la metodología antes mencionada.

Para la generación de nanofibras de CTS con afinina fue necesario que la solución de CTS al 8% en peso en solución de ATF/CH_2Cl_2 (70:30) estuviera preparada al momento de adicionar la afinina, cuya cantidad a emplear fue dada por la DL_{50} de la afinina (75 µg/mL) (Molina *et al.*, 2004). Para 50 mL de solución polimérica fue necesario adicionar 3.75 mg de afinina. Posteriormente se siguió la metodología antes mencionada.

Para la generación de nanofibras de CTS con AgNPs, se partió de las soluciones (100 mL) que contenían AgNPs provenientes de la fotoreducción de sal de $AgNO_3$ o del complejo de [Ag_2-(afinina)](NO_3)$_2$, posteriormente se obtuvieron biopelículas de estas soluciones empleando la metodología antes mencionada, las cuales se recortaron en trozos pequeños para ser redisueltos en una solución de ATF/CH_2Cl_2 (70:30).

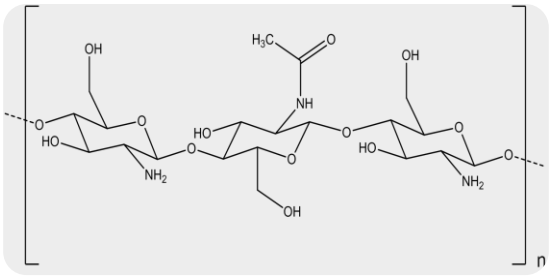
Esta solución se mantuvo en agitación constante por 72 h hasta que las biopelículas se disolvieron completamente. Posteriormente, la solución se cargó en una jeringa de 10 mL y se sometió al electrohilado bajo las condiciones descritas en la Tabla 7. El volumen a emplear de solución ATF/CH_2Cl_2 (70:30) fue fijado por el peso de las biopelículas, sabiendo que este peso representará el porcentaje en peso final de CTS en la solución final, que va del 8-12%.



IR CTS/afinina-AgNPs $\nu_{máx}$ (cm^{-1}): 3425 (ν -N-H), 3264 (ν -O-H), 2885 (ν -CH_2), 1671 (ν -C=O), 1532 (δ -NH_3^+), 1431 (δ -CH_3), 1379 (δ -CH_2-), 1320 (ν -C-N), 1132 (ν_{as} -C-O-C), 1066 (ν_s -C-O-C), 839, 799 y 722 (ν -C-F).

Tratamiento alcalino para biopelículas y nanofibras poliméricas

Partiendo de una solución de 100 mL de NaOH 1M en MeOH, esta fue vertida sobre un recipiente suficientemente profundo para sumergir las muestras. La biopelícula o nanofibra se sujetó a una base de plástico, con la cual después fue sumergida en la solución alcalina durante 30 minutos, para después ser lavada con agua destilada (cuidando no destrozar la muestra) hasta que alcanzara un pH neutro. Finalmente se dejó secar por aireación.



IR CTS/afinina-AgNPs (tratamiento alcalino)$\nu_{máx}$ (cm^{-1}): 3360 (ν -N-H), 3296 (ν -O-H), 2874 (ν -CH_2), 1648 (ν -C=O), 1597 (δ -NH_2), 1420 (δ -CH_3), 1375 (δ -CH_2-), 1317 (ν -C-N), 1150 (ν_{as} -C-O-C), 1061 y 1024 (ν_s -C-O-C), 895 (ω -C-H).

Análisis antimicrobiano

La evaluación preliminar del potencial antibacteriano de los compuestos sintetizados se llevó a cabo en el laboratorio EDULAB empleando las siguientes cepas tipificadas:

- *Escherichia coli* (BG-) ATCC 25922
- *Staphyloccocus aureus* (CG+) ATCC 25923
- *Pseudomonas aeruginosa* (BG-) ATCC 25619

