

**FUNCIONALIZACIÓN DE MATRICES A BASE DE POLÍMEROS
BIODEGRADABLES MEDIANTE INCORPORACIÓN DE NANOPARTÍCULAS**

Tesis de Doctorado

DIEGO ALEJANDRO MARÍN SILVA

Presentada ante la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de la
Plata como requisito para la obtención del grado académico de

DOCTOR EN INGENIERÍA

Directora de Tesis

Directora: Dra. Adriana Pinotti

Jurado de Tesis:

Dra. Adriana Mauri. Profesora Adjunta de la Universidad Nacional de La
Plata. Investigadora Principal del CONICET.

Dra. Lidia Herrera: Profesora Adjunta de la Universidad de Buenos Aires.
Investigadora Principal del CONICET.

Dra. Olivia López: Asistente de Docencia en la Universidad Nacional del
Sur. Investigadora Adjunta del CONICET.

Fecha de la defensa de oral y pública: 25 de marzo de 2022



**FUNCIONALIZACIÓN DE MATRICES A BASE DE POLÍMEROS
BIODEGRADABLES MEDIANTE INCORPORACIÓN DE NANOPARTÍCULAS**

**Tesis Doctoral presentada por
Diego Alejandro Marín Silva**

ante la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de la Plata
para acceder al grado académico de

DOCTOR EN INGENIERÍA

Directora de Tesis

Dra. Adriana Pinotti

Universidad Nacional de la Plata

Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química

La Plata, Argentina

El presente trabajo de tesis se realizó para optar al título de Doctor en Ingeniería, programa acreditado por CONEAU con categoría A (Res. 1069/11).

Se llevó a cabo en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), bajo la dirección de la Dra. Adriana Pinotti.



FUNCIONALIZACIÓN DE MATRICES A BASE DE POLÍMEROS BIODEGRADABLES MEDIANTE INCORPORACIÓN DE NANOPARTÍCULAS



TESIS DOCTORAL

Diego Alejandro Marín Silva

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Facultad de Ingeniería

Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos. CONICET, CIC-PBA.



Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento a aquellas personas que hicieron posible la realización de esta Tesis.

Agradezco por haber nacido en una familia siempre unida, apoyándome en cualquier circunstancia. Gracias a mi abuela y tía por los valores profesados que perduran a través del tiempo.

A mis padres, mi hermana, tía y primo por su amor incondicional y a mis grandes amores que ya no están físicamente, pero me ayudaron a ser feliz (tomuloyilupama).

A la Dra. Adriana Pinotti por su gran experiencia y tiempo para guiar, aconsejar, ayudar a ser una mejor persona a nivel laboral y personal.

Quiero agradecer al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el otorgamiento de la beca doctoral (2016-2022) y a la Dra. Andrea Gómez-Zavaglia por permitirme realizar mi Tesis Doctoral en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA).

También quiero agradecer a todas las personas que de alguna manera u otra ayudaron para la construcción, desarrollo y finalización de los ensayos realizados durante este trabajo de investigación: Dr. John Pérez-Calderón, Dra. Leda Giannuzzi, Dr. Julián Rengifo-Herrera, Dr. Nelson Gastón Romano, Dr. Luis Pizzio, Dra. Paula Bucci, Dr. Jorge Montanari, Dra. Sandra Rivero, Ing. Carlos Javier Lecot, Dra. Silvana Petruccelli, Dra. María Fernanda Hamet, Dra. Ayelén Hugo, Dra. Adriana Mauri y al Tec. Claudio Cristian Reyes.

También por el apoyo recibido durante el desarrollo del trabajo: Dra. Estela Bruno, Dra. Laura Campañone, Dra. María Belén Giménez, Dra. Alba Navarro, Dra. Natalia Graiver, Lic. Marina Urriza.

Y finalmente a todos mis amigos: John, Clarita, Yadi, Maya, Juli, Ale, Andreita, Nel, Marce, Jules, Pau, Florecilla, Javi, Bel y Verilla. Fueron, son y serán personas de luz.

Los resultados del trabajo de investigación se plasmaron en presentaciones a congresos nacionales e internacionales y publicaciones en revistas con referato.

Chitosan films containing TiO₂ nanoparticles modified with tungstophosphoric acid for the photobleaching of malachite green in solid gas interfaces upon different wavelengths.

Julián A. Rengifo-Herrera, Diego A. Marín-Silva, Edita Mendoza-Portillo, Adriana Pinotti, Luis R. Pizzio. *Molecular Catalysis* 448 (2018) 1–9.

Degradation study of malachite green on chitosan films containing heterojunctions of melon/TiO₂ absorbing visible-light in solid-gas interfaces. J. Pérez-Obando, D.A. Marín-Silva, A. Pinotti, L.R. Pizzio, P. Osorio-Vargas, J.A. Rengifo-Herrera. *Applied Catalysis B: Environmental* 244 (2019) 773–785.

Self-cleaning and antimicrobial photo-induced properties under indoor lighting irradiation of chitosan films containing melon/TiO₂ composites. Vélez-Peña, E., Pérez-Obando, J., Pais-Ospina, D., Marín-Silva, D. A., Pinotti, A., Cánneva, A., Rengifo-Herrera, J. A. *Applied Surface Science*, 508 (2020) 144895.

Facile photocatalytic immobilization strategy for P-25 TiO₂ nanoparticles on low density polyethylene films and their UV-A photo-induced super hydrophilicity and photocatalytic activity. John J. Alvear-Daza, Daniel Pais-Ospina, Diego A. Marín-Silva, Adriana Pinotti, Laura Damonte, Luis R. Pizzio, Paula Osorio-Vargas, Julian A. Rengifo-Herrera. *Catalysis Today*, 372 (2021) 11–19.

RESUMEN

En los últimos años, el campo de la nanotecnología ha impulsado varios de los avances más importantes en ciencia, ingeniería y producción desde la revolución industrial. En esta dirección, la nanotecnología constituye una plataforma tecnológica que ha demostrado tener potencial para producir productos innovadores con considerables beneficios para la salud humana y actualmente ofrece nuevas oportunidades para la innovación en la industria alimentaria y sectores afines.

Teniendo en cuenta estas premisas, el objetivo del presente trabajo de Tesis fue diseñar materiales nanoestructurados a base de quitosano y polímeros sintéticos biocompatibles cargados con nanopartículas de Cu, Ag o TiO₂, y aplicarlos tanto al campo de envasado de alimentos, como del medio ambiente y biomédico.

*Dentro de la estructura de la Tesis, en **Antecedentes** se expusieron investigaciones para dar un marco conceptual al tema. En el **Capítulo 1**, se presentaron la caracterización de los polímeros usados por diversas técnicas como DRX, ATR-FTIR y DSC. En el caso del quitosano, también se determinaron el peso molecular y el grado de deacetilación. El quitosano es un material biodegradable, no-tóxico, que permite un aprovechamiento integral y eficiente de los recursos. Asimismo, el alcohol polivinílico (PVA) es un polímero sintético biodegradable, soluble en agua. La polivinil pirrolidona (PVP) se usó para la síntesis de nanopartículas de cobre y como refuerzo en la matriz electrohilada de PVA. Si bien la PVP no es biodegradable, todos los polímeros usados son biocompatibles, tienen diversas aplicaciones tanto en el campo de la biotecnología, la medicina, como en la industria alimentaria y en el área farmacéutica, y de tecnología de envases.*

*En el **Capítulo 2** se desarrollaron matrices nanocompuestas activas a base de quitosano con nanopartículas de plata (NpAg). Se sintetizaron y se caracterizaron las NpAg para después incorporarlas a las matrices de quitosano formando los nanocompuestos. Estos se estudiaron desde diversos puntos de vista, térmico, mecánico, susceptibilidad al agua, microestructural (DRX, ATR-FTIR), entre otros. En el **Capítulo 3**, se sintetizaron nanopartículas de cobre (NpCu) y matrices nanocompuestas siguiendo un esquema semejante al del Capítulo 2.*

*En el **Capítulo 4**, las matrices de quitosano funcionalizadas con Np se combinaron con PVA a fines de mejorar las propiedades mecánicas y de barrera. Estas matrices se*

aplicaron como apósitos y en ensayos de difusión. En el caso de los apósitos, se realizaron pruebas de hemólisis, adhesión de plaquetas y se estudió su influencia sobre tiempos de coagulación. Otra aplicación se realizó en el área de envasado de alimentos. A pesar de que los materiales no fueron diseñados para su uso en contacto directo con alimentos, se analizó la difusión de los iones cobre en una matriz alimenticia modelo. Se cuantificó la transferencia de iones cobre hacia la matriz alimenticia por espectrometría de absorción atómica y se aplicó un modelo a fin de ajustar la cinética del proceso.

Articulando con el grupo de los Drs. Pizzio y Rengifo-Herrera, en el **Capítulo 5**, se formularon matrices nanocompuestas de quitosano funcionalizadas con nanopartículas de TiO₂ para su aplicación como materiales autolimpiantes realizando ensayos de fotodegradación de verde de malaquita.

La capacidad antimicrobiana de las matrices desarrolladas se presentó en el **Capítulo 6**. Se usaron bacterias Gram-positivas (*S. aureus* y *S. epidermidis*), Gram-negativas (*Salmonella* y *E. coli*) y *Candida albicans* para realizar distintos ensayos, difusión en agar, observación por SEM y TEM, cortes histológicos en TEM, potencial zeta y ATR-FTIR. Todas las matrices demostraron tener propiedades antimicrobianas al ser contrastadas contra los materiales con NpAg con probada acción antibacteriana.

Asimismo, en el **Capítulo 7**, se expusieron los resultados obtenidos mediante el empleo de la técnica de electrohilado con un equipo de construcción casera. En línea con las aplicaciones en el campo biomédico o cosmético, esta técnica de gran versatilidad, brinda la posibilidad de crear nuevas estructuras y productos y abre las puertas a un nuevo horizonte tecnológico permitiendo el diseño de nanoestructuras fibrosas funcionalizadas. Explorando aplicaciones en otros campos, las matrices electrohiladas cargadas con nanopartículas de cobre se aplicaron como filtros para retener material particulado del medio ambiente de tamaños menores que 2.5 y 10 µm.

Por otra parte, se desarrolló un sistema bicapa mediante formación de una capa electrohilada sobre una película de quitosano obtenida por moldeo para mejorar las propiedades mecánicas del sistema.

La toxicidad y citotoxicidad de las matrices y sus componentes se analizaron en el **Capítulo 8**. Para los ensayos de toxicidad se usaron peces zebra fish y se estudiaron diversos parámetros, morfología, frecuencia cardíaca, movimiento espontáneo,

mortalidad. La citotoxicidad se analizó frente a la línea celular Ha-Cat que mantuvo una alta viabilidad frente a las películas funcionalizadas.

*En el **Capítulo 9** se expusieron los resultados de los ensayos de biodegradabilidad. La pérdida de peso fue más acentuada en el caso de las películas de quitosano. Por otra parte, la cinética de degradación de las películas PVA resultó más lenta comparada con las otras formulaciones, compatible con un polímero sintético. Las fotografías permitieron observar el cambio de color, la aparición de rugosidad y la pérdida de masa con el avance del proceso de biodegradación. Las micrografías obtenidas por SEM corroboraron los ataques de las enzimas secretadas por diversos microorganismos como bacterias y hongos que produjeron la endo-escisión de la matriz. Asimismo, los espectros obtenidos mediante ATR-FTIR demostraron las transformaciones sufridas por las películas a nivel molecular.*

TABLA DE CONTENIDO

Introducción a la nanotecnología	1
Dos enfoques en pugna bottom-up o top-down	2
Nanopartículas metálicas	5
Tipos de estabilización de los coloides metálicos	8
Estabilización electrostática	8
Estabilización estérica	8
Estabilización electrostérica	9
La nanotecnología aplicada a alimentos	10
La nanotecnología en el envasado de alimentos	12
Nanomateriales inorgánicos y de óxido metálico aplicados en envases de alimentos	13
Nanocosmética y nanomedicina	17
OBJETIVO GENERAL	22
REFERENCIAS	23
CAPÍTULO 1	
1.1 INTRODUCCIÓN	29
1.1.1 Quitosano	29
1.1.2 Alcohol polivinílico	34
Efecto del grado de hidrólisis	36
1.1.3 Polivinil pirrolidona: antecedentes	36
1.2 OBJETIVOS	40
1.2.1 Objetivo general	40
1.2.2 Objetivos específicos	40
1.3 MATERIALES	41
1.4 MÉTODOS	41
1.4.1 Análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC)	41
1.4.2 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier y reflectancia total atenuada (ATR-FTIR)	41
1.4.3 Difracción de rayos X (DRX)	42
1.5 RESULTADOS	42
1.5.1 Quitosano	42
Determinación de impurezas, cenizas y contenido de humedad	42
Determinación de peso molecular viscosimétrica	44

Grado de desacetilación por potenciometría	48
Análisis térmico por DSC	52
Análisis ATR-FTIR y RX	54
1.5.2 Alcohol polivinílico	58
Análisis térmico por DSC	59
Análisis ATR-FTIR y RX	60
1.5.3 Polivinil pirrolidona (PVP)	62
Análisis térmico por DSC	63
Análisis ATR-FTIR y RX	64
1.6 REFERENCIAS	66
CAPÍTULO 2	
2.1 INTRODUCCIÓN	75
2.1.1 Nanopartículas de Ag	75
2.1.2 Síntesis verde de NpAg	77
Síntesis usando biopolímeros	77
2.1.3 Formulación de nanocompuestos	79
2.2 OBJETIVOS	83
2.2.1 Objetivo general	83
2.2.2 Objetivos específicos	83
2.3 MATERIALES Y MÉTODOS	84
2.3.1 Síntesis de nanopartículas de plata	84
2.3.2 Caracterización de las nanopartículas	84
2.3.3 Obtención de los nanocompuestos	86
2.3.4 Caracterización de las películas nanocompuestas a base de quitosano	86
2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	90
2.4.1 Caracterización de las nanopartículas	90
Análisis de las NpAg por espectroscopía UV-Visible	90
Análisis por microscopía TEM y SEM	92
Patrón de difracción de RX	95
Tamaño por DLS	97
Espectro de fluorescencia de la suspensión de NpAg en quitosano	98
2.4.2 Análisis de los nanocompuestos QAg	98
Propiedades de resistencia al agua	98

Propiedades ópticas	102
Propiedades mecánicas	106
Análisis térmico	107
Análisis microestructural por SEM	112
DRX de las matrices nanocompuestas	113
Análisis ATR-FTIR	116
2.5 CONCLUSIONES	120
2.6 REFERENCIAS	121
CAPÍTULO 3	
3.1 INTRODUCCIÓN	131
3.1.1 Nanopartículas de cobre y matrices nanocompuestas a base de polímeros	131
3.2 OBJETIVOS	134
3.2.1 Objetivo general	134
3.2.2 Objetivos específicos	134
3.3. MATERIALES Y MÉTODOS	135
3.3.1 Síntesis de nanopartículas de cobre	135
3.3.2 Formulación de nanocompuestos a base de quitosano	135
3.3.3 Caracterización de las nanopartículas de cobre	137
3.3.4 Caracterización de matrices a base de quitosano	137
Análisis AFM	137
Espectroscopía de tiempo de vida media de aniquilación de positrones (PALS)	137
Técnicas quimiométricas PCA y PLS	138
3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	139
3.4.1. Formación de las nanopartículas de cobre	139
Caracterización de las nanopartículas por SEM y TEM	141
Difracción de RX de NpCu	145
Espectro de fluorescencia de la suspensión de NpCu en quitosano	147
3.4.2 Caracterización de los nanocompuestos QCu	148
Propiedades de resistencia al agua de los nanocompuestos QCu	148
Propiedades ópticas	150
Propiedades mecánicas	153
Análisis térmico	153
Análisis microestructural	157

Microscopía de fuerza atómica	158
Análisis de los nanocompuestos QCu por DRX	159
Espectroscopía de tiempo de vida media de aniquilación de positrones (PALS)	162
ATR-FTIR	165
Análisis PCA y PLS	167
3.5 CONCLUSIONES	169
3.6 REFERENCIAS	170
CAPÍTULO 4	
4.1 INTRODUCCIÓN	177
4.1.1 Tipos de biopolímeros y nanopartículas	179
4.1.2 Efectos de los nanomateriales sobre las propiedades funcionales de las películas basadas en polímeros	180
4.2 OBJETIVOS	181
4.2.1 Objetivo general	181
4.2.2 Objetivos específicos	181
4.3 MATERIALES Y MÉTODOS	182
4.3.1 Materiales	180
4.3.2 Preparación de las películas	180
4.3.3 Propiedades fisicoquímicas de las matrices nanocompuestas QNp-PVA con agregado de nanopartículas metálicas (Ag/Cu)	184
4.4 RESULTADOS y DISCUSIÓN	186
4.4.1 Susceptibilidad al agua de los nanocompuestos	186
4.4.2 Propiedades de barrera (WVP)	188
4.4.3 Medidas del ángulo de contacto	190
4.4.4 Propiedades ópticas	192
4.4.5 Propiedades mecánicas	196
4.4.6 Análisis ATR-FTIR de Q, PVA y las matrices nanocompuestas Q-PVA	199
4.5 APLICACIÓN I	202
4.5.1 Análisis cualitativo ex vivo de la penetración de NpAg en piel	202
4.5.2 Objetivos	203
4.5.3 Materiales y métodos	203
4.5.4 Resultados	204
4.5.5 Conclusiones	211
4.6 APLICACIÓN II	211

4.6.1 Hemocompatibilidad in vitro	211
4.6.2 Fases de cicatrización de heridas cutáneas	212
4.6.3 Objetivos	215
4.6.4 Materiales y métodos	215
Tiempo de coagulación	215
Ensayo de hemólisis	215
Adhesión de plaquetas	216
4.6.5 Resultados	216
Adhesión de plaquetas sobre superficies de biomateriales	219
4.6.6 Conclusiones	221
4.7 APLICACIÓN III	222
4.7.1 Migración/liberación de NpCu presente en matrices nanocompuestas	222
4.7.2 Objetivos	222
4.7.3 Materiales y métodos	223
Migración en sistema modelo alimenticio	223
Cuantificación del cobre mediante espectrofotometría de absorción atómica	223
4.7.4 Resultados	224
Concentración de Cu en películas nanocompuestas de quitosano y PVA	224
Ensayos de migración	225
Difusión en papa	225
4.8 CONCLUSIONES	229
4.9 REFERENCIAS	230
CAPÍTULO 5	
5.1 INTRODUCCIÓN	239
5.1.1 Minerales y estructura cristalina	239
5.1.2 Matrices a base de quitosano funcionalizadas con nanopartículas de TiO ₂	244
5.2 OBJETIVOS	251
5.2.1 Objetivo general	251
5.2.2 Objetivos específicos	251
5.3 MATERIALES	252
5.4 METODOLOGÍA	252
5.4.1 Síntesis de nanopartículas de dióxido de titanio modificado con ácido tungstofosfórico (TPA-TiO ₂).	252
5.4.2 Obtención de matrices QT _i y QP-25	254

5.4.3 Caracterización de las muestras	255
Espectroscopía de reflectancia difusa (DRS)	255
Difracción de rayos X (DRX)	255
Microscopía electrónica de barrido con espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (SEM-EDS)	255
Espectroscopía infrarroja de reflectancia total atenuada (ATR-FTIR)	255
5.4.4 Experimentos de fotodegradación	256
5.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	258
5.5.1 Caracterización de las nanopartículas por microscopía electrónica	258
5.5.2 Tamaño de las nanopartículas por DSL	260
5.5.3 ATR-FTIR de nanopartículas TPA-TiO ₂	261
5.5.4 Análisis superficial por espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS)	262
5.5.5 Caracterización de los nanocompuestos QTi	264
5.5.6 Propiedades fisicoquímicas de las matrices de QTi	264
5.5.7 Ángulo de contacto	267
5.5.8 Parámetros de color	268
5.5.9 Propiedades mecánicas	269
5.5.10 Análisis térmico por DSC, DMA y TGA	271
5.5.11 Difracción de rayos X	276
5.5.12 Microscopía electrónica de barrido (SEM-EDS)	279
5.5.13 Análisis microestructural por microscopía de fuerza atómica	282
5.5.14 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier combinada con reflectancia total atenuada (ATR- FTIR). Análisis por componentes principales (PCA)	285
5.5.15 Espectroscopía de tiempo de vida media de aniquilación de positrones (PALS)	288
5.6 APLICACIÓN	291
5.6.1 Reacciones de fotodegradación de verde de malaquita en interfases gas-sólido con diferentes longitudes de onda	291
5.6.2 Evaluación de los ciclos de reutilización	294
5.7 CONCLUSIONES	299
5.8 REFERENCIAS	299
CAPÍTULO 6	
6.1 INTRODUCCIÓN	315
6.1.1. Enfermedades transmitidas por alimentos	316
6.1.2 Materiales activos: una estrategia de control microbiológico	318