Estas cepas fueron proporcionadas por el laboratorio EDULAB y el Laboratorio Estatal de Salud Pública. Los tres microorganismos fueron inoculados en condiciones estériles en caldo Mueller-Hinton, de manera que la turbidez de los inóculos correspondiera al 0.5 de la escala turbidimétrica de McFarland, la cual es equivalente a 10^8 UFC/mL. Se empleó agar Mueller-Hinton (MH) y caldo estándar MH preparado previamente para hacer la comparación turbidimétrica y llevar a cabo la difusión del microorganismo. Previo a las pruebas antimicrobianas, las muestras fueron preparadas de la siguiente manera:

- *Para las soluciones*: Se recortaron y esterilizaron círculos de papel filtro con el fin de formar sensidiscos, para después impregnarlos con 100 µL de cada solución.
- *Para biopelículas y nanofibras*: Estas muestras fueron neutralizadas previamente para eliminar el exceso de ácido. las muestras fueron tratadas con una solución de NaOH 1 M y finalmente se les realizaron lavados con agua destilada hasta alcanzar un pH neutro. Biopelículas y nanofibras fueron recortadas en forma circular (5 mm) se empleó una concentración análoga a la utilizada en forma de solución.

Un hisopo estéril fue introducido en cada caldo estandarizado con el microorganismo correspondiente y se realiza un estriado cargado por cuadrantes sobre el agar Mueller-Hinton (medio estándar para antibiogramas), para cada inóculo en condiciones estériles. Una vez inoculadas las bacterias, se procede a colocar las biopelículas, nanofibras, sensidiscos y el antibiótico control (Meropenem) sobre el estriado y se incuban las placas durante 24 h a 37 °C. Al

finalizar el periodo de incubación, se realizan las mediciones de los halos de inhibición de cada muestra y se comparan con el halo del antibiótico control.

10. Referencias bibliográficas

ABDELGAWAD A., HUDSON S., ROJAS O. (2014). "Antimicrobial wound dressing nanofiber mats from multicomponent (chitosan/silver-NPs/polyvinyl alcohol) systems", *Carbohyd. Polym.*, **100**: 166-178.

ABD-EL-AZIZ A. S., SHIPMAN P. O., BODEN B. N., MCNEIL W. S. (2010). "Synthetic Methodologies and Properties of Organometallic and Coordination Macromolecules", *Prog. Polym. Sci*., **35**: 714-836.

AN J., ZHANG H., ZHANG J. T., ZHAO Y., YUAN X. (2009). "Preparation and antibacterial activity of electrospun chitosan/poly(ethylene oxide) membranes containing silver nanoparticles", *Colloid. Polym Sci.*, **287**: 1425-1434.

BARAM P. D., SHUKLA S., PERKAS N., GEDANKEN A., SARID R. (2009). "Inhibition of herpes simplex virus type 1 infection by silver nanoparticles capped with mercaptoethane sulfonate", *Bioconjugate Chem.*, **20**:1497-1502.

BATARSEH I. K. (2004). "Anomaly and correlation of killing in the therapeutic properties of silver (I) chelation with glutamic and tartaric acids", *J. Antimicrob. Chemother.*, **54**: 546–548.

BAUTISTA B. S., HERNÁNDEZ L. M., BOSQUEZ M. E. (2004). "Growth inhibition of selected fungi by chitosan and plant extracts", *Rev. Mex. Fitopatol.*, **22**: 178-186.

BAUTISTA B., HERNANDEZ L. M., BOSQUEZ M. E., WILSON C.L. (2003). "Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit", *Crop. Prot.*, **22**: 1087-1092.

BAUTISTA B. S., HERNÁNDEZ L. M., BARRERA N. L.L. (2000). "Antifungal screening of plants of the state of Morelos, Mexico against four fungal postharvest pathogens of fruits and Vegetables", *Rev. Mex. Fitopatol.*, **18**: 36-41.

BHATIA A., SHARD P., CHOPRA D., MISHRA T. (2011). "Chitosan nanoparticles as Carrier of Immunorestoratory plant extract: synthesis, characterization and Immunorestoratory efficacy", *Int. J. Drug Deliv.*, **3**: 381-385.

BRENNER, E. K. (2012). "Electrospinning of hyaluronic acid nanofibers from aqueous ammonium solutions", *Carbohyd. Polym.*, **87**: 926–929.

BOONEN J., BRONSELAER A., NIELANDT J., VERYSER L., DE TRÉ G., DE SPIEGELEER B. (2012). "Alkamid database: Chemistry, occurrence and functionality of plant N-alkylamides", *J. Ethnopharmacol.*, **142**: 563–590.

CAMACHO E. M., VEGA B. J., CAMPOS G. A. (2011). "Uso de nanomateriales en polímeros para la obtención de bioempaques en aplicaciones alimentarias", *Rev. Soc. Quím. Perú*, **77**: 4.

CALLE J., RIVERA A., REGUERO M. T., DEL RIO R. E. AND JOSEPH-NATHAN, P. (1988). "Estudio del espilantol usando técnicas de resonancia magnética nuclear en dos dimensiones", *Rev. Latinoam. Quím.*, **19**: 94-97.

CAO Y., GU W., ZHANG J., CHU Y., YE X., HU Y., CHEN J. (2013). **"**Effects of chitosan, aqueous extract of ginger, onion and garlic on quality and shelf life of stewed-pork during refrigerated storage", *Food Chem.*, **141**:1655-1660.

CILIA L. V. G., AGUIRRE R. R. J., REYES A. J. A., JUAREZ F. B. (2008). "Etnobotánica de *Heliopsis longipes* (*Asteraceae Heliantheae*)", *Bol. Soc. Bot. Mex.*, **83**: 83-89.

CUERO R., OSUJI G., WASHINGTON A. (1991). "N-Carboxymethylchitosan inhibition of aflatoxin production: role of zinc", *Biotechnol. Lett.*, **13**: 441–444.

DEVLIEGHERE F., VERMEULEN J., DEBEVERE J. (2004). "Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables", *Food Microbiol.*, **21**: 703–714.

DUAN, B. (2007). "Degradation of electrospun PLGA-chitosan/PVA membranes and their cytocompatibility in vitro", *J. Biomat. Sci.-Polym. E.*, **18**: 95–115.

DUTTA P. K., TRIPATHI S., MEHROTRA G. K., DUTTA J. (2009). "Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food application", *Food Chem.*, **114**: 1173-1182.

EL-AJAILY M. M., ABDLSEED F. A., BEN-GWEIRIF S. (2007). "Preparation, Characterization and Antibacterial Activity of Some Metal ion Complexes", *E. J. Chem.*, **4**: 461-466.

EL-GHAOUTH J. A., ARUL J., GRENIER J., ASSELIN A., (1992). "Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits", *Phytopathology*, **82**: 398-402.

EL-GHAOUTH J., PONNAMPALAM R., BOULET M., (1991). "Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries", *J. Food Sci.*, **56**: 1618–1620.

EL-MEGHARBEL S. M., REFAT M. S. (2015). "Ligational behavior of clioquinol antifungal drug towards Ag(I), Hg(II), Cr(III) and Fe(III) metal ions: Synthesis, spectroscopic, thermal, morphological and antimicrobial studies", *J. Mol. Struct.*, **1085**: 222-234.

EL-RAFIE M. H., EL-NAGGAR M. E., RAMADAN M. A., FOUDA M. M. G., AL-DEYAB S. S., HEBEISH A. (2011). "Environmental synthesis of silver nanoparticles using hydroxypropyl starch and their characterization", *Carbohydr. Polym.*, **86**: 630–635.

EL-SUKKARY M. M., SOLIMAN E. A., AIAD I., EL-AWADY M. Y., SHABAN S. M. (2014). "In situ and green synthesis of silver nanoparticles and their biological activity", *J. Ind. Eng. Chem.*, **20**: 3430–3439.

ELECHIGUERRA J., BURT J. L., MORONES J. R., CAMACHO B. A., GAO X., LARA H. H., YACAMAN M. (2005). "Interaction of silver nanoparticles with HIV-1", *J. Nanobiotech.*, **3**: 6.

ELSABEE, M. Z., NAGUIB, H. F., & MORSI, R. E. (2012). "Chitosan based nanofibers, review", *Mater. Sci. Eng. C.*, **32**: 1711-1726.