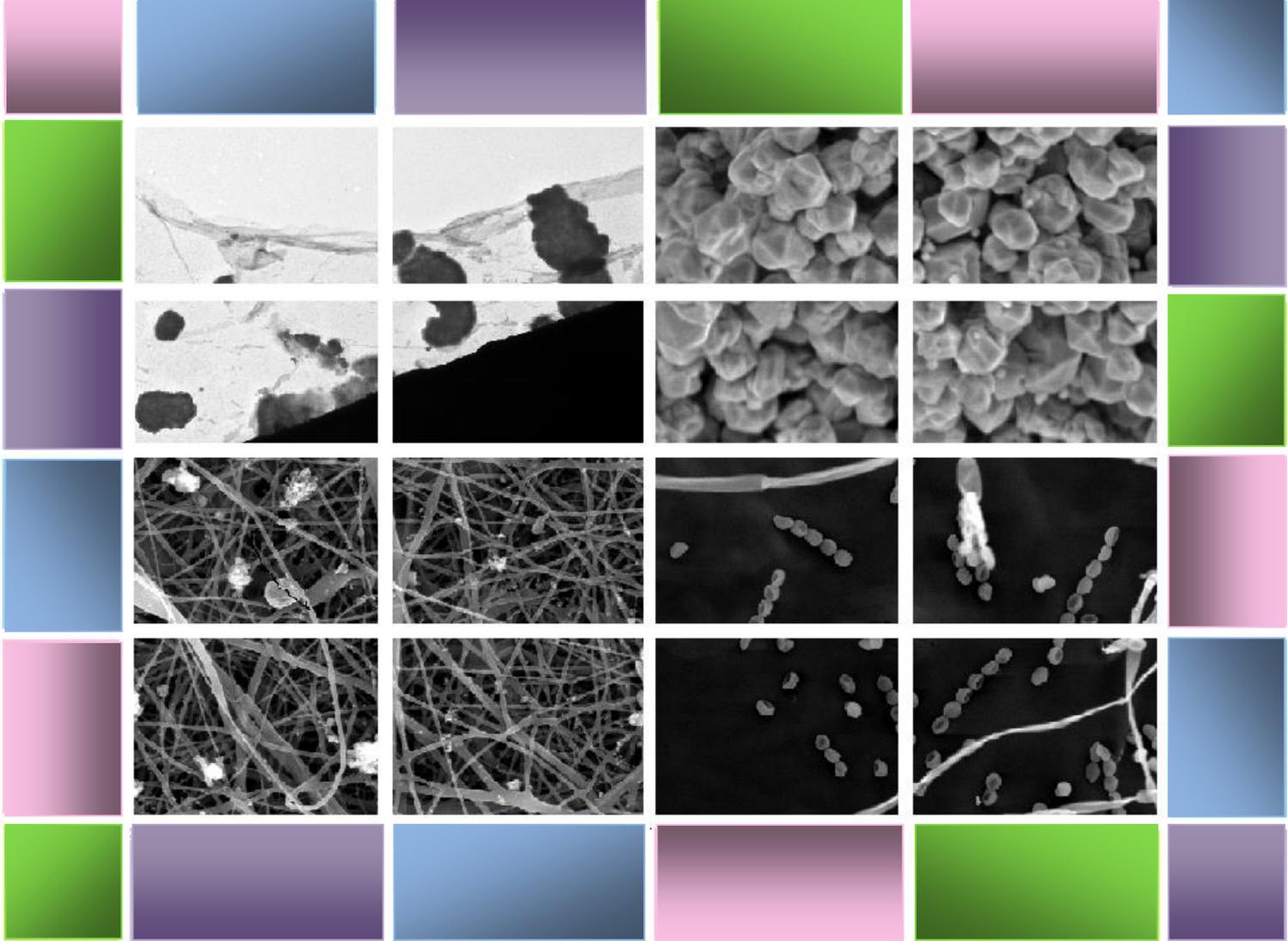
6.1.3 Nanopartículas metálicas en el diseño de materiales activos	319
6.1.4. Aplicaciones emergentes de matrices poliméricas con nanopartículas metálicas: apósitos para piel	321
6.2 OBJETIVOS	324
6.2.1 Objetivo general	324
6.2.2 Objetivos específicos	324
6.3 MATERIALES y MÉTODOS	324
6.3.1 CMI y CMB: Prueba de dilución en caldo	324
Preparación de los inóculo	324
Preparación de las diluciones	324
6.3.2 Método convencional de difusión de disco	326
Actividad antimicrobiana	327
6.3.3 Análisis de muestras de suspensiones de microorganismos patógenos mediante diferentes métodos	328
Potencial zeta y ATR-FTIR de las suspensiones de bacterias	328
Preparación de los cortes ultrafinos para TEM	330
Preparación de las suspensiones para microscopía electrónica SEM y TEM	330
6.4 DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	331
6.4.1 Concentración mínima inhibitoria	331
6.4.2 Propiedades antimicrobianas de las películas nanocompuestas	333
6.4.3 Actividad antimicrobiana de nanopartículas metálicas	336
6.4.4 Capacidad antimicrobiana para matrices estudiadas por método de difusión en agar	337
Microorganismo: <i>Candida albicans</i>	337
Microorganismo: <i>Salmonella</i>	343
Microorganismo: <i>Escherichia coli</i>	347
Microorganismo: <i>Staphylococcus aureus</i>	351
Microorganismo: <i>Staphylococcus epidermidis</i>	356
6.4.5 Potencial zeta	360
Interacción con células antifúngicas	363
6.4.6 Espectroscopía infrarroja aplicada al estudio de sistemas biológicos	365
6.4.7 Observación de suspensiones de bacterias por TEM y SEM	372
6.4.8 Cortes delgados de bacterias para observación por TEM	387
6.5 CONCLUSIONES	395
6.6 REFERENCIAS	396

CAPÍTULO 7

7.1 INTRODUCCIÓN	413
7.1.1 Diseño de nanoestructuras por electrohilado	415
7.1.2 Principio de electrohilado	415
7.1.3 Variaciones experimentales	417
Composición de la fibra	417
Orientación de la fibra	417
7.2 OBJETIVOS	420
7.2.2 Objetivos generales	420
7.2.3 Objetivos específicos	420
7.3 MATERIALES Y MÉTODOS	421
7.3.1 Materiales	421
7.3.2 Métodos	421
Formulación de las soluciones	421
Formación de fibras por electrohilado	421
Formulación de las soluciones para la bicapa	424
Caracterización de la morfología y tamaño de las fibras	424
Microscopía de barrido SEM	424
Tratamientos térmicos	425
7.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	426
7.4.1 Comportamiento reológico y conductividad de las soluciones	426
7.4.2 Propiedades relacionadas con la afinidad por el agua	429
7.4.3 Análisis microestructural por SEM	429
7.4.4 Análisis térmico por DSC	436
7.4.5 DRX: análisis y deconvolución	438
7.4.6 Análisis de las matrices electrohiladas por ATR-FTIR	440
7.4.7 Capacidad antimicrobiana de las matrices electrohiladas	446
7.5 APLICACIÓN	452
7.5.1 Aplicación de matrices fibrosas a la retención de material particulado PM	452
7.5.2 Muestreo de partículas, extracción y análisis	452
7.5.3 Tratamiento térmico de las matrices electrohiladas (filtros)	454
7.5.4 Calidad del aire	456
7.5.5 Observación microscópica por SEM	456

7.6 CONCLUSIONES	458
7.7 REFERENCIAS	459
CAPÍTULO 8	
Parte I: TOXICIDAD	467
8.1 INTRODUCCIÓN	467
8.2 OBJETIVOS	469
8.3 MATERIALES Y MÉTODOS	469
8.3.1 Obtención de embriones de pez cebra	469
8.3.2 Muestras a ensayar	471
8.3.3 Aspectos éticos	473
8.4 RESULTADOS	473
8.4.1 Movimiento espontáneo	473
8.4.2 Morfología	475
8.4.3 Frecuencia cardíaca (FC)	478
8.4.4 Evaluación de la mortalidad	479
8.5 CONCLUSIONES	482
Parte II: CITOTOXICIDAD	483
8.6 INTRODUCCIÓN	483
8.7 MATERIALES Y MÉTODOS	483
8.7.1 Ensayos de regeneración celular	483
8.7.2 Ensayos de citotoxicidad in vitro	484
8.8 RESULTADOS	485
8.8.1 Ensayos de regeneración celular	485
8.8.2 Viabilidad celular	489
8.9 CONCLUSIONES	492
8.10 REFERENCIAS	493
CAPÍTULO 9	
9.1. INTRODUCCIÓN	496
9.2. OBJETIVOS	505
9.3. MATERIALES	506
9.4. METODOLOGÍA	506
9.4.1 Estudios morfológicos y estructurales	509
9.5. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	510

9.5.1 Estudio de las propiedades macroscópicas	510
9.5.2 Estudio de las propiedades morfológicas	521
9.5.3 Análisis de la biodegradación mediante ATR-FTIR	528
9.6 CONCLUSIONES	532
9.7 REFERENCIAS	534
CONCLUSIONES GENERALES	541
ANEXO	
Permeabilidad al vapor de agua (WVP)	I
Ángulo de contacto	IV
Propiedades ópticas	VI
Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis)	VIII
Espectroscopía de absorción atómica	X
Resonancia del plasmón superficial (RPS)	XI
Reflexión interna total	XI
Plasmón de superficie	XII
Resonancia plasmónica (polarización) de una nanopartícula metálica	XIV
Potencial zeta	XV
Dispersión dinámica de luz (DLS)	XVII
Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS)	XXI
Caracterización morfológica por TEM y SEM	XXIII
Espectroscopía de tiempo de vida media de aniquilación de positrones (PALS)	XXVI
Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	XXVIII
Espectroscopía de infrarrojo (IR) con transformada de Fourier	XXX
Microscopía de fuerza atómica (AFM)	XXI
Operación del AFM	XXXIII
REFERENCIAS	XXXVI



Antecedentes

ANTECEDENTES

Introducción a la nanotecnología

En diciembre de 1959, el físico estadounidense Richard Feynman ([Wyser y col., 2016](#)) dio una conferencia ante la *American Physical Society* titulada *There's Plenty of Room at the Bottom* (hay mucho espacio en el fondo). En esta conferencia, Feynman mencionó los beneficios que supondría para la sociedad el poder manipular la sustancia y fabricar artefactos con una precisión de unos pocos átomos utilizando el término *miniaturización*.

Sin embargo, quien acuñó el término *nanotecnología* fue Norio Taniguchi en el año 1974 en relación a procesos de separación, consolidación y deformación de materiales por un átomo o una molécula.

Desde entonces, la nanociencia y la nanotecnología se han convertido en campos apasionantes de investigación y desarrollo.

Asimismo, con base en la *National Nanotechnology Initiative* (NNI), la nanotecnología se puede describir como el área encargada del estudio, diseño, caracterización, síntesis y aplicación de materiales y sistemas, cuyas estructuras y componentes exhiben nuevas propiedades físicas, químicas o biológicas debido a su tamaño nanométrico ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$) ([Huang y col., 2018](#); [Roco 2007](#)). Estas nuevas propiedades han ido ganando importancia debido al incremento del área superficial ([Alcalá-Alcalá y Quintanar-Guerrero, 2015](#)).

La velocidad de la difusión de las nanotecnologías se advierte en la creciente diversidad de productos que las han incorporado: desde procesadores electrónicos hasta cosméticos, pasando por medicamentos, textiles y levas para motores de automóviles y de aviones ([Chávez y Patiño, 2009](#)).

Hay numerosos nanomateriales que se han reportado en estudios previos, generalmente divididos en la llamada dimensión cero (nanopartículas (Np): quantum puntos, nanocúmulos y fullerenos), unidimensionales (nanotubos y nanovarillas), bidimensionales (películas delgadas) y nanomateriales tridimensionales (por ejemplo, nanocompuestos y nanofibras) ([Sharma y col., 2017](#)) ([Figura 1](#)). Estos materiales han exhibido propiedades mesoscópicas inusuales, incluyendo gran superficie específica,

pequeño tamaño, alta reactividad, alta resistencia y ductilidad, que son las razones de que los nanomateriales son con frecuencia aplicados en una gama diversa de campos industriales (Ariyaratnay col., 2017).

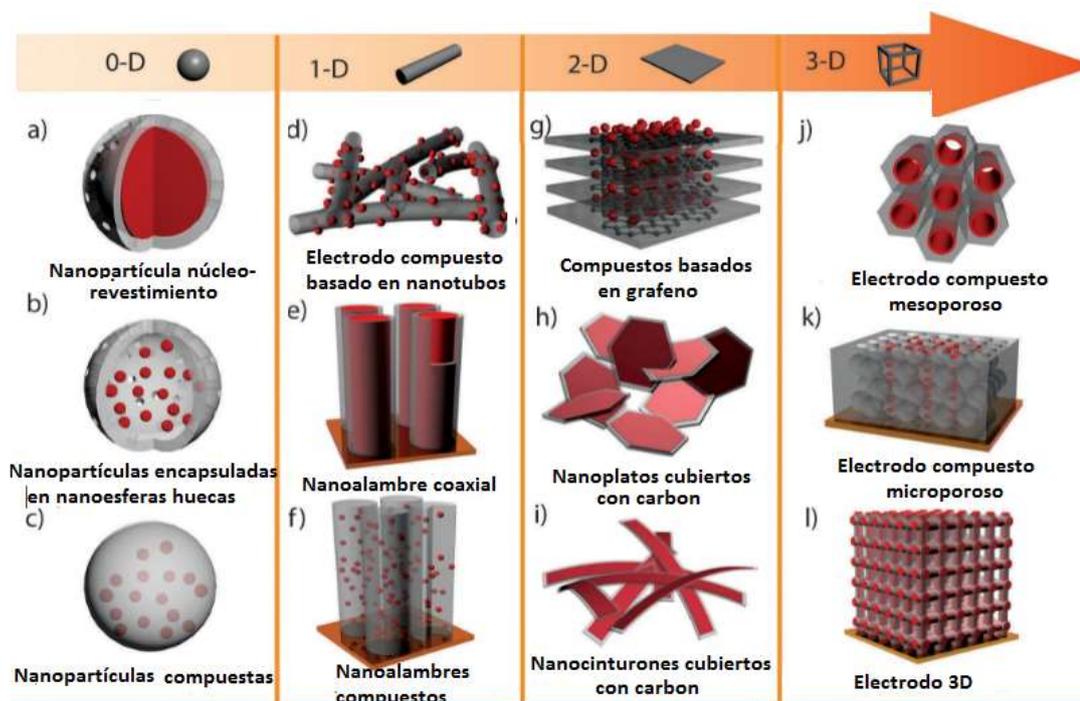


Figura 1. Materiales nanoestructurados heterogéneos con diferentes morfologías. <https://www.quora.com/What-is-the-difference-between-one-two-three-and-zero-dimensional-nanomaterials>

Dos enfoques en pugna *bottom-up* o *top-down*

Existen diferentes enfoques para abordar la nanotecnología, *bottom-up* o construcción ascendente y *top-down* o construcción descendente (Figura 2). En el proceso *bottom-up*, los átomos y moléculas son ensamblados uno a uno, en reacciones químicas controladas, como bloques de construcción que van creciendo hasta generar la nanoestructura deseada. Por otro lado, el enfoque *top-down* utiliza técnicas como la fragmentación, corte o grabado, a través de procesos de mecanizado de película, de superficie o litografía para reducir el tamaño de los materiales hasta la escala nanométrica. El enfoque *bottom-up* se considera ideal para ser aplicado en nanotecnología, pues ofrece una gama de posibilidades en el diseño y construcción de nuevos sistemas capaces de desarrollar diferentes funciones (Alcalá-Alcalá y Quintanar-Guerrero, 2015; Majumder y col., 2007).

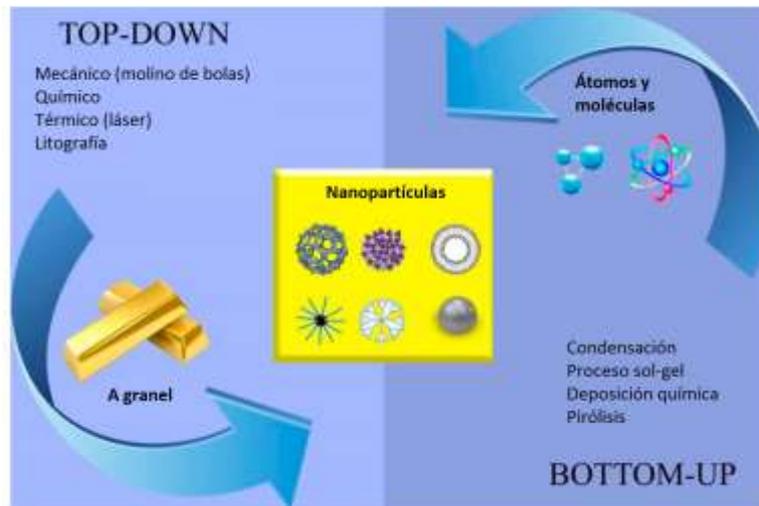


Figura 2. Métodos de síntesis de nanopartículas. Adaptado de Barabadi y col. (2019).

En los últimos años, el campo de la nanotecnología ha impulsado varios de los avances más importantes en ciencia, ingeniería y producción desde la revolución industrial.

Según el origen, los nanomateriales pueden clasificarse como naturales o sintéticos. Los naturales se producen en la naturaleza a través de procesos biogeoquímicos o mecánicos, sin conexión directa o indirecta con la actividad humana o proceso antropogénico. Los sintéticos son concebidos, diseñados y producidos intencionalmente por los seres humanos o producidos de forma no intencional como resultado de cualquier forma de influencia humana directa o indirecta o por procesos antropogénicos (nanomateriales incidentales). Reacciones fotoquímicas, erupciones volcánicas o incendios forestales son algunos de los procesos naturales que llevan a la producción natural de nanopartículas (Bartošová y Nikolaevna Ivanova, 2019).

Los nanomateriales pueden organizarse en cuatro grupos según su base:

- ✚ Nanomateriales a base de carbono - generalmente contienen carbono y se pueden encontrar como tubos, elipsoides y esferas. Fullerenos, nanotubos de carbono, nanorellenos de carbono, grafeno pertenecen a este grupo (Jeevanandam y col., 2018).

- ✚ Nanomateriales inorgánicos que contienen metales u óxidos metálicos, pueden ser sintetizados y modificados con varios grupos funcionales químicos.

✚ Nanomaterial de base orgánica. Estos Nms hechos principalmente de materia orgánica tienen aplicación en el campo biomédico como portadores y liberadores de drogas. Por ejemplo, nanopartículas a base de lípidos (liposomas), Np a base de proteínas o micelas (Shatrohan Lal, 2014)

✚ Los nanomateriales compuestos son materiales multifásicos y nanoestructurados (NSM) con una fase a escala nanométrica que puede combinar con otras Np o con materiales a granel (por ejemplo, nanofibras híbridas) o estructuras más complicadas, como una estructura metal-orgánica. Los compuestos pueden ser cualquier combinación de nanomateriales a base de carbono, de metales u orgánicos con cualquier forma (Jeevanandam y col., 2018).

Algunos campos de aplicación de la nanotecnología se explicitan en la [Tabla 1](#).

Tabla 1. La nanotecnología aplicada a diferentes campos. Adaptada de [Pal y col. \(2011\)](#).

Campo de aplicación	Aplicación
Nanomedicina	Ingeniería de tejido, nanoencapsulados de drogas
Químicos y cosméticos	Compuestos a nivel nanoescala, pinturas, recubrimientos
Materiales	Nanopartículas, nanotubos de carbono, pinturas, biopolímeros
Ciencias de los alimentos y medio ambiente	Filtros de agua y purificación de aire, células fotovoltaicas
Energía e industria militar	Biosensores, armas
Electrónica	Chips semiconductores, tarjetas de memoria
Herramientas científicas	Microscopía de túnel, AFM, SEM
Agricultura	Microscopía de túnel, AFM, SEM

Nanopartículas metálicas

Las nanopartículas metálicas presentan características únicas como resonancia del plasmón superficial con longitud de onda en la región visible y propiedades ópticas específicas. En la era medieval, las nanopartículas metálicas se empleaban para decorar las ventanas de la catedral. En el campo biomédico, se ha encontrado muy interesante la posibilidad de tratar directamente células y tejidos afectados, sin alteración y envenenamiento de las células sanas.

En 1857, Faraday realizó la primera investigación de la existencia de nanopartículas metálicas en solución. En 1908, Mie dio una explicación cuantitativa de su color. Hoy en día los nanomateriales se pueden preparar y modificar con varios grupos funcionales químicos que les permiten unirse con anticuerpos, ligandos o drogas. Las nanopartículas metálicas ofrecen una amplia gama de aplicaciones en el área terapéutica, la biotecnología, los vehículos para la entrega de genes y medicamentos.

La aplicación generalizada de nanopartículas metálicas es atribuible a sus propiedades únicas (Makarov y col., 2014; Zhang y col., 2007;). Diferentes procesos físicos y químicos son actualmente usados para sintetizar nanopartículas metálicas, que permiten obtener partículas con las características deseadas (Makarov y col., 2014).

Debido a la limitada capacidad de las plantas para reducir los iones metálicos, la eficiencia de la síntesis de nanopartículas metálicas también depende del potencial electroquímico de un ión (Haverkamp y Marshall, 2009) (Figura 3). Por lo tanto, la capacidad de un extracto de planta para reducir iones metálicos puede ser significativamente más alto en el caso de iones con un gran potencial electroquímico positivo (por ejemplo, Ag^+) que en el caso de iones con un bajo potencial electroquímico como $[\text{Ag}(\text{S}_2\text{O}_3)_2]^{3-}$ (Haverkamp y Marshall, 2009; Makarov y col., 2014).

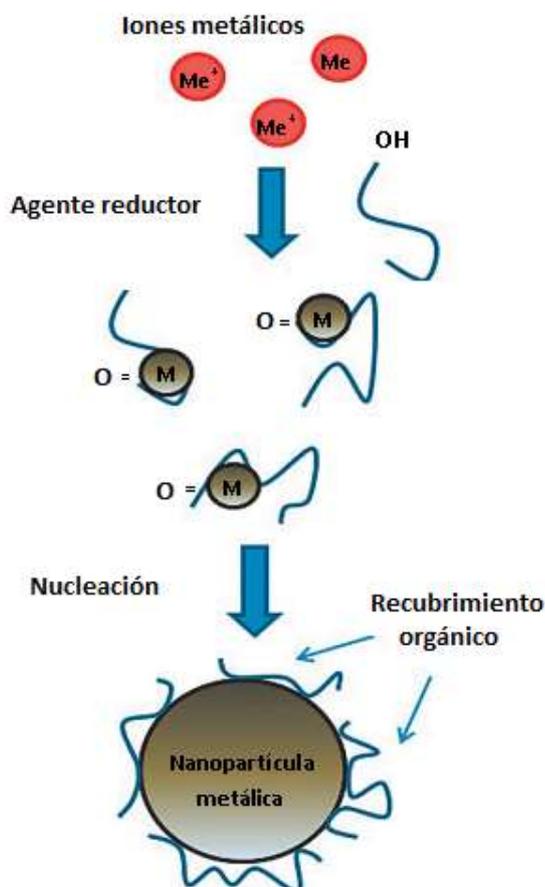


Figura 3. Representación esquemática de síntesis de nanopartículas metálicas en un extracto vegetal. Los iones metálicos se unen a los metabolitos reductores y agentes estabilizadores y se reducen a átomos metálicos. El complejo resultante del ion metálico y el metabolito interactúa con complejos similares formando una pequeña nanopartícula metálica. Adaptado de [Makarov y col. \(2014\)](#).

El pH ejerce gran influencia sobre la formación de nanopartículas. Un cambio en el pH resulta en un cambio de carga en los fitoquímicos naturales contenidos en un extracto, que afectan su capacidad para unir y reducir los cationes y aniones metálicos en el curso de la síntesis de nanopartículas, y esto a su vez puede afectar a la forma, el tamaño y el rendimiento de las nanopartículas ([Makarov y col., 2014](#)).

La temperatura es otro factor importante que influye en la formación de nanopartículas ([Bankar y col., 2010](#)). Además, los experimentos sobre la síntesis de nanopartículas de plata en extractos de verbena limón (*Aloysia citrodora*) demostraron

que el aumento de la temperatura de reacción se acompaña por un aumento en la eficiencia de la reducción de iones de plata (Makarov y col., 2014).

Las nanopartículas de plata (NpAg) son agentes antimicrobianos ampliamente investigados aplicados en una amplia gama de productos de consumo, tales como textiles, envases de alimentos y cosméticos. Sin embargo, su impacto a largo plazo sobre la salud humana y el medio ambiente sigue siendo en gran medida desconocido. Investigaciones recientes sugieren que todavía se necesita una producción tecnológicamente simple de dispersiones estables de NpAg que sean ecológicamente aceptables y biocompatibles, respondiendo a los problemas de seguridad relacionados con su uso y eliminación. Por ejemplo, los materiales actuales cargados con NpAg liberan partículas durante el enjuague/lavado que finalmente van al sistema de aguas residuales y el medio ambiente, donde pueden llegar a ser perjudiciales para la exposición humana descontrolada y también para los microbios esenciales para los sistemas ecológicos.

Además, se informó que las nanopartículas de Ag fueron capaces de cruzar barreras biológicas en humanos, es decir, barrera hematoencefálica con acumulación no deseada en diferentes tejidos. Biopolímeros, como polisacáridos, son cada vez más usados como agentes de recubrimiento de las nanopartículas anticipando múltiples beneficios de los nanohíbridos formados. Los polisacáridos servirían como: (i) reductores en síntesis de NpAg a partir de sales de Ag^{+1} , siendo alternativas naturales a los reactivos químicos agresivos, (ii) estabilizantes de dispersiones de Np prolongando su vida útil; (iii) agentes protectores que disminuyen la toxicidad de las NpAg en las células humanas, (iv) potenciadores de las propiedades antimicrobianas intrínsecas de las NpAg, y (v) proveedores de los grupos funcionales necesarios para su inmovilización permanente sobre sustratos sólidos o su posterior funcionalización superficial.