FOUDA M. M. G., EL-AASSAR M. R., AL-DEYAB S. S. (2013). "Antimicrobial activity of carboxymethyl chitosan/polyethylene oxide nanofibers embedded silver nanoparticles", *Carbohyd. Polym.*, **92**: 1012-1017.

FUGLSANG C. C., JOHANSEN C., CHRISTGAU S., ADLER N. J. (1995). "Antimicrobial enzymes: applications and future potential in the food industry", *Trends Food Sci. Tech.*, **6**: 390–396.

FURMHALS A. (1934) US patent 1,975,504.

GAGNE N., SIMPSON B. K. (1993). "Use of proteolytic enzymes to facilitate the recovery of chitin from shrimp wastes", *Food Biotechnol.*, **7**: 253-263.

GAJBHIYE M., KESHARWANI J., INGLE A., GADE A., RAI M. (2009). "Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their activity against pathogenic fungi in combination with fluconazole", *Nanomedicine*, **5**: 382-386.

GAMBOA W., MANTILLA O., CASTILLO V. (2007). "Producción de micro y nano fibras a partir de la técnica "electrospinning" para aplicaciones farmacológicas", Memorias de Congreso, VII Congreso de la Sociedad Cubana de Bioingeniería, La Habana, Cuba.

GENG X., KWON O-H., JANG J. (2005). "Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution", *Biomaterials*, **26**: 5427–5432.

GORJI M., JEDDI A. A. A., GHAREHAGHAJI A. A. (2012). "Fabrication and characterization of polyurethane electrospun nanofiber membranes for protective clothing applications", *J. Appl. Polym. Sci.*, **125**: 4135-4141.

HASEGAWA M., ISOGAI A., ONABE F., USUDA M. (1992) "Disolving states of cellulose and chitosan in trifluoroacetic acid", *J. Appl. Polym. Sci.,* **45**: 1857-1863.

HE W., JIANG S., ZHANG Q., PAN M. (2013). "Isolation and Characterization of Cellulose Nanofibers from *Bambusa rigida*", *Bioresources*, **8**: 5678-5689.

HERNÁNDEZ I., LEMUS Y., PRIETO S., MOLINA T. J., GARRIDO G. (2009). "Anti-inflammatory effect of an ethanolic root extract of *Heliopsis longipes* in vitro", *BLACPMA*, Universidad de Santiago de Chile, **8**: 160-164.

HERNÁNDEZ C. M. (2009). "Evaluación del efecto de la afinina presente en extractos de *Heliopsis longipes* en la recuperación de ápices de vainilla sometidos a tratamientos con crioprotectores", Tesis, Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Veracruzana, Región Córdoba-Orizaba.

HERNÁNDEZ M. A., ARVIZU G. J.L., GÓMEZ L. B. E., RAMÍREZ C. E., ABRAHAM J. M. A., MARTÍNEZ S. G., MOLINA T. J. (2012). "Determinación de la actividad insecticida de *Heliopsis longipes* A. Gray Blake, una planta endémica del Estado de Guanajuato", *Ra Ximhai*, **8**: 111-118.

HIRANO S., HAYASHI H. (2003). "Some fragrant fibres and yarns based on chitosan", *Carbohydr. Polym.*, **54**: 131-136.

HOFFMAN K. L., HAN I. Y., DAWSON P. L. (2001). "Antimicrobial effects of corn zein films impregnated with nisin, lauric acid and EDTA", *J. Food Prot.*, **64**: 885-889.

HONG J. D., SUNG K. J., KUK E., NAM Y. K., JONG-HO K., JIN P. S., JANG L. H., SO H. K., KYUNG P. Y., HO P. Y., CHEOL-YONG H., KWON K. Y., YOON-SIK L., CHO-HAING M. (2007). "Antimicrobial effects of silver nanoparticles", *Nanomed-Nanotechnol.*, **3**: 95-101.

HUANG Z. M., ZHANG Y. Z., KOTAKI M., RAMAKRISHNA S. (2003). "A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites", *Compos. Sci. and Technol.*, **63**: 2223-2253.

ICHIMORI T., MIZUMA K., UCHIDA T., YAMAZAKI S., KIMURA K. (2013). "Morphological diversity and nanofiber networks of poly (p-oxybenzoyl) generated by phase separation during copolymerization", *J. Appl. Polym. Sci.*, **128**: 1282-1290.

ISLAM S., RAHAMAN S., YEUM J. H. (2015). "Electrospun novel super absorbent based on polysaccharide–polyvinyl alcohol–montmorillonite clay nanocomposites", *Carbohyd. Polym.*, **115**: 69–77.

JAYAKUMAR R., PRABAHARAN M., SUDHEESH KUMAR P. T., NAIR S. V., TAMURA H. (2011). "Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications", *Biotechnol. Adv.*, **29**: 322-337.

JENA P., MOHANTY S., MALLICK R., JACOB B., SONAWANE A. (2012). "Toxicity and antibacterial assessment of chitosan-coated silver nanoparticles on human pathogens and macrophage cells", *Int. J. Nanomed.*, **7**: 1805-1818.

KAPLAN D. L. (1998). "Biopolymers from Renewable Resources"; Springer, First Edition. New York.

KIM K. J., SUN W. S., SUH B. K., MOON S. K., CHOI J. S., KIM J. G., LEE D. G. (2009). "Antifungal activity and mode of action of silver nanoparticles on *Candida albicans*", *Biometals*, **22**: 235-242.

KO S., JANES M. E., HETTIARACHCHY N. S., JOHNSON M. G. (2001). "Physical and chemical properties of edible films containing nisin and their action against *Listeria monocytogenes*", *J. Food Sci.*, **66**: 1006-1011.

KOWALCZYK T., NOWICKA A., ELBAUM D., KOWALEWSKI T. A. (2008). "Electrospinning of bovine serum albumin. Optimization and the use for production of biosensors", *Biomacromolecules*, **9**: 2087-2090.

LÁREZ V. C. (2003). "Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos", Tesis, Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.

LEE H. W. (2009). "Electrospinning fabrication and characterization of poly (vinylalcohol) /montmorillonite nanofiber mats", *J. Appl. Polym. Sci.*, **113**:1860-1867.

LEE S. J., HEO D. N., MOON J. H., KO W. K., LEE J. B., BAE M. S., PARK S. W., KIM J. E., LEE D. H., KIM E. C., LEE C. H., KWON I. K. (2014). "Electrospun chitosan nanofibers with controlled levels of silver nanoparticles. Preparation, Characterization and Antibacterial Activity", *Carbohyd. Polym.*, **111**: 530-537.

LI Z., WANG C. (2013). "Effects of working parameters on electrospinning, One-Dimensional Nanostructures", *Springer Berlin Heidelberg*. pp. 15-28.

LIU K. H., LIU T. Y., CHEN S. Y., LIU D. M. (2008). "Drug release behavior of chitosan–montmorillonite nanocomposite hydrogels following electrostimulation", *Acta Biomaterialia*, **4**: 1038-1045.

LÓPEZ C. G., HIGUERAS L., GAVARA R., HERNÁNDEZ M. P. (2013). "Silver Ions Release from Antibacterial Chitosan Films Containing in Situ Generated Silver Nanoparticles", *J. Agr. Food Chem.*, **61**: 260-267.

LÓPEZ R. A., GAVARA R., LAGARON J. M. (2006). "Bioactive packaging: turning foods into healthier foods through biomaterials", *Trends Food Sci. Tech*., **17**: 567-575.

LU L., SUN R. W., CHEN R., HUI C. K., HO C. M., LUK J. M., LAU G. K., CHE C. M. (2008). "Silver nanoparticles inhibit hepatitis B virus replication", *Antivir Ther*., **13**: 253-262.

MANNA S., BATABYAL S. K., NANDI A. K. (2006). "Preparation and characterization of silver-poly(vinylidene fluoride) nanocomposites: formation of piezoelectric polymorph of poly(vinylidene fluoride)", *J. Phys. Chem. B*, **110**: 12318-12326.

MARTÍNEZ C. A. P., CORTEZ R. M. O., CASTILLO O. M. M., BURGOS H. A. EZQUERRA B. J. M., PLASCENCIA J. M. (2011). "Antimicrobial activity of chitosan nanofibers obtained by electrospinning", *Polym. Int.*, **60**: 1663-1669.