El quitosano, en particular, es adecuado como portador de NpAg debido a su carga positiva que evita la agregación de partículas. Al mismo tiempo, el recubrimiento de quitosano formado alrededor de las NpAg mejora la compatibilidad de las nanopartículas con células y tejidos humanos. El recubrimiento de las nanopartículas con quitosano también puede resultar en un mayor efecto bactericida sobre las bacterias planctónicas

en comparación con Q o NpAg solas, especialmente debido al carácter catiónico del Q que causa perturbación de las membranas bacterianas (Francesko y col., 2017).

Otro beneficio importante del uso de Q es la posibilidad de explotar la síntesis verde de NpAg, sustituyendo reactivos como NaBH_4 . En un enfoque sintético verde, el quitosano reduce la Ag^{+1} a plata elemental, mientras que sus macromoléculas interactúan simultáneamente con la superficie de las NpAg formadas y las estabiliza.

La idea de usar plata como agente antimicrobiano ha sido implementada en diversos productos. Un ejemplo del uso de nanopartículas de plata se encuentra en los filtros de aire acondicionado; asimismo la plata se ha introducido en refrigeradores y lavadoras.

Tipos de estabilización de los coloides metálicos

Las partículas coloidales son inestables y exhiben una tendencia a aglomerarse, así que deben ser estabilizadas para conservar el coloide. La utilización de un agente estabilizante origina una fuerza de repulsión que contrarresta las fuerzas de Van der Waals que atraen dos partículas a distancias cortas. La estabilización se puede dar por efectos electrostáticos, por impedimento estérico o por una combinación de los dos.

Estabilización electrostática

En este caso, la presencia de iones sobre la superficie de las partículas y sus respectivos contraiones producen una doble capa (opuestas entre sí) a su alrededor. Esto genera una repulsión de tipo electrostático entre las partículas (Figura 4a) y evita la agregación si la diferencia de potencial en la doble capa es lo suficientemente alta.

Estabilización estérica

La adsorción de moléculas (polímeros, oligómeros, dendrímeros) o la coordinación de ligandos sobre la superficie de las partículas proporcionan una capa protectora que evita la agregación (Figura 4b). Cuando dos capas protectoras comienzan a interpenetrarse se da un aumento local de la concentración de moléculas adsorbidas, originando una repulsión osmótica ya que el disolvente trata de restablecer el equilibrio mediante la dilución de las moléculas y separando de este modo las partículas.

Estabilización electrostérica

Se puede combinar la estabilización electrostática y la estérica. Los compuestos usados (agentes tensoactivos iónicos) contienen un grupo polar capaz de generar una doble capa eléctrica y una cadena lipofílica capaz de proporcionar la repulsión estérica (Figura 4c).

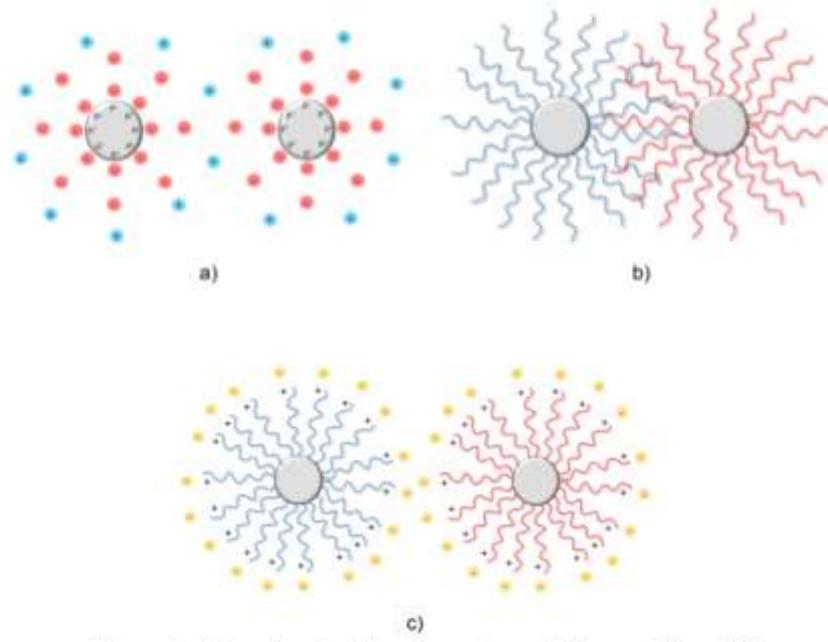


Figura 4. Tipos de estabilización en los coloides metálicos. Adaptado de Zhao y col. (2008).

Los efectos de superficie son muy importantes ya que hay un incremento del área superficial por unidad de volumen. Los átomos de la superficie de las nanopartículas están menos unidos que el resto de los átomos y su esfera de coordinación está incompleta, por lo que se incrementa su energía libre superficial, afectando propiedades como la temperatura de fusión y reactividad química. Por otra parte, la absorción atómica de nanopartículas es un fenómeno de superficie que sufre modificaciones y se puede modular dependiendo de las características de las partículas (composición, tamaño, protectores de superficie, entre otros) como puede observarse en la Figura 5 (Gutiérrez-Wing, 2006).

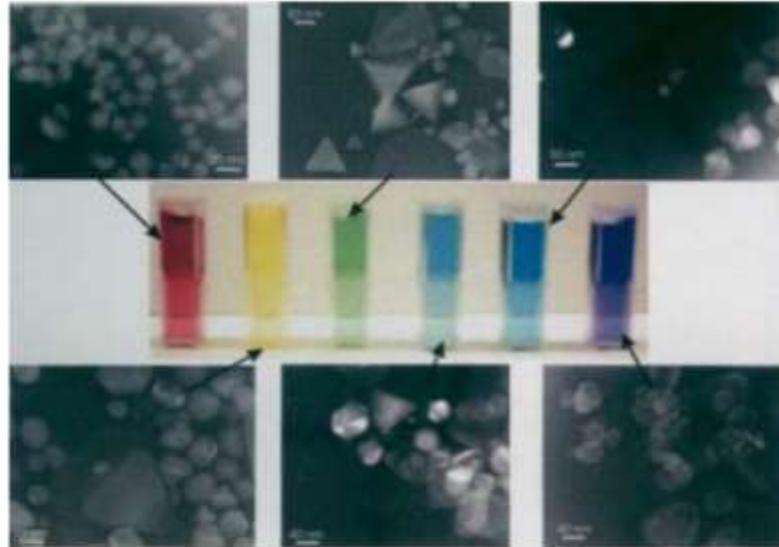


Figura 5. Dispersiones coloidales de nanopartículas metálicas. El color de la dispersión depende de las características de las nanopartículas. Adaptado de [Gutiérrez-Wing \(2006\)](#).

La nanotecnología aplicada a alimentos

Si bien la nanociencia y la nanotecnología son avances científicos innovadores que se han consolidado a partir de este siglo, su utilización en producciones alimentarias y agrícolas es bastante reciente en comparación con su aplicación en otras áreas como la farmacéutica y la liberación controlada de medicamentos. La nanotecnología se presentaría como un nuevo paradigma de desarrollo de avance científico para permitir el crecimiento y la transformación de la disciplina agroalimentaria, con potencial para elevar la producción mundial de alimentos, además del valor nutritivo, la calidad y la seguridad alimentaria ([Chung y col., 2017](#); [Thiruvengadam y col., 2018](#)).

El abordaje del procesamiento de alimentos que involucren el uso de nanomateriales incluye la integración de agentes nutraceuticos, gelificantes y espesantes, propagación de nutrientes, fortificación con minerales y vitaminas, nanoencapsulación de sabores ([Huang y col., 2010](#)). Así, los sistemas con estructuras físicas en escala nanométrica podría afectar características que van desde la seguridad alimentaria hasta la síntesis molecular.

La nanotecnología puede también pueden incrementar la calidad y la seguridad de los alimentos. En este sentido, muchos estudios están evaluando la capacidad de los nanosensores para mejorar la detección de patógenos en los sistemas alimentarios.

Nanoalimentos son productos que se cultivaron, transformaron o envasaron con la ayuda de nanotecnología o de materiales producidos con nanotecnología (Figura 6) (Thiruvengadam y col., 2018).

Canham (2007) encontró que la proteína de la leche α -lactoalbúmina en ciertas condiciones puede autoensamblarse para formar nanoestructuras tubulares. Estas estructuras son formadas en varias etapas. En la primera etapa, la α -lactoalbúmina es parcialmente hidrolizada a través de la actividad de una proteasa de *Bacillus licheniformis*. También, junto con otros componentes, varios derivados se forman con pesos moleculares que varían de 10 a 14 kDa. En presencia de iones de calcio, esta mezcla se ensambla en tubos helicoidales. Nanoquelatos de soja y calcio han resultado ser adecuados para la nanoencapsulación de vitaminas, ácidos grasos omega-3 y licopeno sin afectar a las propiedades organolépticas del alimento (Joseph y Morrison, 2006). Productos lácteos, bebidas, cereales y pan se complementan con minerales, vitaminas, péptidos bioactivos, probióticos, antioxidantes. Algunos de estos componentes activos son añadidos a los alimentos como nanopartículas o partículas de unos pocos nm de tamaño.

Asimismo, las nanopartículas se añaden a distintos alimentos para aumentar las propiedades de flujo, color, y estabilidad durante el procesamiento, o la vida útil. Por ejemplo, materiales de aluminio-silicato se utilizan normalmente como antiaglomerantes en alimentos procesados en polvo, mientras que dióxido de titanio anatasa es un blanqueador de alimentos usado normalmente y un aditivo aclarador empleado en dulces, algunos quesos y salsas (Ashwood y col., 2007).

Independientemente de cómo percibe el público las aplicaciones de la nanotecnología en el sector alimentario, parece claro que la manipulación de la materia a nivel nanoescala seguirá generando nuevos productos.

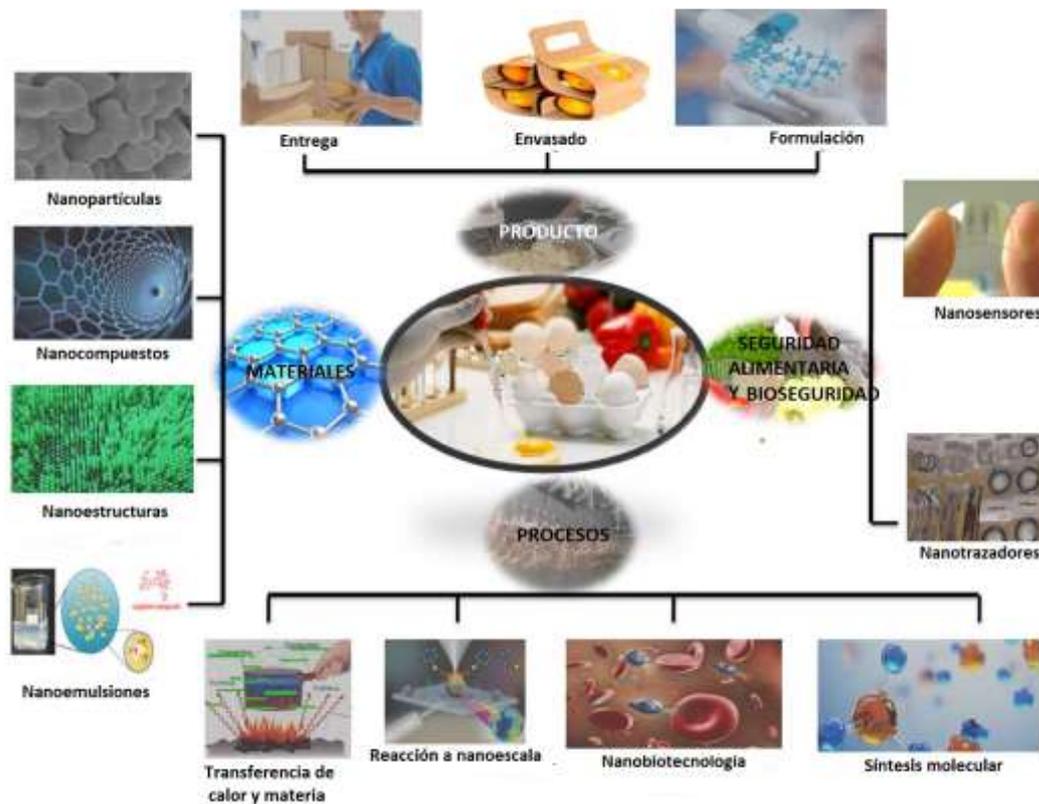


Figura 6. Diferentes etapas en manejo que involucra procesamiento, envasado y preservación ayudados por la tecnología con la asistencia de nanomateriales. Adaptado de Thiruvengadam y col. (2018).

La nanotecnología en el envasado de alimentos

El envasado es un componente clave en la industria alimentaria; sin embargo, su carácter permeable es el mayor defecto en los materiales convencionales de envasado de alimentos. No hay materiales de envasado totalmente resistente a los vapores de agua y gases atmosféricos (Sharma y col., 2017). Además, los productores/consumidores junto con la cadena de suministro de alimentos buscan sistemas de envasado nuevos, rentables, ecológicos e ingeniosos para proteger y controlar la calidad de los alimentos, lo que es posible con una seguridad alimentaria comprometida, calidad y trazabilidad. Como resultado, hay varios factores críticos que impulsan la innovación de los materiales de envasado. Por un lado, facilitan el almacenamiento, manipulación, transporte y protección de los alimentos frente a la contaminación medioambiental y otros factores, y satisfacen las crecientes demandas del mercado, especialmente en relación con la

preferencia del consumidor por productos alimenticios nutritivos y de alta calidad (Han y col., 2018).

Algunos materiales bionanocompuestos están diseñados para mejorar las características funcionales de los envases alimentarios, como el efecto barrera, resistencia mecánica y estabilidad térmica, y otros nanomateriales pueden incorporar agentes bacteriostáticos, antioxidantes, extractos de plantas y enzimas para alargar la vida útil de los productos alimenticios (Youssef y El-Sayed, 2018).

Nanomateriales inorgánicos y de óxido metálico aplicados en envases de alimentos

En general, los nanomateriales aplicados en los envases de alimentos pueden clasificarse en dos categorías: inorgánicos y orgánicos. Para los primeros materiales, se puede considerar metales y óxidos metálicos y nanopartículas de arcilla incorporados a películas bionanocompuestas y nanofibras (Almasi y col., 2018; Hoseinnejad y col., 2018). Además de nanopartículas de plata bacteriostáticas, algunos de los agentes inorgánicos, como las nanopartículas de CuO, ZnO, TiO₂, MgO y Fe₃O₄, han atraído gran interés debido a la inhibición de patógenos y su resistencia a las condiciones de procesamiento. Otros materiales como arcillas podrían ofrecer resistencia a los gases y vapor de agua y mejorar las propiedades mecánicas de los biopolímeros.

El segundo grupo son los materiales orgánicos que incluyen fenoles, compuestos halogenados, sales de amonio, polímeros plásticos, además de polisacáridos naturales o materiales proteicos como quitosano, zeína y aislados de proteínas de suero, que últimamente han sido muy apreciados (Perinelli y col., 2018; Torres-Giner y col., 2017).

Hasta la fecha, la mayoría de los materiales utilizados en las industrias de envasado no son biodegradables. Son plásticos a base de petróleo (aproximadamente el 8% de la producción mundial de gas y materia prima fósil se utiliza para producir polímeros sintéticos), que a su vez, representan un grave problema para el medio ambiente (Kuswandi, 2017).

Tabla 2. Ejemplos de nanoenvases y contenedores para alimentos actualmente disponibles en el mercado. Adaptado de [Bumbudsanpharoke y Ko, \(2015\)](#).

Nanomaterial	Polímero	Marca		Imagen
Nanoarcilla	Nylon 6	(1) Imperm ^R Nylon nanocomposite (2) Producto de USA (3) Mitsubishi Gas Chemical Company, Inc.	- Imperm puede reemplazar al EVOH manteniendo las propiedades de barrera	- Botellas de cerveza de 500 ml Miller Brewing  (EE.UU.)
Nanoarcilla	Almidón	1) Plantic ^R Plastic Tray (2) Producto de Australia (3) Plantic Technologies Limited	- Plantic ^R Plastic Tray está hecha de fuentes renovables y sostenibles que no son tóxicos para el medio ambiente y es biodegradable después de su uso. - El material tiene propiedades mecánicas mejoradas y sensibilidad reducida a la humedad	- Bandejas termoformadas para: Cadbury Dairy Milk TM y Mark & Spencer Swiss Chocolate 

<p>Nanoplata (partículas de 25 nm)</p>	<p>PP</p>	<p>(1) Fresher Longertm™ Almacenamiento de bolsas de plástico (2) Producto de USA (3) Sharper Image^R Company</p>	<p>- Mantiene los alimentos más frescos tiempos más largos (3 o 4) para las frutas, verduras, hierbas, panes, quesos, sopas, salsas y carnes. - A las 24 h, el crecimiento de bacterias se redujo en más del 98%.</p>	
<p>Nanoplata</p>	<p>PP Copolyester (Tritan™)</p>	<p>(1) e.WindowR Nano Silver Airtight Container (2) Producto de South Korea</p>	<p>- Contra el olor - Los aditivos de nanoplata ayudan a esterilizar los contenedores de alimentos y reducir los malos olores. - Aprobado por USFDA.</p>	
<p>Nanoplata</p>	<p>PP, silicona</p>	<p>1) Sina Antibacterial Food Storages (2) Product de Vietnam (3) Dai Dong Tien Corporation</p>	<p>- Previene suciedad y hongos. - Elimina el mal olor y previene el crecimiento de gérmenes. - Mantiene los alimentos más frescos por más tiempo</p>	

El avance de los envases renovables o verdes tiene el potencial de reducir el impacto ambiental negativo causado por los sintéticos mediante el uso de productos biodegradables o materiales comestibles, extractos vegetales y materiales nanocompuestos (Han y col., 2018). Dos tipos de materiales (Biddeci y col., 2016; Lamareerat y col., 2018; Youssef y col., 2016) están en el candelerero: (1) nanopartículas inorgánicas y metálicas (nanoarcilla, montmorillonita, nanopartículas, nanotubos de C, NpAg, NpZnO, NpCuO, etc); (2) extractos de plantas (extracto de cardo, té verde, etc.), mezclas incorporadas a biopolímeros como quitosano, celulosa, almidón. El gran potencial de la nanotecnología ha captado la atención de los investigadores en áreas multidisciplinarias para desarrollar materiales prometedores y deseables para sistemas de envasado de alimentos.

En general, las aplicaciones de los materiales nanocompuestos para el envasado de alimentos se dividen en tres funciones principales, envases mejorados, inteligentes y activos (Sharma y col., 2017).

En primer lugar, la mejora del envase consiste en que la utilización de nanopartículas en los materiales biocompuestos para mejorar sus propiedades mecánicas y de barrera, incluyendo elasticidad, barrera a los gases (barrera contra la difusión de oxígeno, dióxido de carbono y compuestos de sabor) y la estabilidad bajo diferentes condiciones de humedad y temperatura (Youssef y col., 2016). En segundo lugar, los envases inteligentes informan sobre la calidad en tiempo real de los productos envasados y también actúan como una protección contra estafas y productos adulterados y un indicador de situaciones de exposición adversas, como temperaturas insuficientes o niveles elevados de oxígeno (Suh y col., 2016; Wang y col., 2017). En tercer lugar, los envases activos ofrecen protección y preservación basada en mecanismos activados por factores inherentes y/o adquiridos (actividad antimicrobiana, actividad biodegradable), y reducen las pérdidas debido a la prolongación de su vida útil (Wyrwa y Barska, 2017).

Aunque ha habido estudios considerables sobre las nuevas aplicaciones de nanomateriales en los envases de alimentos, la mayoría están todavía en la etapa de estudios de viabilidad y demostración, y aún no han recibido la aprobación debido a problemas de seguridad, que podrían ser causados por las migraciones de nanomateriales

desde el envase hacia la matriz alimentaria ([Ćwiek-Ludwicka y Ludwicki, 2017](#)). Además, la absorción, distribución, metabolismo y excreción, así como la evaluación toxicológica de las nanopartículas en la ingesta de alimentos de los seres humanos aún son objeto de investigación ([Piperigkou y col., 2016](#)).

Por lo tanto, para estimar el riesgo, se deben conocer las posibilidades de liberación de las nanopartículas hacia materiales en contacto con alimentos ([Störmer y col., 2017](#)).

Nanocosmética y nanomedicina

Hay muchos nanomateriales utilizados como ingredientes en productos farmacéuticos y cosméticos por sus propiedades físicas únicas tales como magnéticas, ópticas, mecánicas, eléctricas y mecánica cuántica. Las nanopartículas en los cosméticos se pueden dividir en dos características generales dependiendo de su estabilidad ([Kumud y Sanju, 2018](#)).

a) Nanopartículas lábiles, que se desintegran cuando se aplica a la piel en sus componentes moleculares. Ejemplos incluyen liposomas, microemulsiones, etc.

b) Partículas insolubles, que permanecen intactas. TiO_2 , fullerenos y puntos cuánticos.

La nanocosmética recibió un impulso después de la introducción de la línea Captura, por Christian Dior en 1986 y posteriormente a través de Revitalift de L'Oréal en 2005. Desde entonces cada vez mayor número de cosméticos utilizan nanomateriales.

Por otra parte, una herida es básicamente una interrupción de la estructura sana del tejido de la piel y en su función que necesita ser reparado y regenerado. Aunque el tejido de la piel posee la propiedad auto-reparable, algunos tipos específicos de heridas no sanan o lo hacen muy lentamente ([Clark y col., 2007](#)). Matrices biodegradables aplicadas en forma de vendajes o injertos artificiales proporcionan una plataforma sobre las heridas, que restauran las propiedades de barrera y estimulan el mecanismo de la autorreparación o de la cascada de cicatrización de la herida ([Chouhan y col., 2019](#); [Yildirimer y col., 2012](#)).

Las nanopartículas en los cosméticos pueden existir en varias formas como se muestra en la [Tabla 3](#).

Tabla 3. Productos cosméticos basados en nanotecnología

Cosmético	Forma	Nanotecnología	Nombre comercial
Piel	Crema	Nanopartículas	<i>Nano Gold 24 Hour Cream</i> Joyona International Marketing Ltd.
	Serum antioxidante	Fulerenos	<i>Sircuit Skin</i> Sircuit Skin Cosmeceuticals Inc.
	Liporeducción- Crema anticelulítica	Nanoliberación	<i>Nutra Luxe MD Lipo Reduction Anti-Cellulite Crème</i> Nutra Luxé M.D
	Crema reparadora humectante	Nanopartículas	<i>Ferndale Nouriva</i> Ferndale Laboratories, Inc.
	Refreshante post-solar Spirtz	Nanocápsulas	<i>Lancome</i> L'Oreal
Labios	Lápiz labial	Nanopartículas	<i>Luscious Lips Rejuvenation</i> Vortex Health & Beauty Ltd.
Pelo	Solución tópica para pelo	Nanosomas	<i>SPECTRAL DNC Hair Support System</i> DS Laboratories, Inc
	Abrillantador	Nanopartículas	<i>Pureology Nano Works Skhine Luxe</i> Pureology

La seda es un biopolímero de proteína producida por una variedad de insectos como gusanos de seda, moscas, arañas, ácaros y escorpiones (Altman y col., 2002). Es un material biocompatible, no inmunogénico y bioreabsorbible, utilizada ampliamente en la sutura de heridas desde la antigüedad.