MARTINOVÁ L., LUBASOVÁ D. (2008). "Electrospun Chitosan Based Nanofibers", *RJTA*, **12**: 72-79.

MING L. J. (2003). "Structure and function of "metalloantibiotics"", *Med. Res. Rev.*, **23**: 697-762.

MOHARRAM M. A., KHALIL S. K. H., SHERIF H. H. A., KHALIL W. A. (2014). "Spectroscopic study of the experimental parameters controlling the structural properties of chitosan-Ag nanoparticles composite", *Spectrochim. Acta A: M-B,* **126**: 1-6.

MOLINA T. J., SALAZAR. C. C., ARMENTA. S. C., RAMÍREZ. C. E. (2004). "Fungistatic and Bacteriostatic Activities of Alcamides from *Heliopsis longipes* Roots: Affinin and Reduced Amides", *J. Agric. Food Chem.*, **52**: 4700-4704.

MOLINA T. J., GARCÍA C. A. (2001). "Alcamidas en plantas: Distribución e Importancia. Avance y Perspectiva", Departamento de Biotecnología y Bioquímica del CINVESTAV-IPN, Unidad Irapuato, México **20**: 377-387.

MOLINA T. J., GARCÍA C. A., RAMÍREZ C. E. (1999). "Antimicrobial properties of natural alkamides traditionally used in Mesoamerica: affinin and capsaicin", *J. Ethnopharmacol*., **64**: 241-248.

MOLINA T. J., SALGADO G. R., RAMÍREZ C. E., DEL RIO R. E. (1996). "Purely olefinic alkamides in *Heliopsis longipes* and *Acmella (Spilanthes) oppositifolia*", *Biochem. Syst. Ecol.*, **24**: 43-47.

MORI Y., ONO T., MIYAHIRA Y., QUANG N. V., MATSUI T., ISHIHARA M. (2013). "Antiviral activity of silver nanoparticle/chitosan composites against H1N1 influenza A virus", *Nanoscale Res. Lett*., **8**: 93.

MURAVIEV D., MACANAS J., FARRE M., MUNOZ M., ALEGRET S. (2006). "Novel routes for inter-matrix synthesis and characterization of polymer stabilized metal nanoparticles for molecular recognition devices", *Sen. Act. B Chem*,, **118**: 408-417.

NAKATANI N., NAGASHIMA M. (1992). "Pungent Alkamides from *Spilanthes acmella* L. var. *oleracea* Clarke", *Biosci. Biotech. Biochem*. **56**: 759-762.

OGUNNIRAN K. O. , TELLA A. C., ALENSELA M., YAKUBU M. T. (2007). "Synthesis, physical properties, antimicrobial potentials of some antibiotics complexed with transition metals and their effects on alkaline phosphatase activities of selected rat tissues", *Afr. J. Biotechnol.*, **6**: 1202-1208.

OGURA M., CORDELL G. A., QUINN M. L., LEON C., BENOIT P. S., SOEJARTO D. D., FARNSWORTH N. R. (1982). "Ethnopharmacologic studies. I. Rapid solution to a problem - oral use of *Heliopsis longipes* by means of a multidisciplinary approach", *J. Ethnopharmacol.* **5**: 215-219.

OHKAWA K., CHA D., KIM H., NISHIDA A., YAMAMOTO H. (2004). "Electrospinning of Chitosan", *Macromol. Rapid Commun.* **25**: 1600-1605.

OKAMOTO Y., KAWAKAMI K., MIYATAKE K., MORIMOTO M., SHIGEMASA Y., MINAMI S. (2002). "Efectos analgésicos de la quitina y el quitosano", *Carbohydr. Polym.*, **49**: 249-252.

PAL S., TAK Y. K., SONG J. M. (2007). "Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*". *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**: 1712-1720.

PALUSZKIEWICZ C., STODOLAK E., HASIK M., BLAZEWICZ M. (2011). "FT-IR study of montmorillonite–chitosan nanocomposite materials", *Spectrochim. Acta A*. **79**: 784-788.

PILLAY V., DOTT C., CHOONARA Y. E., TYAGI C. TOMAR L., KUMAR P., DU TOIT L. C., NDESENDO V. M. K. (2013). "A Review of the Effect of Processing Variables on the Fabrication of Electrospun Nanofibers for Drug Delivery Applications", *J. Nanomater.*, **2013**: 1-22.

RINAUDO, M. (2006). "Chitin and chitosan: Properties and applications", *Prog. Polym. Sci.*, **31**: 603-632.

RAMAKRISHNAA S., FUJIHARAC K., TEO W., YONG T., MA Z., RAMASESHAN R. (2006). "Electrospun nanofibers: solving global issues". *Mat. today*, **9**: 40-50.

RAMÍREZ C. E., LUCAS V. L., VIRGEN C. G., MOLINA T. J. (2000). "Actividad fungicida de la afinina y del extracto crudo de raíces de *Heliopsis longipes* en dos especies de *Sclerotium*" *Agrociencia*, Colegio de Postgraduados, México, **34**: 207-215.

RAVINDRAN A., CHANDRAN P., KHAN S. S (2013). "Biofunctionalized silver nanoparticles: Advances and prospects" *Colloids Surface B: Biointerfaces*, **105**: 342- 352.

ROJAS O., MOYA M., SIBAJA M., RUEPERT C., VEGA B. J. R. (2004). "Estudio de la liberación controlada de plaguicidas incorporados en hidrogeles de ácido itacónico" *Rev. Iberoamer. Polím.*, **5**: 133-143.

SALGADO G. R., MOLINAT. J., LÓPEZ M. J. E., LOEZA L. P. D. (2008). "Effect of crude extract and bioactive compounds of *Heliopsis longipes* on anthracnose incidence, mycorrhization, and nodulation of bean", *Agro.*, **42**: 679-688.

SCHIFFMAN J. D., SCHAUER L. C. (2008). "A Review: Electrospinning of Biopolymer Nanofibers and their Applications" Department of Materials Science and Engineering, Drexel University, Philadelphia, P.A.

SHAHIDI F., ARACHCHI J. K. V., JEON Y. J. (1999). "Food applications of chitin and chitosan", *Trends Food Sci. Tech*., **10**: 37-51.

SHEN Z. X., SHERMANB W. F. (1992). "Structural Transformation and infrared spectroscopy studies of $AgNO_3$ by Raman", *J. Mol. Struct.*, **271**: 175-181.

SHI Q., CHEN X., LU T., JING X. (2008). "The immobilization of proteins on biodegradable polymer fibers via click chemistry", *Biomaterials*, **29**: 1118-1126.

SHUKLA, S. K., MISHRA, A. K., AROTIBA, O. A., MAMBA, B. B. (2013). "Chitosan-based nanomaterials: A state of the art review", *Int. J. Biol. Macromol.*, **59**: 46-58.

SILL T. J., VON R. H. A. (2008). "Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering", *Biomaterials,* **29**: 1989-2006.

SIRÓ I., PLACKETT D. (2010). "Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: A review", *Cellulose*, **17**: 459-494.

SMITH L. A., MA P. X. (2004). "Nano-fibrous scaffolds for tissue engineering", *Colloids Surface B. Biointerfaces*, **39**: 125-131.

SON B., YEOM B. Y., SONG S. H., LEE C-S., HWANG T. S. (2009). "Antibacterial electrospun chitosan/poly(vinyl alcohol) nanofibers containing silver nitrate and titanium dioxide", *J. Appl. Polym. Sci.*, **111**: 2892-2899.

SONDI I., SALOPEK S. B. (2004). "Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria", *J Colloid Interface Sci*., **275**: 177-182.

SORRENTINO A., GORRASI G., VITTORIA V. (2007). "Potential perspectives of bionanocomposites for food packaging applications", *Trends Food Sci. Tech.*, **18**: 84-95.

SOTO D., OLIVA H. (2012). "Métodos para preparar hidrogeles químicos y físicos basados en almidón: Una revisión", *Rev. LatinAm. Metal. Mater.*, **32**: 154-175.