Los materiales nanocompuestos de matriz polimérica se pueden preparar mediante la adición de un material inorgánico (nanopartículas, fibras o arcillas) a una matriz polimérica. Debido a su tamaño son capaces de formar una interfase íntima con la matriz del polímero dentro del compuesto. Esto da a este tipo de material propiedades ventajosas y rendimiento (por ejemplo, propiedades mecánicas) superior al esperado (Pereira y col., 2005).

Los andamios bioactivos tienen la capacidad de imitar la matriz extracelular natural (ECM) actuando como plantilla para que las células se adhieran, multipliquen, migren y

funcionen. El andamio proporciona puntos para la fijación y permite la liberación y dosificación de agentes bioactivos y factores de crecimiento, mientras que el material del andamio también debe proporcionar estabilidad mecánica a las células y el tejido circundante (Bramhill y col., 2017).

Los andamios están normalmente formulados con materiales híbridos inorgánicos/orgánicos, nanocompuestos bioactivos/polímeros. Uno de las necesidades más comunes para los andamios de ingeniería de tejidos está en el tratamiento de heridas. El material de andamio ideal sería: (a) biocompatible, (b) elástico, y por lo tanto cómodo para aplicar sobre la herida, (c) capaz de mantener un ambiente húmedo o proporcionar humedad, mientras absorbe líquido y exudado, (d) estimula la cicatrización de la herida y la re-epitelización para reducir la necrosis superficial de la herida, (e) y previene o protege de la infección (Vowden y Vowden, 2017).

Asimismo, numerosas aplicaciones médicas de los nanoprodutos son formulados a base de quitosano y sus derivados que han demostrado tener potencial antimicrobiano (Karwowska, 2017). Materiales a base de quitina y quitosano se han propuesto para su aplicación en andamios y materiales de cicatrización de heridas. Archana y col. (2015) prepararon un película de cicatrización de heridas basada en quitosano y polivinilpirrolidona con adición de nanopartículas de óxido de plata que mostraron una actividad antibacteriana significativa frente a *S. aureus* y *E. coli* (Madhumathi y col., 2010; Shi y col., 2006). Nanocompuestos de quitosano-poli(N-vinilpirrolidona)-TiO₂ fueron desarrollados como material de vendaje debido a su impacto antibacteriano contra *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* y *B. subtilis* y su capacidad para intensificar el tratamiento de la herida (Archana y col., 2013).

Srivastava y col. (2011) desarrollaron un nanocompuesto a base de quitosano y 4-(etoxicarbonil) fenil-ácido 1-amino-oxobutanoico funcionalizado con NpAg. El nanocompuesto obtenido se propuso como un material para aplicación en medicina debido a su efecto sobre las bacterias, incluyendo *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*.

Se han investigado compuestos basados en el uso de hidrocoloides para aplicaciones potenciales como materiales bioactivos en el campo médico (Boateng y col., 2008; Bramhill y col., 2017; Campoccia y col., 2013). Los materiales bioactivos en vendajes de

herida tienen activa influencia en la prevención de infecciones y en los procesos inflamatorios y de curación subsiguientes (Woehl y col., 2014). Zhong y col. (2006) informaron acerca de métodos de producción de nanoestructuras a partir de celulosa bacteriana e hidrocoloides como la goma guar o el ácido hialurónico.

A pesar de los beneficios de la integración de los nanomateriales en muchos ámbitos de la industria farmacéutica, cosmética o de alimentos, existe preocupación por su posible impacto en la salud y la seguridad. En la actualidad, existe una brecha de conocimiento entre el progreso tecnológico y la investigación en materia de nanoseguridad. Sin embargo, al igual que con cualquier nueva tecnología o material, la identificación de los posibles riesgos para la salud es un requisito previo para una evaluación adecuada de la utilidad y seguridad de los nuevos productos químicos, materiales y productos que puedan desarrollarse (Bartošová y Nikolaevna Ivanova, 2019).

A fin de reducir las incertidumbres relativas a la seguridad de los nanomateriales, se están elaborando prácticas, pautas y métodos de evaluación, así como procedimientos para la realización de pruebas de seguridad (por ej. la ECHA (European Chemicals Agency), dentro del programa de directrices de la OCDE para los ensayos). Sin embargo, se necesitan más investigaciones con relevancia específica para las cuestiones reglamentarias en lo que se refiere a la aplicación de la definición de nanomateriales, la aplicación del etiquetado de los productos para detectar la presencia de nanomateriales y el desarrollo de métodos de ensayo sobre la seguridad de los mismos.

El 3 de diciembre de 2018, la Comisión adoptó el Reglamento (UE) 2018/1881 de la Comisión para modificar los anexos REACH I, III y VI-XII, introduciendo aclaraciones específicas acerca del concepto nano y nuevas disposiciones en la evaluación de la seguridad química (anexo I), requisitos de información sobre el registro (anexos III y VI-XI) y obligaciones de los consumidores (anexo XII). Las enmiendas propuestas que serán de cumplimiento obligatorio antes del 1 de enero de 2020 para los nuevos registros, así como para los ya existentes, aclararán considerablemente los requisitos de registro REACH con respecto a los nanomateriales (EU, 2018).

Los nanocosméticos son productos cosméticos que han surgido desde la revolución de la nanotecnología, resultando en productos con propiedades mejoradas en el contexto de

su aplicación, estética, rendimiento y uso. Aunque la primera asociación de cosméticos con nanotecnología resultó en protectores solares, más tarde, los ingredientes a escala nano fueron muy frecuentemente utilizados en la industria cosmética. Además, también se formularon varios nanosistemas de liberación como liposomas y nanosomas.

La capa superior de la piel consiste del *Stratum corneum* (SC) que no permite la penetración de partículas inorgánicas y actúa como una barrera resistente (Zhao y col., 2008). Muchos estudios de penetración de partículas de TiO₂ se han llevado a cabo demostrando que las partículas de TiO₂ no penetraron la piel viable a pesar del menor tamaño de partícula demostrado por estudios de microscopía electrónica (SEM). Por el momento, los consumidores no son conscientes de la presencia de nanomateriales, ya que la información no aparece en las etiquetas de los productos. De hecho, ignoran los riesgos asociados con él. Todos los productos de cuidado personal incluyendo protectores solares, cremas antienvjecimiento y pastas dentífricas contienen nanopartículas diseñadas. Sin embargo, es difícil estimar el número de productos disponibles comercialmente que contienen nanopartículas en ausencia de la obligatoriedad del etiquetado.

Aunque ningún país tiene legislación con una fuerte disposición a regular los compuestos a base de nanotecnología, grupos protectores de los derechos de los consumidores están trabajando en este sentido para que la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) legisle para que los fabricantes realicen evaluaciones de seguridad en productos de cuidado personal y etiqueten la presencia de nanomateriales.

Empresas cosméticas que utilizan nanotecnología en sus productos enfrentan un futuro incierto para sus consumidores. Varios organismos científicos como la Administración de Alimentos y Medicamentos (USFDA) y la Royal Society advierten que los nanocosméticos requieren una minuciosa investigación relativa a los riesgos asociados previa a la comercialización de los productos (Kumud y Sanju, 2018).

En este contexto, se propuso como

OBJETIVO GENERAL

- Desarrollar matrices biodegradables y biocompatibles funcionalizadas con nanopartículas metálicas obtenidas *in situ* usando materiales y procedimientos amigable con el medio ambiente estudiando sus propiedades fisicoquímicas, mecánicas, térmicas, capacidad antimicrobiana, biodegradabilidad, toxicidad y citotoxicidad.
- Estudiar las potenciales aplicaciones de las matrices nanocompuestas funcionalizadas en diferentes áreas, biomédica, medio ambiente y envasado de alimentos, entre otras.

REFERENCIAS

- Alcalá-Alcalá, S., & Quintanar-Guerrero, D. (2015). La terapia a nanoescala: ensamblaje de estructuras liberadoras de fármacos. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología*, 7(12), 32–48. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2014.12.49709>
- Almasi, H., Jafarzadeh, P., & Mehryar, L. (2018). Fabrication of novel nanohybrids by impregnation of CuO nanoparticles into bacterial cellulose and chitosan nanofibers: Characterization, antimicrobial and release properties. *Carbohydrate Polymers*, 186, 273–281. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.01.067>
- Altman, G. H., Diaz, F., Jakuba, C., Calabro, T., Horan, R. L., Chen, J., Kaplan, D. L. (2002). Silk based biomaterials to heal critical sized femur defects. *Silk-Based Biomaterials Gregory*, 24, 401–416. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2006.04.019>
- Archana, D., Singh, B. K., Dutta, J., & Dutta, P. K. (2013). In vivo evaluation of chitosan-PVP-titanium dioxide nanocomposite as wound dressing material. *Carbohydrate Polymers*, 95(1), 530–539. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.034>
- Archana, D., Singh, B. K., Dutta, J., & Dutta, P. K. (2015). Chitosan-PVP-nano silver oxide wound dressing: In vitro and in vivo evaluation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 73(1), 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.10.055>
- Ariyaratna, I. R., Rajakaruna, R. M. P. I., & Karunaratne, D. N. (2017). The rise of inorganic nanomaterial implementation in food applications. *Food Control*, 77, 251–259. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.02.016>
- Ashwood, P., Thompson, R. P. H., & Powell, J. J. (2007). Fine particles that adsorb lipopolysaccharide via bridging calcium cations may mimic bacterial pathogenicity towards cells. *Experimental Biology and Medicine*, 232(1), 107–117. <https://doi.org/10.3181/00379727-207-2320107>
- Bankar, A., Joshi, B., Ravi Kumar, A., & Zinjarde, S. (2010). Banana peel extract mediated synthesis of gold nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 80(1), 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.05.029>
- Barabadi, H., Najafi, M., Samadian, H., Azarnezhad, A., Vahidi, H., Mahjoub, M. A., & Ahmadi, A. (2019). A systematic review of the genotoxicity and antigenotoxicity of biologically synthesized metallic nanomaterials: are green nanoparticles safe enough for clinical marketing?. *Medicina*, 55(8), 439. <https://doi.org/10.3390/medicina55080439>
- Bartošová, A., & Nikolaevna Ivanova, T. (2019). Safety Concern of Nanomaterials. *Research Papers Faculty of Materials Science and Technology Slovak University of Technology*, 27(44), 121–128. <https://doi.org/10.2478/rput-2019-0013>
- Biddeci, G., Cavallaro, G., Di Blasi, F., Lazzara, G., Massaro, M., Milioto, S., ... Spinelli, G. (2016). Halloysite nanotubes loaded with peppermint essential oil as filler for functional biopolymer film. *Carbohydrate Polymers*, 152, 548–557. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.07.041>
- Boateng, J.S., Matthews, K.H., Stevens, H.N.E., & Eccleston, G.M. (2008). Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(8), 2892–2923.

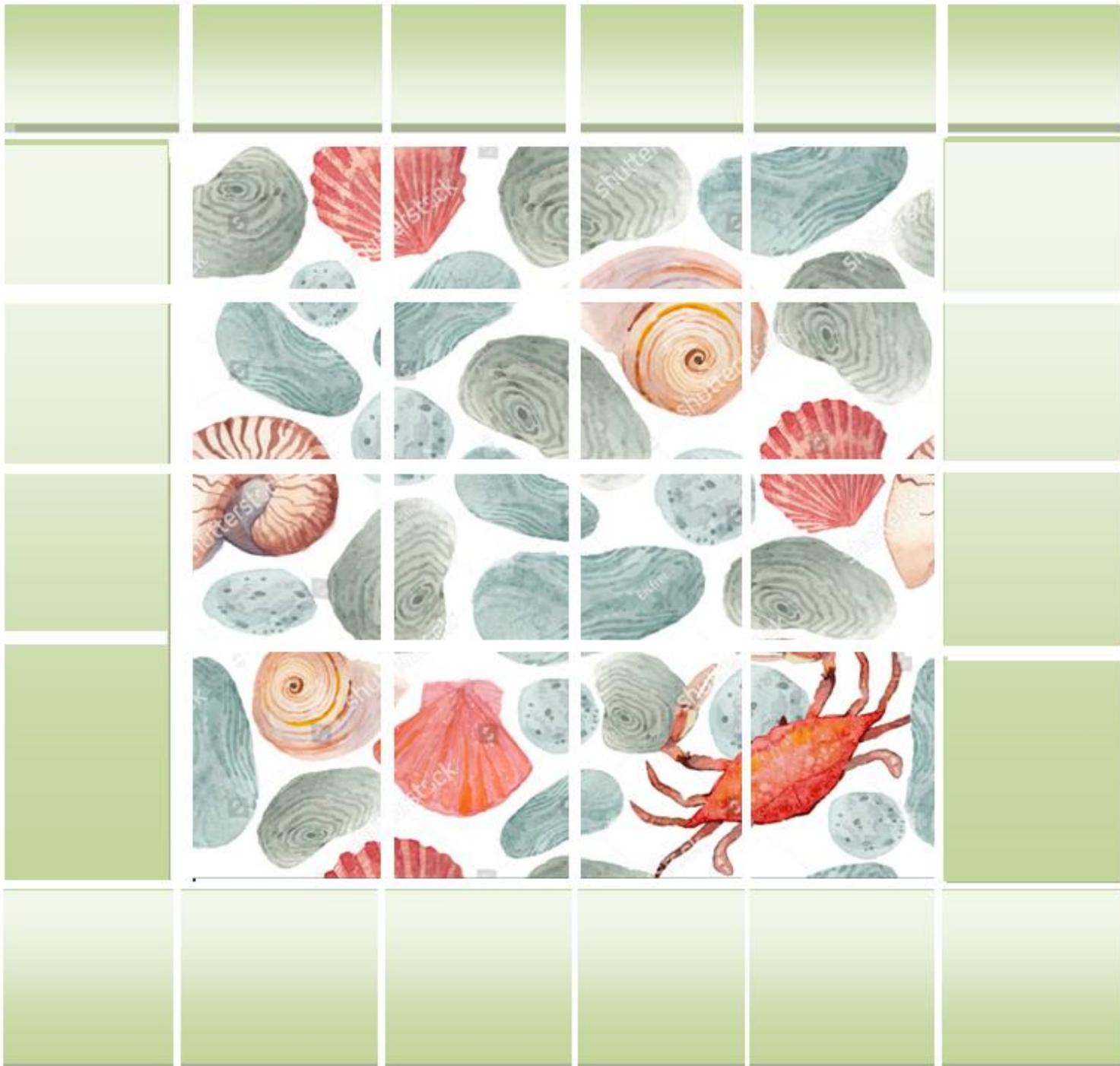
- <https://doi.org/10.1002/jps.21210>
- Bramhill, J., Ross, S., & Ross, G. (2017). Bioactive nanocomposites for tissue repair and regeneration: A review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *14*(1). <https://doi.org/10.3390/ijerph14010066>
- Bumbudsanpharoke, N., & Ko, S. (2015). Nano-Food Packaging: An Overview of Market, Migration Research, and Safety Regulations. *Journal of Food Science*, *80*(5), R910–R923. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12861>
- Campoccia, D., Montanaro, L., & Arciola, C. R. (2013). A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces. *Biomaterials*, *34*(34), 8533–8554. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.07.089>
- Canham, L.T. (2007). Nanoscale semiconducting silicon as a nutritional food additive. *Nanotechnology*, *18*(18). <https://doi.org/10.1088/0957-4484/18/18/185704>
- Chávez, G., & Patiño, T. (2009). Las Nanotecnologías: Un Paradigma Tecnológico Emergente. Dinámica Y Especialización En La Innovación De Las Tecnologías. *Razón y Palabra*, *14*(68), 1–32.
- Chouhan, D., Dey, N., Bhardwaj, N., & Mandal, B. B. (2019). Emerging and innovative approaches for wound healing and skin regeneration: Current status and advances. *Biomaterials*, *216*(June), 119267. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119267>
- Chung, I.M., Rajakumar, G., Gomathi, T., Park, S.K., Kim, S.H., & Thiruvengadam, M. (2017). Nanotechnology for human food: Advances and perspective. *Frontiers in Life Science*, *10*(1), 63–72. <https://doi.org/10.1080/21553769.2017.1365775>
- Clark, R.A.F., Ghosh, K., & Tonnesen, M.G. (2007). Tissue engineering for cutaneous wounds. *Journal of Investigative Dermatology*, *127*(5), 1018–1029. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700715>
- Ćwiek-Ludwicka, K., & Ludwicki, J. K. (2017). Nanomaterials in food contact materials; considerations for risk assessment. *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*, *68*(4), 321–329.
- European Union, C.R. (2018). Revised REACH Annexes to cover nanomaterials published. Retrieved August 19, 2020, from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1543920298102&uri=CELEX:32018R1881>
- Francesko, A., Cano Fossas, M., Petkova, P., Fernandes, M. M., Mendoza, E., & Tzanov, T. (2017). Sonochemical synthesis and stabilization of concentrated antimicrobial silver-chitosan nanoparticle dispersions. *Journal of Applied Polymer Science*, *134*(30), 1–8. <https://doi.org/10.1002/app.45136>
- Gutiérrez-Wing, C. E. (2006). Las NANOPARTÍCULAS : pequeñas estructuras con gran potencial ¿Por qué el interés en estos materiales? ¿Qué aplicaciones tienen? *Contacto Nuclear*, 24–29. Retrieved from http://www.inin.gob.mx/publicaciones/documentospdf/39_NANOPARTICULAS.pdf
- Han, J.W., Ruiz-Garcia, L., Qian, J.P., & Yang, X.T. (2018). Food Packaging: A Comprehensive Review and Future Trends. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *17*(4), 860–877. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12343>

- Haverkamp, R.G., & Marshall, A.T. (2009). The mechanism of metal nanoparticle formation in plants: Limits on accumulation. *Journal of Nanoparticle Research*, 11(6), 1453–1463. <https://doi.org/10.1007/s11051-008-9533-6>
- Hoseinnejad, M., Jafari, S.M., & Katouzian, I. (2018). Inorganic and metal nanoparticles and their antimicrobial activity in food packaging applications. *Critical Reviews in Microbiology*, 44(2), 161–181. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1332001>
- Huang, C.Y., Kuo, C.H., Wu, C.H., Ku, M.W., & Chen, P.W. (2018). Extraction of crude chitosans from squid (*Illex argentinus*) pen by a compressional puffing-pretreatment process and evaluation of their antibacterial activity. *Food Chemistry*, 254, 217–223. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.018>
- Huang, Q., Yu, H., & Ru, Q. (2010). Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology. *Journal of Food Science*, 75(1). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01457.x>
- Iamareerat, B., Singh, M., Sadiq, M. B., & Anal, A.K. (2018). Reinforced cassava starch based edible film incorporated with essential oil and sodium bentonite nanoclay as food packaging material. *Journal of Food Science and Technology*, 55(5), 1953–1959. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3100-7>
- Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y. S., Dufresne, A., & Danquah, M. K. (2018). Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 9(1), 1050–1074. <https://doi.org/10.3762/bjnano.9.98>
- Joseph, T., & Morrison, M. (2006). Nanotechnology in Agriculture and Food.
- Karwowska, E. (2017). Antibacterial potential of nanocomposite-based materials - A short review. *Nanotechnology Reviews*, 6(2), 243–254. <https://doi.org/10.1515/ntrev-2016-0046>
- Kumud, M., & Sanju, N. (2018). Nanotechnology Driven Cosmetic Products: Commercial and Regulatory Milestones. *Applied Clinical Research, Clinical Trials and Regulatory Affairs*, 5(2), 112–121. <https://doi.org/10.2174/2213476x05666180530093111>
- Kuswandi, B. (2017). Environmental friendly food nano-packaging. *Environmental Chemistry Letters*, 15(2), 205–221. <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0613-7>
- Madhumathi, K., Sudheesh Kumar, P. T., Abhilash, S., Sreeja, V., Tamura, H., Manzoor, K., ... Jayakumar, R. (2010). Development of novel chitin/nanosilver composite scaffolds for wound dressing applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21(2), 807–813. <https://doi.org/10.1007/s10856-009-3877-z>
- Majumder, D.D., Banerjee, R., Ulrichs, C., Mewis, I., & Goswami, A. (2007). Nano-materials: Science of bottom-up and top-down. *IETE Technical Review (Institution of Electronics and Telecommunication Engineers, India)*, 24(1), 9–25. <https://doi.org/10.4103/02564602.10876577>
- Makarov, V. V., Love, A. J., Sinitsyna, O. V., Makarova, S. S., Yaminsky, I. V., Taliansky, M. E., & Kalinina, N. O. (2014). “Green” Nanotechnologies: Synthesis of Metal Nanoparticles Using Plants. *Handbook of Families and Health: Interdisciplinary Perspectives*, 6(20), 35–44.

<https://doi.org/10.4135/9781452231631.n3>

- Pal, S.L., Jana, U., Manna, P. K., Mohanta, G.P., & Manavalan, R. (2011). Nanoparticle: An overview of preparation and characterization. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1(6), 228–234.
- Pereira, M.M., Al-Saffar, N., Selvakumaran, J., & Hench, L.L. (2005). Cytotoxicity evaluation of bioactive glass-polyvinyl alcohol hybrid foams prepared by the sol-gel method. *Key Engineering Materials*, 284–286, 589–592. <https://doi.org/10.4028/0-87849-961-x.589>
- Perinelli, D. R., Fagioli, L., Campana, R., Lam, J. K. W., Baffone, W., Palmieri, G. F., Bonacucina, G. (2018). Chitosan-based nanosystems and their exploited antimicrobial activity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 117(September 2017), 8–20. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.01.046>
- Piperigkou, Z., Karamanou, K., Engin, A. B., Gialeli, C., Docea, A. O., Vynios, D. H., ... Tsatsakis, A. M. (2016). Emerging aspects of nanotoxicology in health and disease: From agriculture and food sector to cancer therapeutics. *Food and Chemical Toxicology*, 91, 42–57. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.03.003>
- Roco, M. C. (2007). National Nanotechnology Initiative. *Hawley's Condensed Chemical Dictionary*, 1–40. <https://doi.org/10.1002/9780470114735.hawley11400>
- Sharma, C., Dhiman, R., Rokana, N., & Panwar, H. (2017). Nanotechnology: An untapped resource for food packaging. *Frontiers in Microbiology*, 8(SEP). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01735>
- Shatrohan Lal, R.K. (2014). Synthesis of Organic Nanoparticles and their Applications in Drug Delivery and Food Nanotechnology: A Review. *Journal of Nanomaterials & Molecular Nanotechnology*, 03(04). <https://doi.org/10.4172/2324-8777.1000150>
- Shi, Z., Neoh, K. G., Kang, E. T., & Wang, W. (2006). Antibacterial and mechanical properties of bone cement impregnated with chitosan nanoparticles. *Biomaterials*, 27(11), 2440–2449. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.11.036>
- Srivastava, R., Tiwari, D. K., & Dutta, P. K. (2011). 4-(Ethoxycarbonyl) phenyl-1-amino-oxobutanoic acid-chitosan complex as a new matrix for silver nanocomposite film: Preparation, characterization and antibacterial activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 49(5), 863–870. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.07.015>
- Störmer, A., Bott, J., Kemmer, D., & Franz, R. (2017). *Critical review of the migration potential of nanoparticles in food contact plastics*. *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 63). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.01.011>
- Suh, S., Meng, X., & Ko, S. (2016). Proof of concept study for different-sized chitosan nanoparticles as carbon dioxide (CO₂) indicators in food quality monitoring. *Talanta*, 161, 265–270. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.08.055>
- Thiruvengadam, M., Rajakumar, G., & Chung, I. M. (2018). Nanotechnology: current uses and future applications in the food industry. *3 Biotech*, 8(1), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1104-7>
- Torres-Giner, S., Wilkanowicz, S., Melendez-Rodriguez, B., & Lagaron, J. M. (2017).

- Nanoencapsulation of Aloe vera in Synthetic and Naturally Occurring Polymers by Electrohydrodynamic Processing of Interest in Food Technology and Bioactive Packaging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(22), 4439–4448. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01393>
- Vowden, K., & Vowden, P. (2017). Wound dressings: principles and practice. *Surgery (United Kingdom)*, 35(9), 489–494. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2017.06.005>
- Wang, J., Qian, W., He, Y., Xiong, Y., Song, P., & Wang, R. M. (2017). Reutilization of discarded biomass for preparing functional polymer materials. *Waste Management*, 65, 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.04.025>
- Woehl, M.A., Ono, L., Riegel Vidotti, I.C., Wypych, F., Schreiner, W.H., & Sierakowski, M.R. (2014). Bioactive nanocomposites of bacterial cellulose and natural hydrocolloids. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(40), 7034–7044. <https://doi.org/10.1039/c4tb00706a>
- Wyrwa, J., & Barska, A. (2017). Innovations in the food packaging market: active packaging. *European Food Research and Technology*, 243(10), 1681–1692. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2878-2>
- Wyser, Y., Adams, M., Avella, M., Carlander, D., Garcia, L., Pieper, G., & Weiss, J. (2016). Outlook and Challenges of Nanotechnologies for Food Packaging By. *Packaging and Technology and Science*, 29(12), 615–648. <https://doi.org/10.1002/pts.2221>
- Yildirimer, L., Thanh, N. T. K., & Seifalian, A. M. (2012). Skin regeneration scaffolds: A multimodal bottom-up approach. *Trends in Biotechnology*, 30(12), 638–648. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.08.004>
- Youssef, A.M., & El-Sayed, S.M. (2018). Bionanocomposites materials for food packaging applications: Concepts and future outlook. *Carbohydrate Polymers*, 193(March), 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.03.088>
- Youssef, A. M., El-Sayed, S. M., El-Sayed, H. S., Salama, H. H., & Dufresne, A. (2016). Enhancement of Egyptian soft white cheese shelf life using a novel chitosan/carboxymethyl cellulose/zinc oxide bionanocomposite film. *Carbohydrate Polymers*, 151, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.023>
- Zhang, L., Gu, F. X., Chan, J. M., Wang, A. Z., Langer, R. S., & Farokhzad, O. C. (2008). Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Education Policy Analysis Archives*, 8(5), 761–769. <https://doi.org/10.1038/sj.clp>
- Zhao, W., Brook, M.A., & Li, Y. (2008). Design of gold nanoparticle-based colorimetric biosensing assays. *ChemBioChem*, 9(15), 2363–2371. <https://doi.org/10.1002/cbic.200800282>
- Zhong, S., Teo, W. E., Zhu, X., Beuerman, R. W., Ramakrishna, S., & Yung, L. Y. L. (2006). An aligned nanofibrous collagen scaffold by electrospinning and its effects on in vitro fibroblast culture Shaoping. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 79(3), 456–463. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30870>



Capítulo 1

Caracterización de polímeros

1.1 INTRODUCCIÓN

1.1.1 Quitosano

La quitina es el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa y puede decirse que la *quitina es a los crustáceos lo que la celulosa a los árboles*. Químicamente la quitina es un biopolímero lineal compuesto por unidades de N-acetil-D-glucosamina (N-acetil-2-amino-2-deoxi-D-glucopiranosas) unidas mediante enlaces $\beta(1\rightarrow4)$. El derivado más importante de la quitina es el quitosano, la cual se obtiene mediante desacetilación alcalina en estado sólido o bien mediante hidrólisis enzimática (Agulló y col., 2004; Jayakumar y col., 2011; Ravi Kumar y col., 2012).

En el quitosano, las unidades que prevalecen son 2-amino-2-deoxi- β -D-glucosamina pero específicamente, es un copolímero de 2-acetamida-2-deoxi- β -D-glucosamina y 2-amino-2-deoxi- β -D-glucosamina (Figura 1.1) que se obtiene por desacetilación de la quitina, dejando libre el grupo amino del carbono 2. Si bien siempre se encuentra presente una mezcla de quitina/quitosano, se considera quitosano cuando predominan las unidades en su forma desacetilada. En la Figura 1.1 se muestran la estructura química de estos biopolímeros (Ramírez y col., 2016).

Cuando la estructura no está desacetilada, el nitrógeno forma parte de la función amida. El quitosano contiene tres tipos de grupos funcionales reactivos: un grupo amino/acetamido y grupos hidroxilos primarios y secundarios en las posiciones C-2, C-3 y C-6. Los grupos amino libres se encuentran en las unidades desacetiladas y los grupos hidroxilos tanto en las unidades acetiladas como en las desacetiladas. El carácter catiónico y básico del polielectrolito, atribuido a la presencia de grupos amino en las unidades glucosamina, le confieren reactividad y un rasgo distintivo en comparación con los polisacáridos aniónicos (pectina, dextrano, alginato, carragenano, entre otros) que exhiben propiedades ácidas en solución acuosa.

Los grupos amino del quitosano podrían ser convenientemente modificados para impartirle propiedades deseadas y funciones biológicas distintivas. La modificación química del quitosano se ha discutido en el contexto de la funcionalidad (Islam y col., 2017) del grupo amino que implica reacciones químicas tales como acetilación, cuaternización, reacciones con aldehídos y cetonas, alquilación, injerto, quelación de

metales, etc. (Kumar y col., 2011) que resulta en una variedad de productos que exhiben propiedades como biocompatibilidad, biodegradabilidad, antibacteriano, anti-fúngico, anti-viral, anti-ácido, no tóxico, no alergénico.

Asimismo, pueden darse modificaciones por reacciones inespecíficas en los hidroxilos particularmente en las posiciones del C-6 y C-3, siendo generalmente esterificaciones y eterificaciones (Berghoff, 2011; Oyervides-Muñoz y col., 2017). Estas modificaciones del polímero permiten la preparación de un amplio espectro de derivados con potenciales aplicaciones en diversas áreas. La disponibilidad de sitios reactivos permite la vinculación lateral y la formación de aldquinas y ketinas con aldehídos y cetonas.

El contenido y disponibilidad de grupos aminos es clave porque determinan las propiedades estructurales y fisicoquímicas del polímero, que a su vez influyen en reacciones que involucren fenómenos como la quelación, floculación, así como su participación en funciones biológicas (Xia y col., 2011).

Debido a su biodegradabilidad, biocompatibilidad y propiedades no-tóxicas, el quitosano es considerado un biopolímero (Ahsan y col., 2018; Aranaz y col., 2009; Kean y Thanou, 2010; Khan y Tanaka, 2018). A partir de este biopolímero es posible obtener oligómeros de quitosano mediante un proceso de depolimerización aplicando condiciones de reacción relativamente suaves (Dash y col., 2011).

El quitosano producido comercialmente tiene un peso molecular entre 3.8 y 20 kDa y se obtiene principalmente del caparazón de camarones, gambas, langostas, cangrejos, así como de las paredes celulares de hongos y algas (Agulló y col., 2004; Jayakumar y col., 2011; Ravi Kumar, 2000).

La composición y el tamaño de las cadenas del polímero son determinados tanto por la fuente de extracción del quitosano, como por las condiciones del método de obtención. Si bien el grado de desacetilación y el peso molecular promedio son parámetros importantes que condicionan sus propiedades funcionales, la cristalinidad (Huang y col., 2018), el contenido de agua y de cenizas (Gomaa y col., 2018) también son características fisicoquímicas a tener en cuenta para determinar las potenciales aplicaciones del polímero. Gomaa y col., (2018) extrajeron quitosano a partir de biomasa de *Aspergillus niger* obteniendo un polímero con un grado de desacetilación de 83% y un peso

molecular de 2.7×10^4 Da, en tanto que Huang y col. (2018) obtuvieron quitosano de calamares previamente tratados por compresión con un grado de desacetilación similar al encontrado por Goma y col. (2018), pero con un mayor peso molecular (7.8×10^5 Da).

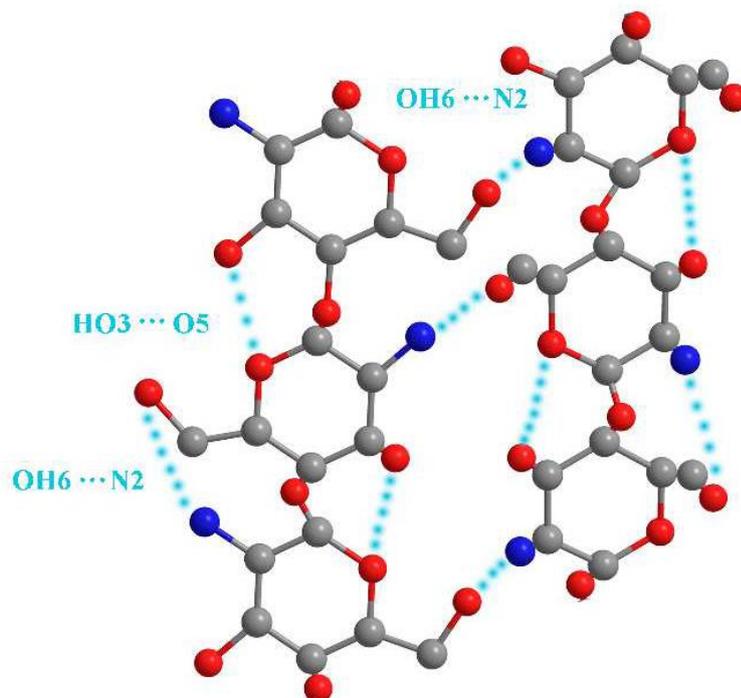


Figura 1.1. Puentes de hidrógeno en la estructura molecular del quitosano. Adaptado de Tian y col. (2015).

El quitosano se ha utilizado ampliamente en la industria de alimentos y está aprobado como aditivo en Japón. Se comercializa en Europa, EUA y en otros países incluyéndolo en formulaciones para reducir el colesterol y el sobrepeso. Se ha evaluado en ensayos clínicos como potenciador de la penetración de fármacos por vía nasal (Illum y col., 2001) y como excipiente farmacéutico (Singla y Chawla, 2001).

Desde el punto de vista fisicoquímico, el quitosano es un biopolímero hidrosoluble capaz de formar películas, hidrogeles, andamios porosos, nanoestructuras fibrosas, micro y nanopartículas (Goycoolea y col., 2000). El aprovechamiento del alto peso molecular del quitosano le da la capacidad para formar películas a partir de soluciones filmogénicas por evaporación, crecimiento capa a capa, o por adición de plastificantes.

Asimismo, este polímero se ha utilizado en el diseño de matrices para la liberación controlada y sostenida de compuestos activos en forma de microesferas, microcápsulas, membranas y pastillas comprimidas (Aldana y col., 2012; Ali y Ahmed, 2018; Nagpal y col., 2012; Peniche y col., 2003), así como en materiales ortopédicos y odontología. Otras propiedades biológicas han sido extensamente descritas en la literatura, tanto in vitro como en modelos animales; entre ellas cabe mencionar la mucoadhesividad, biocompatibilidad (VandeVord y col., 2002), inmunoestimulación (Borges y col., 2007; Zaharoff y col., 2007), capacidad para facilitar la absorción de macromoléculas biológicas a través de barreras epiteliales (Smith y col., 2004).

Existen numerosas investigaciones sobre la actividad antimicrobiana del quitosano y sus derivados. Una de las suposiciones es que su carácter catiónico le permite interactuar con los residuos negativos de la pared celular y alterar la permeabilidad de la misma provocando la pérdida de proteínas y electrolitos intracelulares de la célula.

Como polímero funcional, el quitosano tiene características biomédicas distintivas, como baja toxicidad, baja citotoxicidad, biocompatibilidad y biodegradabilidad. Una propiedad del quitosano es su capacidad para coagular rápidamente la sangre y recientemente ha sido aprobado en los Estados Unidos y Europa para su uso en vendajes y otros agentes hemostáticos. La degradación enzimática de quitosano es una de sus ventajas en la preparación de diversos materiales con fines médicos, como películas, suturas, revestimientos y geles. Las aplicaciones médicas de películas de gel de quitosano en pacientes con quemaduras, úlceras y lesiones han mostrado que las películas que además contienen glicerol exhiben buena adherencia y elasticidad en comparación con los que no lo contienen.

La estructura y propiedades de oligómeros del quitosano son influenciados por varios factores, incluyendo peso molecular (PM), grado de acetilación (DA) y distribución de los grupos acetilo a lo largo de la cadena principal (Dash y col., 2011; Rinaudo, 2006). Entre estos factores, primero y ante todo, el PM es crítico sobre algunas propiedades importantes. La solubilidad a pH neutro y las actividades biológicas, sólo aparecen cuando el PM disminuye en cierta medida (Mengíbar y col., 2013). Aunque los mecanismos subyacentes a este fenómeno no son completamente conocidos, los cambios de la

estructura podrían ser los responsables. Por lo tanto, es razonable investigar los efectos de PM sobre la estructura y propiedades de los oligómeros y por lo tanto su relación. Al respecto, se han realizado algunos estudios. Sin embargo, es difícil encontrar resultados consistentes y en la mayoría las pruebas se observaron resultados controvertidas para una correlación entre propiedades y PM. [Fernandes y col. \(2008\)](#) informaron que los oligómeros con PM < 5 kDa exhibieron actividad antibacteriana más alta que los de mayor PM. Similares resultados obtuvieron [Kulikov y col. \(2012\)](#) quienes observaron que PM entre 3.58 y 4.22 kDa poseían alta actividad antibacteriana ([Tian y col., 2015](#)).

La hidrólisis del grupo N-acetilo con la consecuente presencia de grupos aminos en su estructura genera un aumento en la capacidad hidrofílica del quitosano, el cual se torna soluble en soluciones ácidas (ácido acético, fórmico clorohídrico, entre otros). La solubilidad del polímero estará determinada principalmente por tres parámetros: el grado de desacetilación (GD), la distribución de los grupos acetilo y el grado de polimerización.

Las propiedades fisicoquímicas del quitosano se atribuyen en gran medida al grupo amino, el cual a pH 6.5 o menor se encuentra protonado y es muy reactivo. Cuando el pH aumenta por encima del pKa del polímero (6.3-6.5) la carga positiva de los grupos amino se pierde y por lo tanto, el quitosano precipita insolubilizándose ([Huang y col., 2018](#); [Pillai y col., 2009](#)). Además, existen dos propiedades del biopolímero de las cuales dependen las características y comportamiento particular en cada área de aplicación: el peso molecular y el grado de desacetilación (GD). El peso molecular depende del proceso de extracción del quitosano; en general, condiciones severas de temperatura y concentración de reactivos provocan un acortamiento de la cadena ([Tsaih y Chen, 2003](#)). Existen aplicaciones para las cuales una cadena corta es favorable y otras en las que se requiere una cadena de mayor tamaño para lograr el efecto deseado con mayor eficacia.

Las biofuncionalidades del quitosano están altamente relacionadas con su peso molecular y grado de acetilación. Las funciones antibacterianas del quitosano y sus derivados representan su principal utilidad en aplicaciones biológicas. Independientemente de la fuente de quitosano, su eficacia antibacteriana depende de una serie de factores, que incluyen el grado de polimerización ([Park y Zhao, 2004](#); [Park y col., 2002](#); [Tsai y col., 2004](#)), especies de microorganismos ([Gerasimenko y col., 2004](#);

Park y Zhao, 2004), y el grado de deacetilación (DD) (Tsai y col., 2002). Teniendo en cuenta la naturaleza del quitosano y los diferentes métodos usados para su obtención existe una gran variabilidad en cuanto a las propiedades fisicoquímicas del polímero comercializado.

1.1.2 Alcohol polivinílico

El alcohol polivinílico (PVA) es un polímero sintético lineal semicristalino (Baker y col., 2012; Chang y col., 2008; Morandim-Giannetti y col., 2018) insípido, inodoro, no tóxico, biodegradable, biocompatible, termoestable (Aslam y col., 2018). Posee propiedades ópticas sorprendentes, una gran resistencia dieléctrica y una excelente capacidad de almacenamiento (Morandim-Giannetti y col., 2018). Sus propiedades mecánicas, ópticas y eléctricas se pueden manejar y adaptar mediante el dopaje con nanorellenos. El PVA está disponible en el mercado en diferentes grados según la viscosidad y el grado de hidrólisis (Hamidi y col., 2008; Kamath y col., 1993).

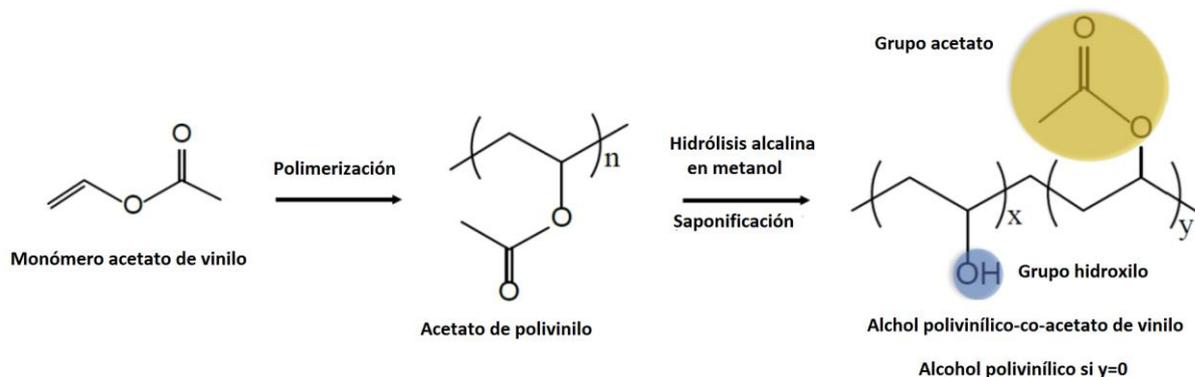


Figura 1.2. Ilustración de la síntesis y estructura química del alcohol polivinílico (PVA). Adaptado de Adelnia y col. (2022).

Las propiedades fisicoquímicas y mecánicas del PVA se rigen por el número de grupos hidroxilo presentes en el polímero (Teramoto y col., 2001). El PVA no se sintetiza por polimerización de su monómero estructural (alcohol vinílico) debido a su naturaleza inestable. Para la producción comercial de PVA, la materia prima básica para la polimerización es el acetato de vinilo (como monómero). Se realiza la hidrólisis alcalina parcial controlada (saponificación) del acetato de vinilo, en la que el grupo éster se

sustituye parcialmente por el grupo hidroxilo en un entorno acuoso de hidróxido de sodio.

La hidrólisis parcial da un copolímero de alcohol vinílico y acetato de vinilo. El precipitado de esta reacción es el PVA. La síntesis y estructura química del alcohol polivinílico se muestran en la [Figura 1.2](#).

La modificación física del PVA es posible debido a un proceso de cristalización. La cristalización del PVA se debe a los puentes de hidrógeno entre cadenas de PVA. Cuando se introducen nanopartículas exógenas (Np) en la matriz del polímero, actúan como agentes de nucleación durante la cristalización ([Kenawy y col., 2014](#)).

Todos los enlaces son simples y, por tanto, los carbonos y el oxígeno tienen hibridación sp^3 . Las cadenas del alcohol polivinílico no son rectas, sino zigzagueantes y con los átomos de H alternándose a los lados de éstas. Los grupos OH pueden estar ubicados hacia un lado de la cadena u otro, por lo que el carácter polar de la estructura se conserva uniformemente a lo largo de la misma.

El PVA fue aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos (FDA). Actualmente es utilizado en las industrias del papel, textil, en cosmética.

Como es sabido, los hidrogeles son redes tridimensionales de polímeros que pueden hincharse en agua sin solubilizarse y que, por su alto contenido en agua y su naturaleza gomosa son semejantes a tejidos naturales y podrían considerarse biocompatibles. Los hidrogeles de PVA han sido usados en numerosas aplicaciones biomédicas y farmacéuticas. Además, los geles de PVA exhiben un alto grado de hinchamiento en agua y una naturaleza elástica. Para todas estas características, el PVA es un excelente biomaterial. Los geles de PVA se han utilizado para lentes de contacto, revestimiento para órganos y administración de drogas.

Es un polímero bien conocido con grandes posibilidades para ser utilizado como biomaterial, debido a su no carcinogenicidad, capacidad de reaccionar con otros compuestos y de formar mezclas con muchos polímeros, cambiar su red neutra inicial con una cargada positiva o negativa. Además, al modificar sus características estructurales iniciales, algunas de las propiedades del PVA podrían cambiar, como la resistencia

mecánica y térmica, la hidrosolubilidad, y la estabilidad química. Además, los hidrogeles de PVA evidenciaron un muy buen comportamiento en contacto con la piel y otros tejidos, mucosa o sangre. PVA exhibe una naturaleza bioadhesiva y propiedades de memoria de forma.

Otras aplicaciones del PVA son en áreas de tratamiento de agua y aguas residuales (extracción, ultrafiltración, materiales de intercambio iónico, etc.) catálisis, separación, etc. Como producto industrial y comercial, el PVA se valora por su solubilidad y biodegradabilidad, que contribuye a su muy bajo impacto ambiental. Varios microorganismos omnipresentes en entornos artificiales y naturales son capaces de degradar el PVA mediante procesos enzimáticos.

[Morgado y col. \(2014\)](#) emplearon PVA y quitosano para diseñar un apósito para regeneración de la piel, con excelente biocompatibilidad.

Efecto del grado de hidrólisis

El grado de hidrólisis puede afectar fuertemente las propiedades de los hidrogeles resultantes ([Baker y col., 2012](#)). Al aumentar el grado de hidrólisis, más grupos hidroxilos responsables de la formación de enlaces de hidrógeno fortalecen la estructura del gel y estabilizan la integridad de la red. Por otra parte, los grupos acetato en la columna vertebral del polímero contribuyen a la heterogeneidad química a lo largo de la cadena, lo que conduce a la interrupción de la misma en el proceso de cristalización ([Mansur y col., 2008](#)).

Además, los grupos acetato son más voluminosos en comparación con los grupos hidroxilo, lo que restringe el orden de la cadena y cristalinidad ([Figura 1.2](#)) ([Yokoyama y col., 1986](#)). [Takamura y col. \(1992\)](#) obtuvieron geles más resistentes trabajando con un PVA totalmente hidrolizado (98.5%) sobre el PVA parcialmente hidrolizado (88%). El mismo comportamiento también fue reportado en otro estudio por [Adelnia y col., \(2022\)](#) y [Nagakawa y col. \(2020\)](#).

1.1.3 Polivinil pirrolidona: antecedentes

La polivinilpirrolidona (PVP), también llamada Povidona, es un polímero sintético obtenido por polimerización radical del monómero, N-vinilpirrolidona ([Figura 1.3](#)). En

1939, el científico alemán Walter Reppe patentó este proceso producto de su investigación química del acetileno (Kurakula y Rao, 2020).