STAROSZCZYK H., SZTUKA K., WOLSKA J., WOJTASZ P. K. A., KOŁODZIEJSKA I. (2014). "Interactions of fish gelatin and chitosan in uncrosslinked and crosslinked with EDC films: FT-IR study", *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectros.*, **117**: 707-712.

STRANGER J., TUCKER N., STAIGER M. (2009). "Electrospinning", Smithers Rapra, Shrewsbury, Shropshire, GBR.

SUPAPHOL, P., SANGSANOH P. (2006). "Stability Improvement of Electrospun Chitosan Nanofibrous Membranes in Neutral or Weak Basic Aqueous Solutions", *Biomacromolecules,* **7**: 2710-2714.

SUZUKI A., ARINO K. (2012). "Polypropylene nanofiber sheets prepared by CO_2 laser supersonic multi-drawing", *Eur. Polym. J.*, **48**: 1169-1176.

TAO S. L., DESAI T. A. (2007). "Aligned arrays of biodegradable poly (ε-caprolactone) nanowires and nanofibers by template synthesis", *Nano. Lett.*, **7**: 1463-1468.

THOMAS V. YALLAPU M. M. Y., SREEDHAR B., BAJPAI S. K. (2009). "Fabrication, Characterization of Chitosan/Nanosilver Film and Its Potential Antibacterial Application", *J. Biomat. Sci.*, **20**: 2129-2144.

VON NUSSBAUM F., BRANDS M., HINZEN B., WEIGAND S. HÄBICH D. (2006). "Antibacterial Natural Products in Medicinal Chemistry Exodus or Revival?", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**: 5072-5129.

WAIZEL B. J., MARTÍNEZ R. I. M. (2011). "Algunas plantas usadas en México en padecimientos periodontales", *A.D.M.*, **68**: 73-78.

WANG Y., WAKISAKA M. (2015) "Chitosan nanofibers fabricated by combined ultrasonic atomizationand freeze casting", *Carbohyd. Polym.*, **122**: 18-25.

XIN ZHANG C., LIPPARD S. J. (2003). "New metal complexes as potential therapeutics", *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **7**: 481-489.

YOO H. S., KIM T. G., PARK T. G. (2009). "Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery", *Adv. Drug Deliv. Rev*., **61**: 1033-1042.

YUAN Q., SHAH J., HEIN S., MISRA R. D. K. (2010). "Controlled and extended drug release behavior of chitosan-based nanoparticle carrier", *Acta Biomaterialia*, **6**: 1140-1148.

ZAKARIA Z., IZZAH Z., JAWAID M., HASSAN A. (2012). "Effect of degree of deacetylation of chitosan on thermal stability and compatibility of chitosan-polyamide blend", *Bio-Res*., **7**: 5568-5580.

ZENG F., HOU C., WU S. Z., LIU X. X., TONG Z., YU S. N. (2007). "Silver nanoparticles directly formed on natural macroporous matrix and their anti-microbial activities", *Nanotechnology*, **18**: 1-8.

ZHANG D., QUANTICK P. C. (1997). "Effects of chitosan coating on enzymatic browning and decay during postharvest storage of litchi (*Litchi chinensis* Sonn) fruit", *Postharv. Biol. Technol.*, **12**: 195-202.

ZHANG Y. (2007). "Preparation of electrospun chitosan/poly(vinyl alcohol) membranes", *Colloid Polym. Sci.*, **285**: 855-863.

ZHENG L. Y., ZHU J. F. (2003). "Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights", *Carboh. Polym.*, **54**: 527-530.

ZHENG H., DU Y. M., YU J. H. HUANG R. H., ZHANG L. N. (2001). "Preparation and characterization of chitosan/poly (vinyl alcohol) blend fibers", *J. App. Polym. Sci.,* **80:** 2558-2565.

ZHOU Y. S., YANG D., CHEN X., XU Q., LU F., NIE J. (2008). "Electrospun water-soluble carboxyethyl chitosan/poly(vinyl alcohol) nanofibrous membrane as potential wound dressing for skin regeneration", *Biomacromolecules*, **9**: 349-354.