En la década de 1950, PVP entró en el mercado de aerosoles para el cabello y reemplazó la resina de goma laca como fijador para el cabello agente (Panda 2015). PVP posterior ha adquirido su papel útil en el sector farmacéutico (Jun y col., 1989; Teodorescu y col., 2019), biomédica (Kurakula 2020), cosmética (Panda 2015), e industria alimentaria (WHO 1987; Karakula y Rao, 2020).

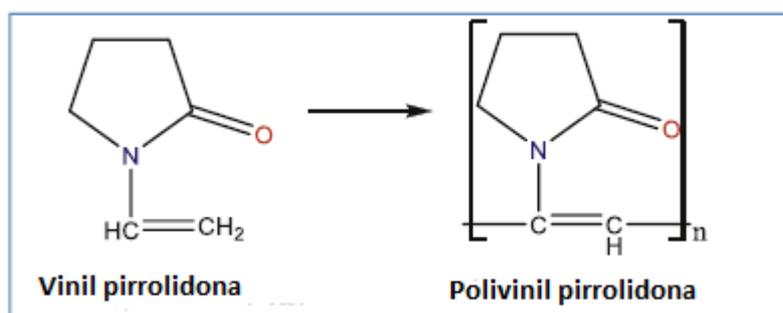


Figura 1.3. Estructura química de la vinil pirrolidona y la poli(vinilpirrolidona).

El PVP es un polímero biocompatible, no tóxico y soluble en agua (Raimi-Abraham y col, 2014), químicamente inerte, resistente a la temperatura, estable con el pH, no iónico y sin color (Halake y col., 2014). En forma seca, se presenta bajo la forma de escamas blancas o polvo higroscópico blanco amarillento, que absorbe hasta un 40% de agua en peso.

Mediante el relevamiento de la condiciones para producir metales, óxidos y calcogenuros metálicos con características estructurales definidas, surgen las contribuciones de la PVP a la formación de nanoestructuras. La PVP puede servir como un estabilizador de superficie, modificador del crecimiento, dispersante de nanopartículas y agente reductor dependiendo de las condiciones de síntesis y del material del sistema.

Es un polímero voluminoso, con grupos funcionales C=O, C-N y CH₂ muy usado en la síntesis de nanopartículas (Np). La molécula PVP contiene un componente hidrofílico (la fracción pirrolidona) y un grupo hidrofóbico considerable (grupo alquilo). El agua y muchos líquidos no acuosos son excelentes disolventes de PVP, como resultado del grupo

amida altamente polar dentro del anillo pirrolidona y los grupos metileno y metino apolares en el anillo a lo largo de su estructura (Koczur y col., 2015).

La PVP es un poderoso estabilizante, evitando la agregación de Nps a través de las fuerzas repulsivas que surgen de sus cadenas hidrofóbicas de carbono que se extienden en el disolvente e interactúan entre sí. Es a menudo un agente de control de forma, promoviendo el crecimiento de caras de cristal específicas mientras obstaculiza otras. La capacidad reductora también se explica porque los extremos de esta molécula terminan en grupos hidroxilo. Una característica importante es la existencia de oxígenos en el carbonilo que puede formar puentes de hidrógeno con las moléculas del disolvente (Figura 1.3). Es un polímero con propiedades fisicoquímicas estable sobre un amplio rango de valores de pH.

La polivinil pirrolidona es un polímero ampliamente aplicado con interesantes propiedades. Su combinación única de propiedades físicas y químicas (biocompatibilidad, estabilidad química, buena solubilidad en agua y muchos disolventes orgánicos, afinidad con complejos tanto hidrofóbicos como sustancias hidrofílicas) lo han convertido en un material adecuado en numerosas aplicaciones médicas y no médicas (industria farmacéutica y medicina, óptica y aplicaciones eléctricas, membranas, adhesivos, cerámica, papel, litografía, fotografía, fibras y textiles, aplicaciones ambientales, entre otras). La industria farmacéutica y la medicina es probablemente el campo más reconocido que se benefició con la utilización de PVP, debido a su excelente biocompatibilidad y capacidad para formar compuestos de asociación estable y complejos con muchos activos sustancias (Zhi y col., 2013). Si bien su uso inicial fue como un expansor de plasma sanguíneo, ahora es un ingrediente común en la fabricación de comprimidos, gránulos, cápsulas de gelatina blanda, geles, hidrogeles, películas y revestimientos, polvos, jarabes, soluciones orales o inyectables, revestimientos para dispositivos médicos, lentes de contacto y muchos otros (Teodorescu y Bercea, 2015). También se utiliza en productos de cuidado personal, tales como champús y cremas dentales. PVP fue aprobado por la FDA y la Organización Mundial de la Salud ha incorporado a la PVP en la lista de ingredientes aceptables con una dosis de 0–50 mg/kg

de peso corporal ([WHO 1987](#)). Como un aditivo alimenticio, el PVP es un estabilizador con código E1201.

Para mejorar las propiedades mecánicas de las matrices generalmente el polímero se mezcla con otros. Recientemente varias investigaciones sobre películas de PVP con quitosano reportaron actividad antibacteriana mejorada ([Fahmy y col, 2009](#); [Can 2005](#); [Selvam y Sundrarajan, 2012](#)).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo general

Caracterizar los polímeros usados en el presente trabajo de tesis

1.2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar un quitosano comercial obtenido de caparazones de crustáceos a través del estudio de sus principales propiedades fisicoquímicas como peso molecular y grado de deacetilación. Asimismo, realizar un análisis térmico y estructural usando diferentes herramientas analíticas como calorimetría diferencial de barrido modulada (MDSC), rayos X (DRX) y espectroscopía infrarroja (IR) con transformada de Fourier (ATR-FTIR).
- Caracterizar el polivinilalcohol y la polivinilpirrolidona comerciales mediante el uso de rayos X, ATR-FTIR y MDSC.

1.3 MATERIALES

Se usó quitosano (Q) proveniente de caparazones de crustáceos (langosta, cangrejo y camarón) suministrado por Parafarm Argentina. El producto se presenta bajo la forma de polvo. El ácido acético fue adquirido a Anedra (Buenos Aires, Argentina).

El alcohol polivinílico (PVA) usado fue marca Elvanol T-25 con un grado de hidrólisis del 86-89% y un peso molecular de 50-55 kDa.

La polivinil pirrolidona (PVP) fue proporcionado por Parafarm Argentina.

1.4 MÉTODOS

1.4.1 Análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Los análisis de DSC de los polímeros se realizaron a una velocidad de calentamiento de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ para la modulación de la señal el período utilizado fue de 60 s con una amplitud de 0.5°C . El primer barrido se realizó en un intervalo de temperaturas de -80 a 200°C . Luego de que el primer barrido fue completado, se procedió al enfriamiento de la muestra hasta alcanzar una temperatura de -80°C donde se programó una isoterma durante 5 minutos para estabilizar el sistema (Rivero y col., 2016). Posteriormente se registró una segunda corrida en el rango de temperaturas de -80°C hasta alcanzar la temperatura de descomposición de cada polímero. En la primera corrida, la temperatura máxima alcanzada de 200°C fue seleccionada para limitar la posible degradación del polímero.

1.4.2 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier y reflectancia total atenuada (ATR-FTIR)

Para estudiar las interacciones entre los distintos componentes de los polímeros en polvo se utilizó la técnica de espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier en el modo ATR.

Los espectros fueron registrados por un equipo Nicolet, iS 10 Thermo Scientific (Madison, USA) en el rango entre 4000 y 400 cm^{-1} por acumulación de 64 escaneos con una resolución de 4 cm^{-1} . Las muestras fueron ubicadas sobre un cristal de diamante ATR (Accesorio Smart iTX) para el Nicolet™ iS™10 (Thermo Scientific™, Madison, USA). Los datos fueron analizados usando el software Omnic 8 (Thermo Scientific, Madison, USA)

1.4.3 Difracción de rayos X (DRX)

La estructura y cristalinidad de los polímeros en polvo se estudiaron por medio de la técnica de difracción de rayos X. Los patrones de difracción de rayos X se obtuvieron usando un equipo X'Pert Pro P Analytical Model PW 3040/60 (Holanda), utilizando la línea Cu K α (1.542 Å), con una diferencia de potencial de 40 kV y una densidad de corriente de 30mA. Las muestras se registraron entre 4-70° (2 θ).

1.5 RESULTADOS OBTENIDOS

1.5.1 Quitosano

Determinación de impurezas, cenizas y contenido de humedad

Para determinar las impurezas (sólidos insolubles) presentes en el polímero se solubilizó el quitosano en una solución de ácido acético al 1 % (v/v) bajo agitación durante 24 h a temperatura ambiente. La solución se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 min, para facilitar la separación del material insoluble. Este residuo fue secado en estufa a 105°C \pm 1 hasta alcanzar peso constante. El contenido de impurezas promedio del quitosano fue de 1.21% informado por el proveedor.

El contenido de agua se cuantificó gravimétricamente colocando muestras de quitosano en una estufa a 105°C \pm 1 hasta alcanzar peso constante. Los resultados se expresaron como g de agua cada 100 g de quitosano. Todas las medidas se realizaron al menos por duplicado. Se obtuvo un contenido de humedad de 14.1% \pm 2.2 similar al informado por [Lamarra \(2019\)](#) y [Hernández-Cocoletzi y col. \(2009\)](#). Los autores relacionaron estos resultados con el proceso de remoción de grupos acetilo luego de la desacetilación termoalcalina de la quitina aumentando la disponibilidad de grupos amino libres capaces de interactuar con las moléculas de agua.

La determinación del contenido de cenizas es indicativa de la eficiencia del proceso de desmineralización y purificación empleado por el fabricante. Para cuantificar el contenido de cenizas se siguió el método descrito por la [AOAC \(2019\)](#). Para ello se utilizaron cápsulas de porcelana previamente calcinadas en mufla. La muestra se carbonizó hasta la obtención de un residuo carbonoso, el cual se calcinó en una mufla a 500-550°C hasta obtener cenizas blancas. El resultado se expresó como porcentaje de cenizas (g de cenizas

por cada 100 g de polímero) obteniendo un valor de 1.04 ± 0.1 . Este resultado podría estar relacionado con la presencia de impurezas de tipo mineral, como sales de CaCO_3 proveniente de los caparzones o incluso la presencia de contaminantes metálicos. Similares explicaciones fueron propuestas por [Hernández-Cocoletzi y col. \(2009\)](#). Asimismo, los autores remarcaron que el mayor contenido de cenizas podría estar asociado a la concentración de NaOH utilizada en la etapa de desacetilación lo que facilitaría la retención de impurezas.

Para cuantificar el contenido de nitrógeno total en la muestra de quitosano se utilizó el método de Kjeldahl-Arnold-Gunnig de acuerdo con el protocolo propuesto por la [AOAC \(2019\)](#). Se pesaron 0.5033 ± 0.0016 gramos de quitosano en polvo y se realizó la digestión en presencia de H_2SO_4 96% (p/p) Anedra (Buenos Aires, Argentina). Todas las determinaciones fueron realizadas al menos por duplicado. El contenido de nitrógeno total de las muestras de quitosano fue en promedio $7.54\% \pm 0.19$. Este valor fue similar al informado por [Lamarra \(2019\)](#) y [Rahmaninia y col. \(2018\)](#).

Determinación de peso molecular

Los dos factores más importantes que determinan las propiedades fisicoquímicas, y por consiguiente los usos específicos del quitosano, son el grado de desacetilación (GD) y el peso molecular (PM). De acuerdo a las características estructurales del quitosano es posible encontrar una serie de polímeros con diferentes grados de desacetilación.

Una de las propiedades que caracterizan a los componentes macromoleculares es que la viscosidad de sus disoluciones aumenta considerablemente con relación a la del disolvente puro, incluso a muy bajas concentraciones de polímero. Puede considerarse este incremento como el resultado de una mayor fricción entre los planos unimoleculares de líquidos adyacentes, ocasionada por el hecho de que las macromoléculas son de mayor tamaño que las moléculas de disolvente y, por tanto, se extiende a través de muchas de tales capas hipotéticas.

La mayor parte de los polímeros son mezclas de macromoléculas de distintos tamaños, por lo que el peso molecular proporciona siempre un valor promedio. Por tanto, según el método experimental utilizado se definen distintos valores promedio del peso molecular:

en número (M_n), en peso (M_w) o viscosimétrico (M_v). La relación entre los valores de M_w/M_n se conoce como polidispersidad.

Una de las técnicas más utilizadas para determinar el peso molecular es la **viscosimétrica**. Es un método fácil y rápido que permite conocer el peso molecular promedio viscosimétrico (M_v). Cuando el polímero es poco polidisperso, M_v corresponde aproximadamente a M_w (Ravi Kumar, 2000).

La viscosidad intrínseca de una solución de polímero está relacionada con el peso molecular del polímero según la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada (MHS) (Rinaudo, 2006).

$$[\eta] = K M_v^a \quad \text{Ec. 1.1}$$

donde,

$[\eta]$ es la viscosidad intrínseca, M_v es el peso molecular medio viscosimétrico, y K y a son constantes para un dado sistema soluto-solvente y una determinada temperatura. La determinación de las constantes K y a a partir de los datos de viscosidad intrínseca requiere una serie de polímeros monodispersos de peso molecular promedio conocido o una serie de muestras polidispersas de polímeros con pesos moleculares promedio viscosimétrico, M_v . Estos parámetros pueden ser obtenidos a partir de bibliografía (Huang y col., 2018; Khan y col., 2000; Ravi Kumar, 2000).

Mediante la ecuación de Hagen-Poiseuille para líquidos con movimiento en flujo laminar se puede relacionar el tiempo que tarda en pasar un fluido por un capilar con la viscosidad del mismo. Por lo tanto, la viscosidad de una solución puede definirse como el tiempo que tarda la disolución en pasar por un capilar fino entre dos marcas consecutivas por efecto de la gravedad.

$$Q = \frac{\pi \Delta P r^4}{8 \eta l} \quad \text{Ec. 1.2}$$

donde,

Q es el caudal del fluido expresado en $\text{cm}^3 \text{s}^{-1}$, ΔP es la diferencia de presión que mantiene el flujo (dinas cm^{-2}), r es el radio del capilar en cm , η es la viscosidad de la

solución ($\text{kg cm}^{-1} \text{s}^{-1}$) y l es la longitud del capilar en cm. Teniendo en cuenta que Q también puede expresarse como V/t , donde V representa el volumen del fluido desplazado en cm^3 y t el tiempo de escurrimiento en s, es posible encontrar una expresión que relacione la viscosidad con el tiempo de escurrimiento:

$$\eta = \frac{\pi \Delta P r^4 t}{8 V l} \quad \text{Ec. 1.3}$$

Por medio de un ensayo de viscosimetría se puede calcular el peso molecular del quitosano extraído. Para implementar la técnica es necesario utilizar diferentes definiciones de viscosidad para transformar la viscosidad cinemática (medida) en la viscosidad reducida, ya que a partir de esta última se puede determinar la viscosidad intrínseca y el peso molecular.

Por otra parte la viscosidad intrínseca se define como el límite del cociente entre la viscosidad específica de la disolución y su concentración, cuando ésta tiende a cero.

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{c}$$

o bien como el límite del cociente entre el logaritmo neperiano de la viscosidad relativa y la concentración de la disolución, también cuando la concentración del polímero tiende a cero

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\ln \eta_r}{c}$$

La viscosidad reducida expresa la contribución del polímero a la viscosidad eliminando la dependencia de la viscosidad específica con la concentración, siendo la razón entre la viscosidad específica y la concentración

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{c} = \frac{(\eta - \eta_0) \frac{1}{c}}{\eta_0 \frac{1}{c}} = \frac{(t - t_0) \frac{1}{c}}{t_0 \frac{1}{c}} \quad \text{Ec. 1.4}$$

$$\eta_{inh} = \frac{\ln(\eta_r)}{c} = \frac{1}{c} \ln\left(\frac{\eta}{\eta_0}\right) = \frac{1}{c} \ln\left(\frac{t}{t_0}\right) \quad \text{Ec. 1.5}$$

donde,

η y η_0 son, respectivamente, las viscosidades de la disolución y la del disolvente puro, t es el tiempo medido entre dos marcas sucesivas en el capilar y t_0 el tiempo correspondiente al disolvente puro medido en el mismo capilar.

Se han propuesto numerosas ecuaciones empíricas para expresar la relación entre la viscosidad intrínseca y la concentración. Entre ellas la de [Huggins \(1942\)](#):

$$\frac{\eta_{sp}}{c} \approx [\eta] + k_H [\eta]^2 c \quad \text{Ec. 1.6}$$

Esta ecuación se aplica a disoluciones diluidas, del orden del 1%.

Asimismo, [Kramer \(1938\)](#), ha establecido la relación:

$$\frac{\ln(\eta_r)}{c} \approx [\eta] - k_K [\eta]^2 c \quad \text{Ec. 1.7}$$

donde,

k_H y k_K son las constantes de Huggins y Kramer, respectivamente.

Se verifica, en el caso de que se empleen buenos disolventes que

$$k_H + k_K = 0.5$$

$$k_K < k_H$$

Ambas rectas tendrán en común la ordenada en el origen, $[\eta]$ (viscosidad intrínseca), siempre que se hayan calculado en un intervalo de concentraciones en el que las relaciones establecidas conserven la linealidad ([Figura 1.4](#)). Sus respectivas pendientes son de signo contrario (negativa la correspondiente a la viscosidad específica) y positiva (la calculada a partir del logaritmo de la viscosidad relativa), indicando que $\ln \eta_r/c$ y c covarían conjuntamente en el mismo sentido creciente del semieje positivo de las abscisas, mientras que η_{sp}/c y c lo hacen en sentidos inversos.

La viscosidad intrínseca mide el volumen específico efectivo de un polímero aislado, razón por la que su determinación se realiza extrapolando a concentración nula. Su valor depende del tamaño y forma de la molécula de soluto, así como de su interacción con el solvente y de la temperatura de trabajo. Para un sistema polímero-solvente puede utilizarse la expresión de Mark-Houwink-Sakurada para determinar el peso molecular promedio del polímero.

La mezcla ácido acético cloruro de sodio 0.1 M (HAc)/0.2 M (NaAc) fue seleccionado porque es un eluyente de quitosano de alta resolución en cromatografía (Kasaai y col., 2013; Ravi Kumar, 2000). El rango de concentraciones obtenidas estuvo comprendido entre 8.54×10^{-5} y 3×10^{-3} g ml⁻¹.

Las viscosidades intrínsecas de la mezcla se midieron utilizando un viscosímetro capilar Cannon-Ubbelohde tipo semi-micro (modelo 150) termostatzado a $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ en un baño de agua. Estas condiciones, junto con el uso de concentraciones inferiores al 3% (p/v), se seleccionaron para que las correcciones de energía cinética y cizalla fueran insignificantes. La viscosidad intrínseca se determinó por medio de las ecuaciones de Huggins (1942) y Kramer (1938).

En la Figura 1.3 se muestran η_{sp}/c y $\ln(\eta_r)/c$ en función de la concentración de polímero obteniéndose ajustes satisfactorios. La evaluación de la viscosidad intrínseca requiere la medida de los tiempos de caída de varias concentraciones diferentes de una disolución de polímero y extrapolación a concentración nula de las rectas de regresión de óptimo ajuste a los diagramas de dispersión obtenidos en las representaciones de η_{sp}/c y $\ln(\eta_r)/c$ frente a la concentración, en un sistema de coordenadas rectangulares.

El peso molecular fue 6.76×10^5 Da, similar al informado por Bof y col. (2015 y Huang y col. (2018) para quitosano proveniente de calamar.

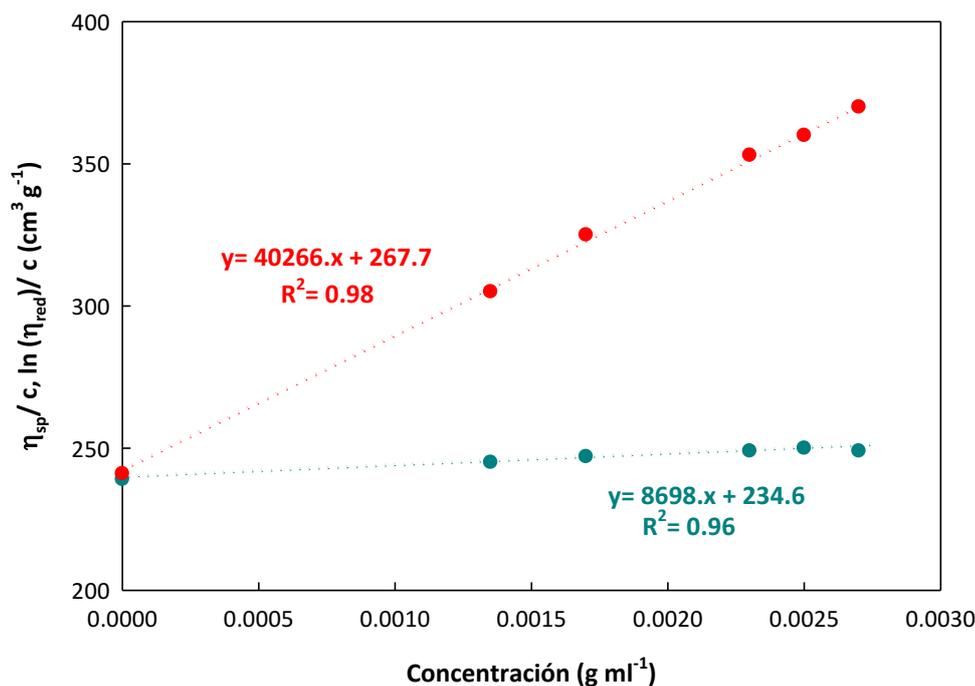


Figura 1.4. Determinación gráfica de la viscosidad intrínseca del polímero.

Grado de desacetilación por potenciometría

El grado de desacetilación (GD) representa la proporción de unidades de N-acetil-D-glucosamina con respecto al número total de unidades en el biopolímero y se puede considerar como una medida de la pureza del biomaterial (Ramírez y col., 2016).

El GD afecta su pKa intrínseco, conduciendo a un cambio en la solubilidad del quitosano en soluciones diluidas ácidas. Cuando el GD es menor que el 40 %, las cadenas de quitosano se tornan completamente insolubles en agua debido a los puentes de hidrógeno establecidos entre el alcohol, la amida y los grupos éter distribuidos sobre las unidades monoméricas a lo largo de la cadena del polímero y a la contribución de las interacciones hidrofóbicas, debido a la presencia de los grupos metilo de las funciones acetamida y a los -CH y -CH₂ de los anillos glucosídicos (Domard y Domard, 2001).

Cuando el GD está por encima del 40%, el polímero es soluble en soluciones ácidas diluidas. Este comportamiento está relacionado con el hecho de que la protonación de los grupos amino de los residuos de glucosamina contribuyen a la interrupción de las uniones puente de hidrógeno, la solvatación de los sitios catiónicos, y luego a la solubilización cuando el equilibrio de las interacciones disolvente/polímero y polímero/polímero se

vuelve favorable. Este límite está estrechamente relacionado con el valor del pKa intrínseco del quitosano, que se encuentra cercano a 6.5 (Domard y Domard, 2001). Así, cuanto más alto es el GD del quitosano, más alta es la cantidad de grupos amino libres -NH₂ que pueden protonarse (NH₃⁺) en medio ácido confiriéndole al polímero un carácter altamente reactivo.

Un grado de deacetilación de 55-70% se define como bajo, casi completamente insoluble en agua. Entre 70 y 85% es un GD medio del quitosano. Finalmente, 85-95% es un GD alto con buena solubilidad en agua, y 95-100% se llama el grado de deacetilación ultraalto, que es difícil de lograr. Mientras tanto, la reducción del peso molecular por degradación es beneficiosa para aumentar su solubilidad en el agua (Lv, 2016).

La valoración potenciométrica consiste en disolver el quitosano en un exceso de ácido clorhídrico (HCl) para que ocurra la protonación del grupo amino libre del quitosano y luego realizar una valoración con hidróxido de sodio (NaOH) hasta que el pH de la solución se estabilice, lo cual permite obtener la curva de titulación del quitosano. La curva presenta dos puntos de inflexión y la diferencia entre estos proporciona la cantidad de ácido requerido para protonar los grupos amino del quitosano.

La determinación del contenido de grupos amino en el quitosano se realizó mediante titulación potenciométrica ácido-base, método propuesto por Broussignac (1968) el cual consiste en medir las variaciones de los valores de pH al titular una solución de quitosano.

Se disolvieron $0.51 \pm 3.6 \times 10^{-3}$ g de quitosano en 20 ml de una solución acuosa de HCl 0.3 M. Como solución titulante se usó NaOH 0.0858 N valorada con biftalato de potasio utilizado como patrón primario. Se agregó la solución de NaOH en cantidades constantes de 0.5 ml por vez con agitación mecánica constante y se registraron los valores de pH después de cada adición utilizando un potenciómetro.

El punto final de la titulación se determinó a través del método de la derivada primera, obtenida a partir de la curva de titulación. La potenciometría es un método útil siempre que el material a estudiar sea completamente soluble, ya que permite determinar el contenido de grupos aminos libres y en consecuencia el GD. De acuerdo a Llópiz Yurell y col. (2009), la técnica tiene la ventaja de que cuantifica los grupos aminos protonados

directamente, por lo que no existe el problema de la no accesibilidad de los grupos aminos durante la etapa de protonación, como resultado de la formación de la sal.

Las Figuras 1.5a y b muestran la curva de titulación potenciométrica y la derivada primera de la muestra de quitosano analizadas.

Se observó que hacia al final de la titulación, a un pH básico (superior a 9), se produjo la floculación del quitosano debido a la desprotonación de los grupos amino.

La diferencia entre los dos puntos de inflexión en la curva de titulación corresponde a la cantidad de ácido requerido para protonar los grupos amino del quitosano, permitiendo calcular el grado de desacetilación (GD). El grado de desacetilación de calculó mediante la ecuación (1.8):

$$\%NH_2 = \frac{16,1(y-x)f}{w} \quad \text{Ec. 1.8}$$

donde,

y es el punto de inflexión mayor, x corresponde al punto de inflexión menor, ambos expresados como volúmenes en ml, f es la molaridad de la solución de NaOH, w el peso de la muestra (expresado en g) y 16.1 es el peso equivalente del quitosano (expresado en g/equivalente).

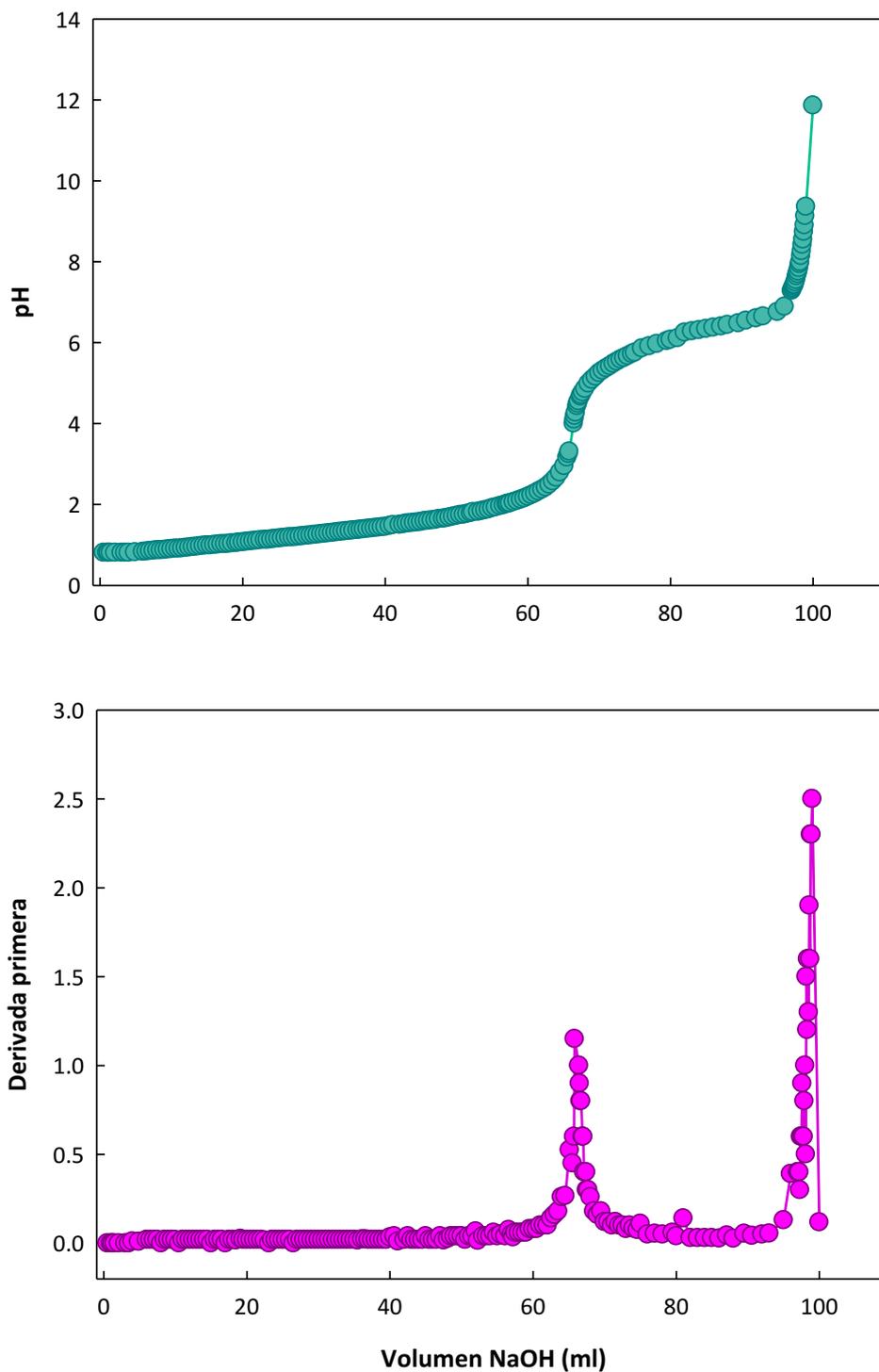


Figura 1.5. a) Curva de titulación potenciométrica; **b)** derivada primera proveniente de los datos de la curva de titulación. Los máximos corresponden a los puntos de inflexión.

El valor obtenido para el quitosano utilizado en este trabajo de tesis fue del 90.06%, menor al reportado por el fabricante que fue del 95.26%. [Heidari y col. \(2018\)](#) obtuvieron

un GD de 50% después de realizar sólo una etapa de hidrólisis alcalina de quitosano proveniente de camarones. [Bof y col. \(2015\)](#) informaron valores de 84 y 86% para quitosanos de PM medio y alto, respectivamente.

Las técnicas de DSC, ATR-FTIR y DRX se emplearon para caracterizar a los tres polímeros usados para la obtención de las matrices.

Análisis térmico

La [Figura 1.6](#) muestra que el quitosano posee un evento endotérmico cercano a 139°C asignado a la remoción de agua retenida por el polímero. La entalpía asociada a este proceso fue de 255 Jg⁻¹.

[Rivero \(2012\)](#), trabajando con quitosano purificado por Sigma-Aldrich con un GD del 75% informó una temperatura de pico de 144°C y una entalpía de fusión de 195 J g⁻¹. Según [Kittur y col. \(2002\)](#) los polisacáridos presentan una fuerte afinidad por las moléculas de agua. Los autores indicaron que la afinidad depende de la cantidad de sitios disponibles para interactuar.

Por otra parte, los termogramas correspondientes a la capacidad calorífica reversible pusieron en evidencia la temperatura de transición vítrea (T_g) del quitosano. Los eventos térmicos analizados por MDSC confirmaron la eficiencia de la técnica para discriminar la relajación endotérmica asociada de la transición vítrea de quitosano del evento endotérmico atribuido a la remoción de agua. La [Figura 1.5](#) muestra el salto en la curva de capacidad calorífica reversible correspondiente a la temperatura de transición vítrea a 66.5°C. [Dhawadey col. \(2012\)](#) informaron una T_g de 61°C para quitosano con un GD de y un peso molecular aproximado de 7.1×10^5 gmol⁻¹ mediante análisis térmico por 85% . MDSC

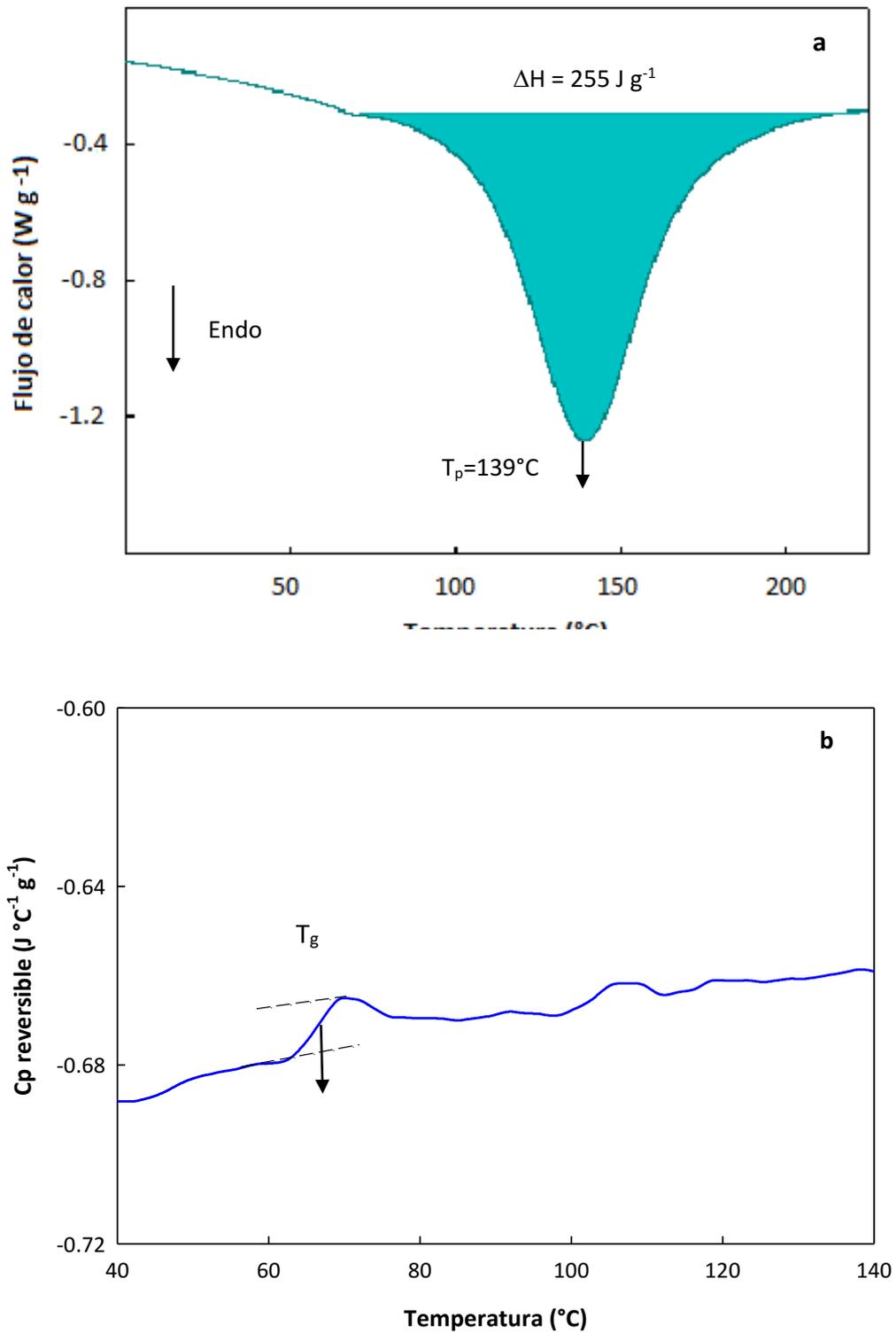


Figura 1.6. Termograma obtenido por calorimetría diferencial de barrido de quitosano en polvo mostrando la curva de flujo de calor **(a)** y la curva de capacidad calorífica C_p **(b)** en función de la temperatura.

Análisis ATR-FTIR y RX

En la [Figura 1.7](#) se presenta el espectro ATR-FTIR del quitosano en polvo. En la región 3000–3700 cm^{-1} del espectro, el quitosano exhibe la banda debida a estiramiento de los enlaces OH y N-H centrados a 3364 cm^{-1} . El ancho de esta banda es atribuido a los enlaces de hidrógeno. La banda OH se superpone con la de estiramiento de N-H. Las bandas observadas en 2917 y 2875 cm^{-1} corresponden al estiramiento axial de la unión C-H.

La banda de amida I (C=O) característica del quitosano con unidades acetiladas aparece a 1652 cm^{-1} mientras el pico a 1598 cm^{-1} se produce por el solapamiento de la flexión en el plano (tijeras) de N-H de los grupos amino de quitosano y la banda de la amida II. El pico ubicado a 1381 cm^{-1} corresponde a la deformación simétrica de los grupos CH_3 mientras la banda localizada a 1325 cm^{-1} en el espectro de la [Figura 1.6](#) corresponde a la deformación de la amida III ([Ramírez Castro y col., 2013](#)).

Las bandas a 1423 cm^{-1} resultan del estiramiento axial de la unión -C-N- acoplada con 1381 cm^{-1} atribuida a -N-H- y las bandas correspondientes al esqueleto del polisacárido, incluidas las vibraciones de los enlaces glicosídicos (estiramientos C-O y C-O-C) se observaron en el rango 1157-896 cm^{-1} ([Lamarra y col., 2016](#); [Yoksan y col., 2010](#)).

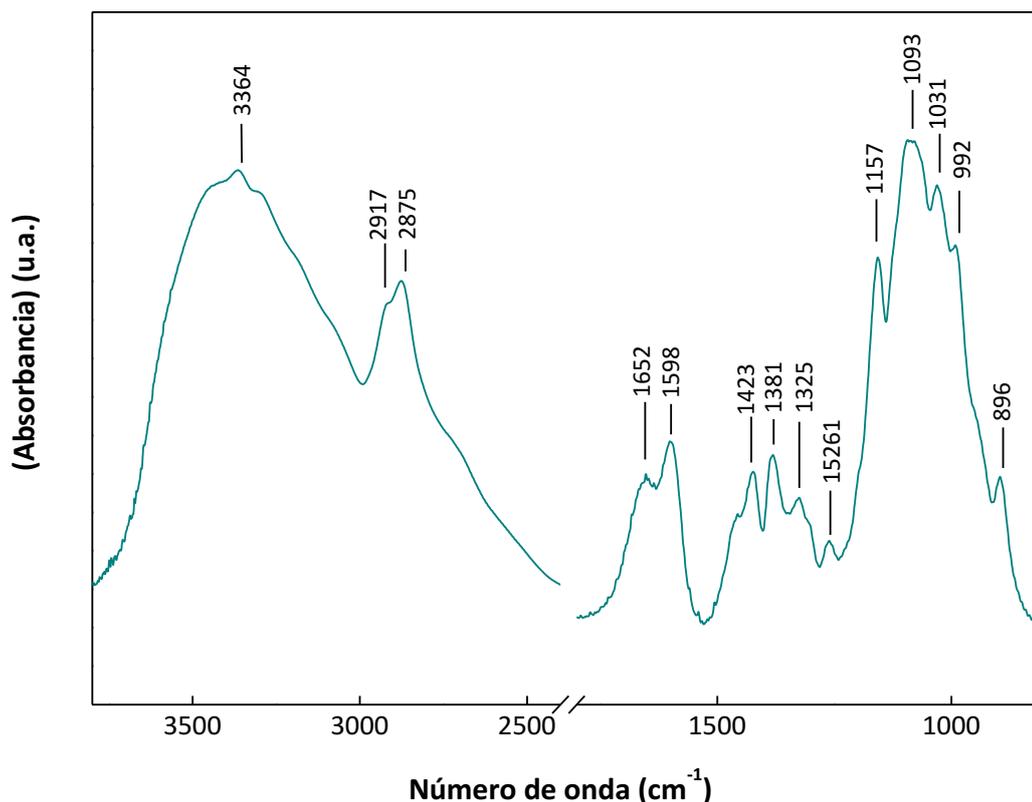


Figura 1.7. Espectro de absorción ATR-FTIR de quitosano en polvo.

La muestra de quitosano presentó patrones similares a los reportados en la literatura (Fernandez-Cervera y col., 2004). Dado que el quitosano presenta dos formas cristalinas distintas debido a su polimorfismo, los patrones de difracción representan mezclas de estas dos formas. Los productos insolubles en agua exhiben tres picos característicos a $2\theta=10.4, 19.8$ y 22.0° , espectros correspondientes al patrón polimórfico *tendon* hidratado mientras el patrón llamado polimorfismo *annealed* exhibe tres picos principales a $2\theta=15.2, 21.1$ y 23.8° , que se conoce como polimorfismo anhidro. La diferencia en la estructura cristalina deriva del modo de empaquetamiento de la celda unidad de la molécula de quitosano y el número de moléculas de agua en las celdas también juega un rol importante. Para el quitosano de alto peso molecular, la conversión de la forma polimórfica *tendon* a *annealed* se observa cuando se calienta una suspensión acuosa, y la extensión de la conversión depende tanto del peso molecular como del grado de acetilación (GA).

Como se muestra en la [Figura 1.8](#), el espectro exhibió dos picos principales a $2\theta=11.8$ y 20.1° , coincidentes con el patrón de polimorfismo entre polimorfismos *tendón* y *annealed*. Asimismo, el patrón de difracción exhibió otros pequeños picos además de los ya mencionados a $2\theta= 5.9$ y 40.1° , presentando un espectro característico de crustáceos ([Figura 1.8](#)). Las posiciones de los picos corresponden a las distancias interplanares 13.9, 7.7, 4.4 y 2.1 Å, respectivamente ([Abdel-Rahman y col., 2015](#)).

El valor del tamaño del cristal obtenido empleando el programa X'Pert High Score fue de 52 Å ([Figura 1.8](#)). Usando la ecuación online ([Instanano, 2020](#)), el valor fue de 5.3 nm (53 Å).

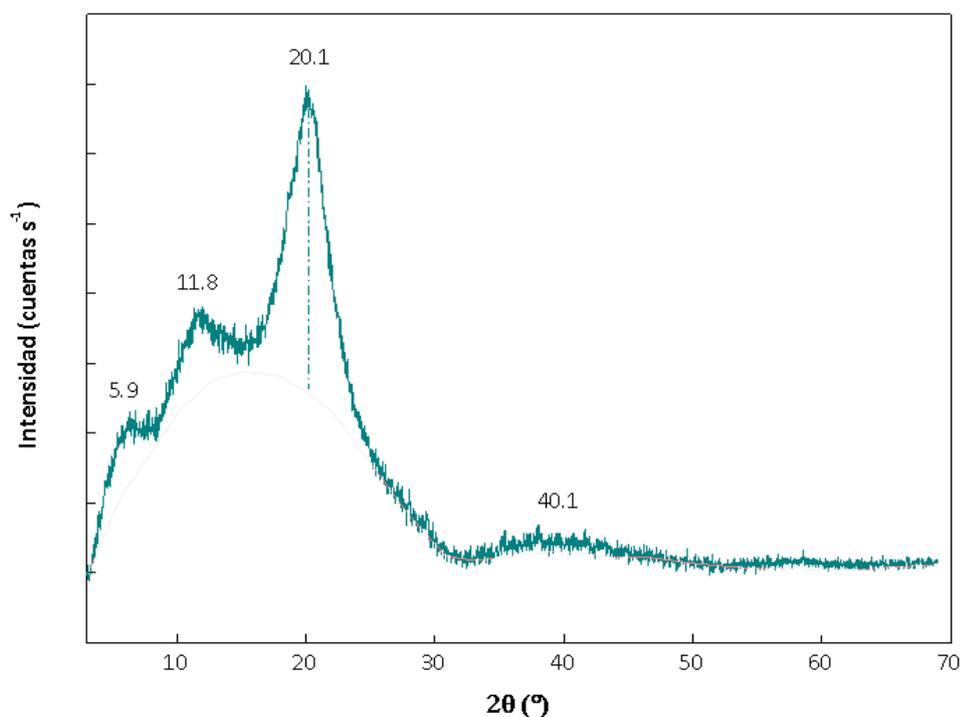


Figura 1.8. Espectro de difracción de rayos X de la muestra de quitosano en polvo.

Analizando el intervalo, 2θ 4-60° ([Figura 1.9](#)), se pudo apreciar que las difracciones registradas se correspondieron con cuatro picos anchos u hombros, poco o mal resueltos. Para resolver estos hombros se hizo la deconvolución de los mismos resultando en la obtención de cuatro picos que combinados forman la curva envolvente tal como se muestra en la [Figura 1.10](#).

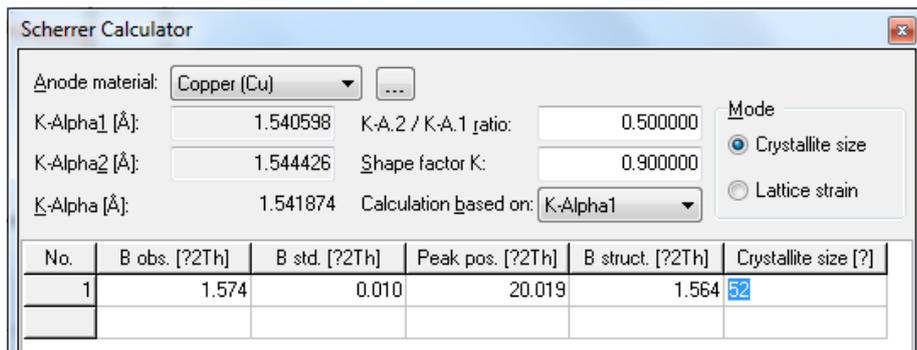


Figura 1.9. Espectro de difracción de rayos X de la muestra de quitosano en polvo.

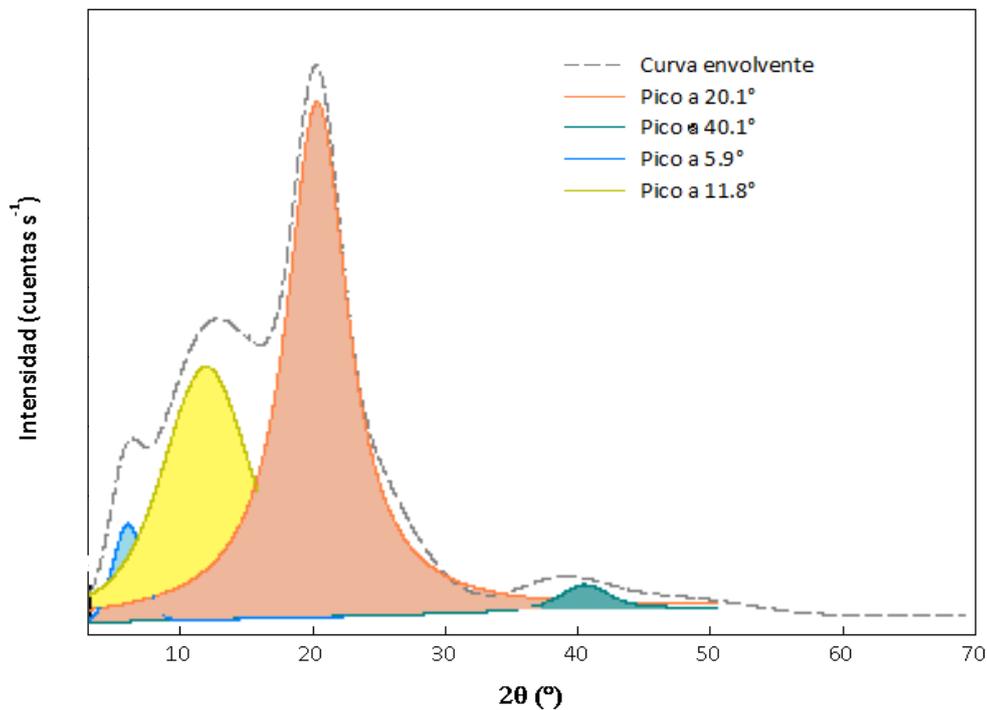


Figura 1.10. Espectro de difracción de rayos X de la muestra de quitosano en polvo mostrando la deconvolución de los picos mediante una función de ajuste Gaussiana.

En resumen, el quitosano proveniente de crustáceos se caracterizó mediante diferentes herramientas analíticas como DRX, ATR-FTIR, MDSC, titulación ácido-base.

Las caracterizaciones del material realizadas por difracción de rayos X y espectroscopía de infrarrojo permitieron corroborar que el material de partida correspondía a quitosano. El peso molecular dio un valor de 6.76×10^5 Da y el grado de desacetilación obtenido

experimentalmente fue de 90.06%, los cuales se encuentran dentro de los márgenes informados para este biopolímero.

La diversidad de valores reportados en la literatura en cuanto a peso molecular y grado de desacetilación depende, en gran medida, del origen, propiedades y condiciones de obtención y purificación del quitosano.

1.5.2 Alcohol polivinílico

El análisis térmico del PVA en polvo mostrado en la [Figura 1.11a](#) exhibió un pico endotérmico durante la etapa de calentamiento, centrado a una temperatura de 211°C. Un resultado similar fue informado por [Gupta y col. \(2009\)](#). Este evento fue atribuido a la fusión de la fase cristalina del PVA. Asimismo, la curva de capacidad calorífica reversible del PVA mostró la temperatura de transición vítrea T_g a 64.3°C ([Figura 1.11b](#)). [Kim \(2010\)](#) informó un valor de T_g de 41.7°C.

.

Análisis térmico por DSC

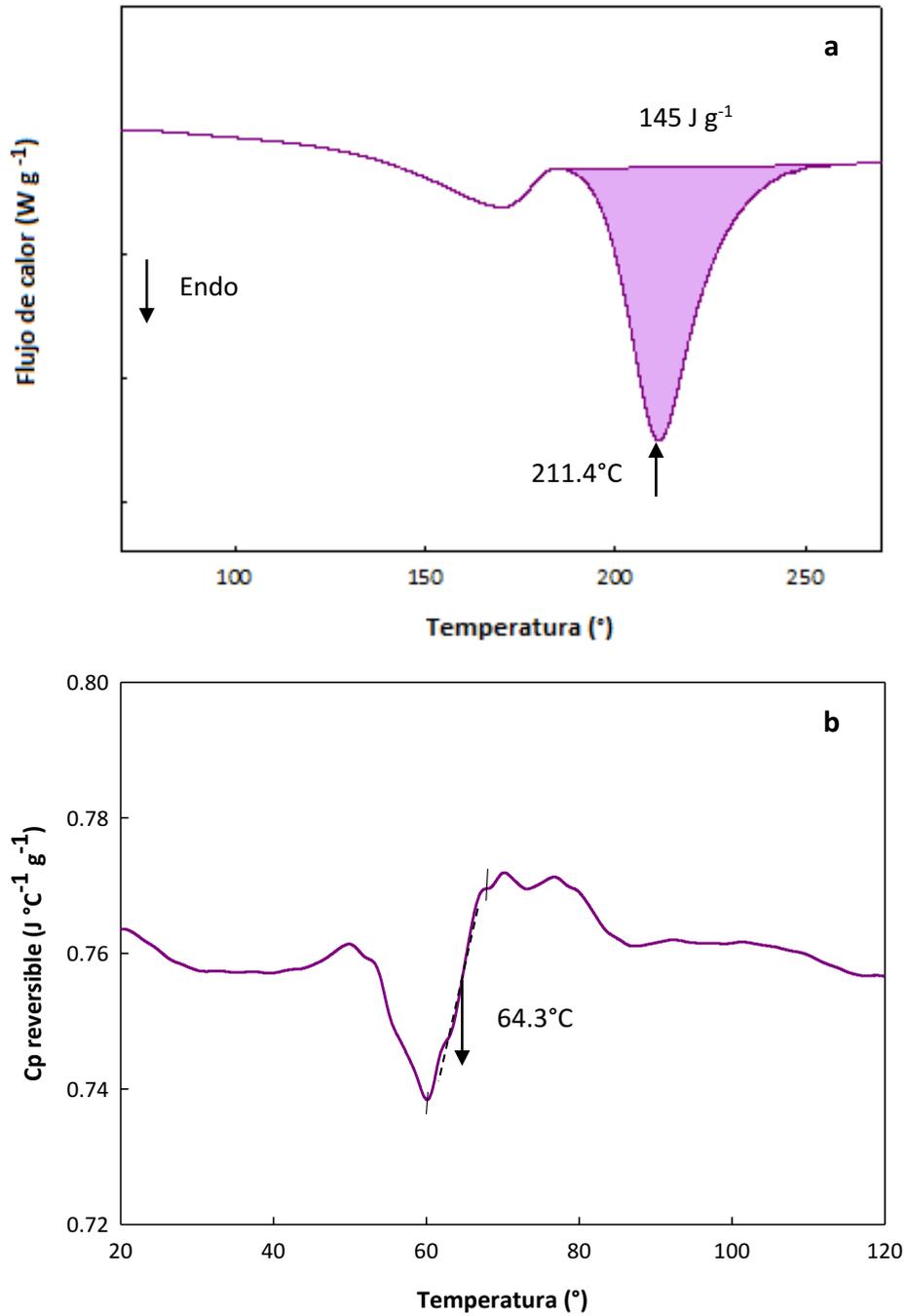


Figura 1.11. Termograma obtenido por calorimetría diferencial de barrido de PVA en polvo mostrando la curva de flujo de calor (a) y la curva de capacidad calorífica C_p reversible (b) en función de la temperatura.

Análisis ATR-FTIR y RX

Como se muestra en la [Figura 1.12](#), las bandas de absorción características del PVA en polvo se observaron a 3237 cm^{-1} (estiramiento de OH), 2935 cm^{-1} (estiramiento asimétrico del CH_2), 2903 cm^{-1} (estiramiento simétrico del CH_2), 1413 cm^{-1} (torsión de CH_2 y flexión de OH), 1144 cm^{-1} (estiramiento de CO secuencia cristalina de PVA), 1081 cm^{-1} (estiramiento de CO y flexión de OH de la porción amorfa del PVA), 915 cm^{-1} (flexión del CH_2) y 829 cm^{-1} (balanceo del CH) ([Kim 2010](#)).

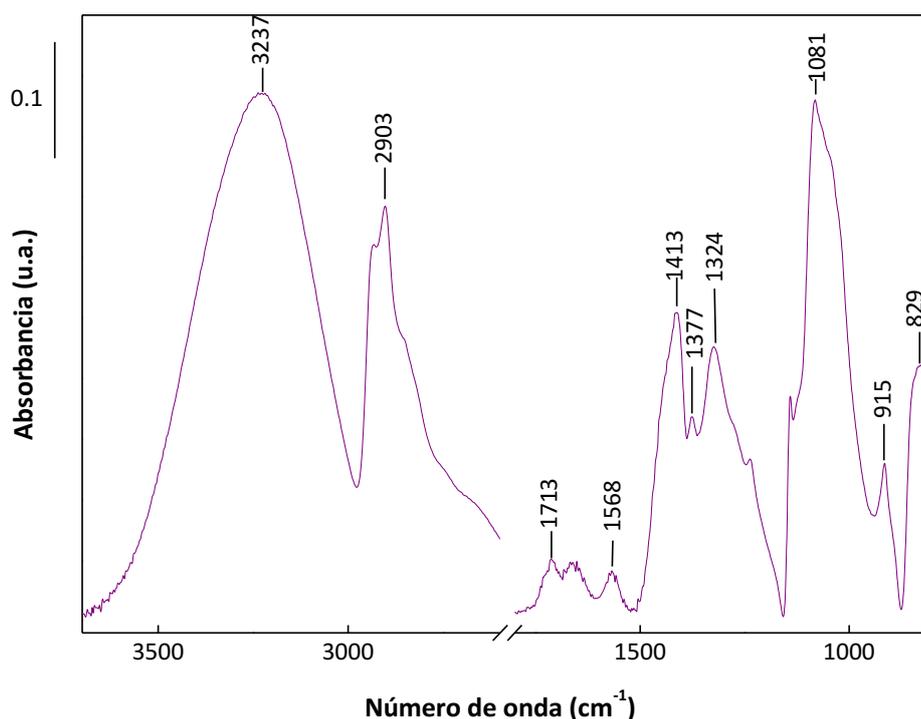


Figura 1.12. Espectro ATR-FTIR del alcohol polivinílico (PVA) en polvo.

El PVA, como polímero semicristalino, exhibió cinco picos típicos de difracción en el rango angular de 10° - 50° . Un pico de difracción del plano (100) a 10.7° , (10 $\bar{1}$) a 18.5° , (101) a 19.4° , (200) a 22.4° , y un pico compuesto de planos cristalinos de (111), (1 $\bar{1}$ 1), (210) y (2 $\bar{1}$ 0) alrededor de 40.4° ([Figura 1.13](#) y [1.14](#)) ([Ricciardi y col., 2004](#); [Chen y col., 2018](#)). La cristalinidad del PVA surge de las fuertes interacciones puente de hidrógeno inter e intramoleculares ([Boonsuk y col., 2018](#)).

El tamaño del cristal obtenido empleando el programa X'Pert High Score ([Figura 1.8](#)) y la ecuación online ([Instanano, 2020](#)) fue de 6.7 nm (67 \AA).

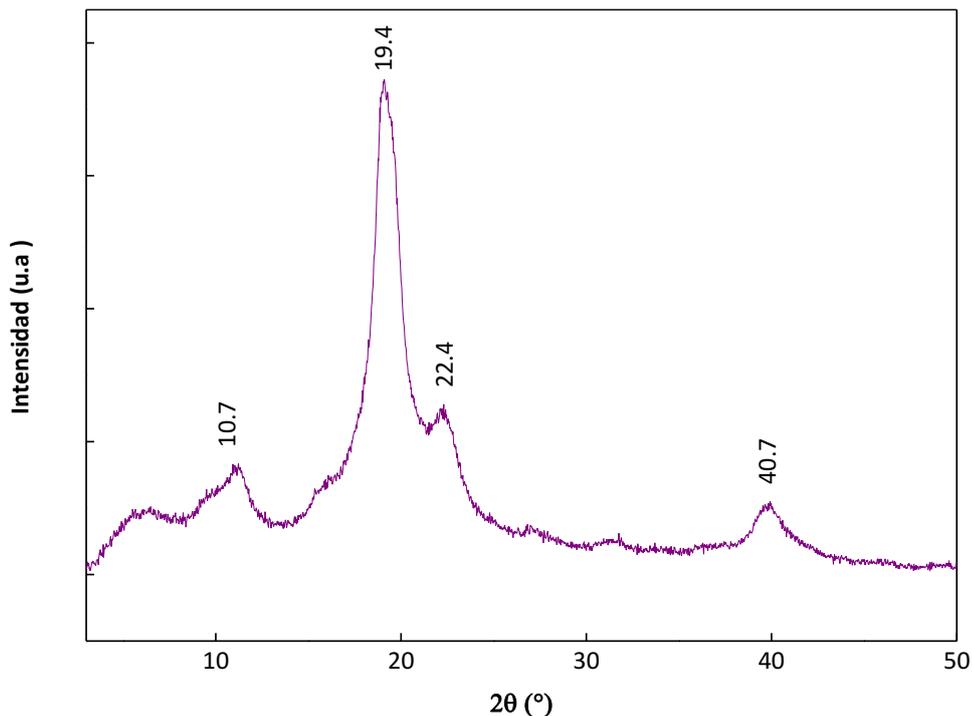


Figura 1.13. Espectro de difracción de rayos X de la muestra de polivinil alcohol (PVA) en polvo.

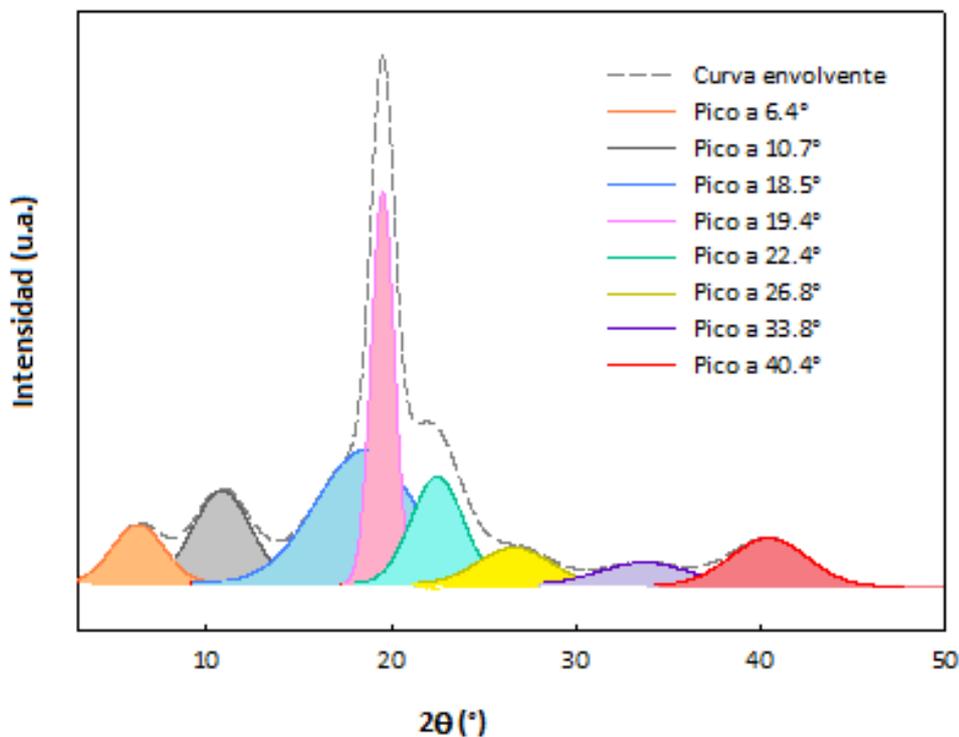


Figura 1.14. Espectro de difracción de rayos X de la muestra de PVA en polvo mostrando la deconvolución de los picos mediante una función de ajuste Gaussiana.

1.5.3 Polivinil pirrolidona (PVP)

Como puede observarse en las curvas de flujo calórico obtenidas por DSC y capacidad calorífica (MDSC) en función de la temperatura, la temperatura del evento endotérmico T_p se ubicó a 211°C y la T_g a 107.6°C. Dependiendo del peso molecular medio (Mw), la temperatura de transición vítrea (T_g) de PVP puede variar desde 100°C (para Mw $2.5 \cdot 10^3$ g mol⁻¹) a 175°C (para Mw de 10^6 g mol⁻¹) (Zabska y col., 2011). Los valores de T_g caen por debajo de 100°C para bajos pesos moleculares y también debido a la adición de pequeñas cantidades de agua.

En la [Figura 1.16](#), el espectro ATR-FTIR del PVP en polvo muestra los picos a 1460 y 1421 cm⁻¹ característicos del grupo pirrolidinil y las bandas a 1651 y 1017 cm⁻¹ se atribuyeron a la vibraciones de los grupos C=O y C-N, respectivamente (Liu y col., 2008). Las bandas de absorción debidas al estiramiento de OH se observó a 3426 cm⁻¹ y la asignada al estiramiento asimétrico del CH₂ se localizó a 2950 cm⁻¹ (Abdelrazek y col., 2018). Otros picos importantes a 1285 y 1460 cm⁻¹ se asignaron a la vibración de estiramiento C-N y la fijación de grupos CH₂ en el anillo pirrol (Selvam y Sundrarajan, 2012).

Análisis térmico por DSC

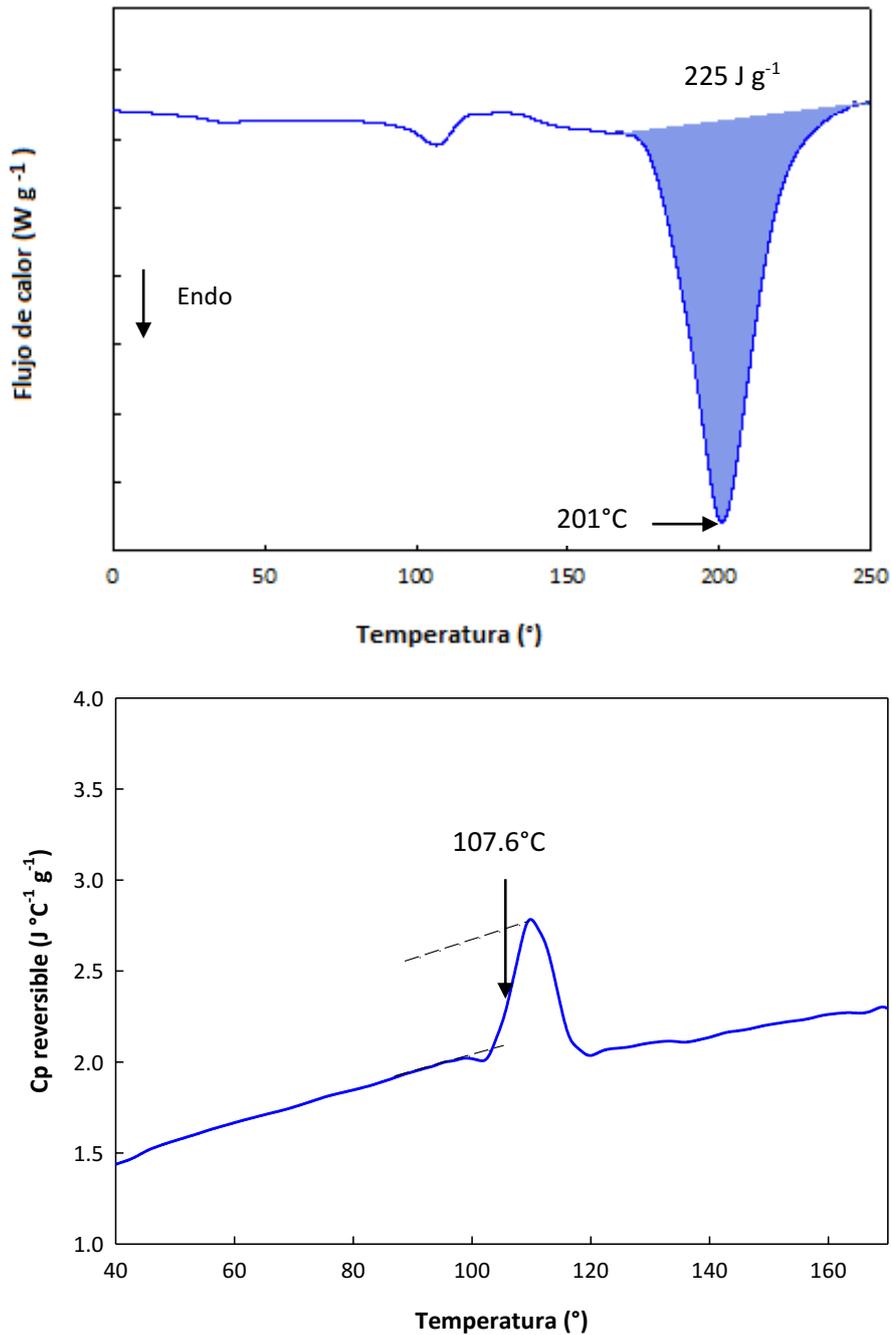


Figura 1.15. Termograma obtenido por calorimetría diferencial de barrido de PVP en polvo mostrando la curva de flujo de calor **(a)** y la curva de capacidad calorífica C_p reversible **(b)** en función de la temperatura.

Análisis ATR-FTIR y RX

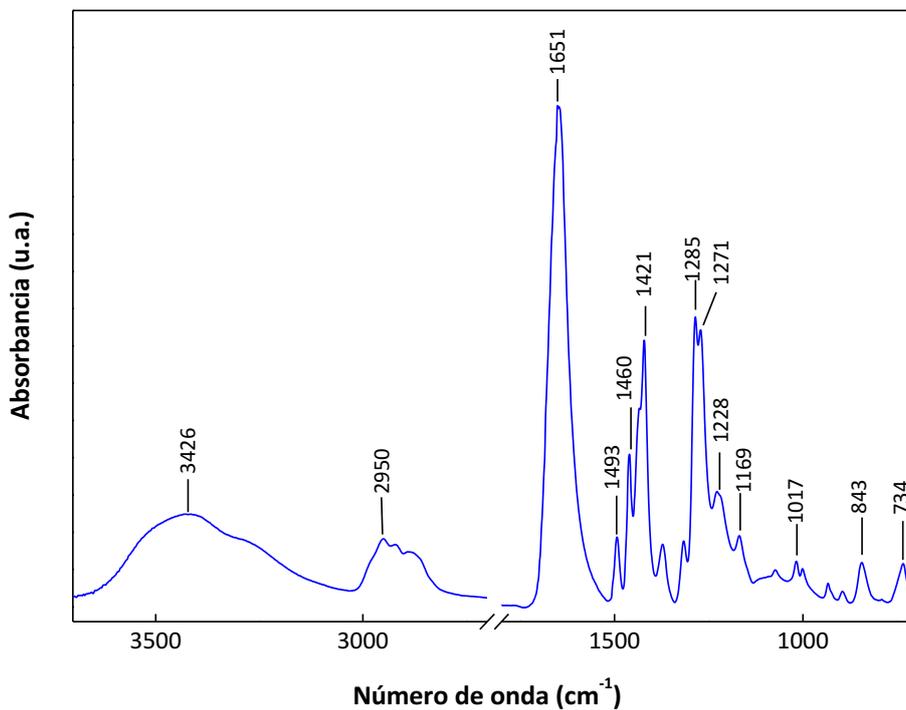


Figura 1.16. Espectro de absorción ATR-FTIR de polivinil pirrolidona (PVP) en polvo.

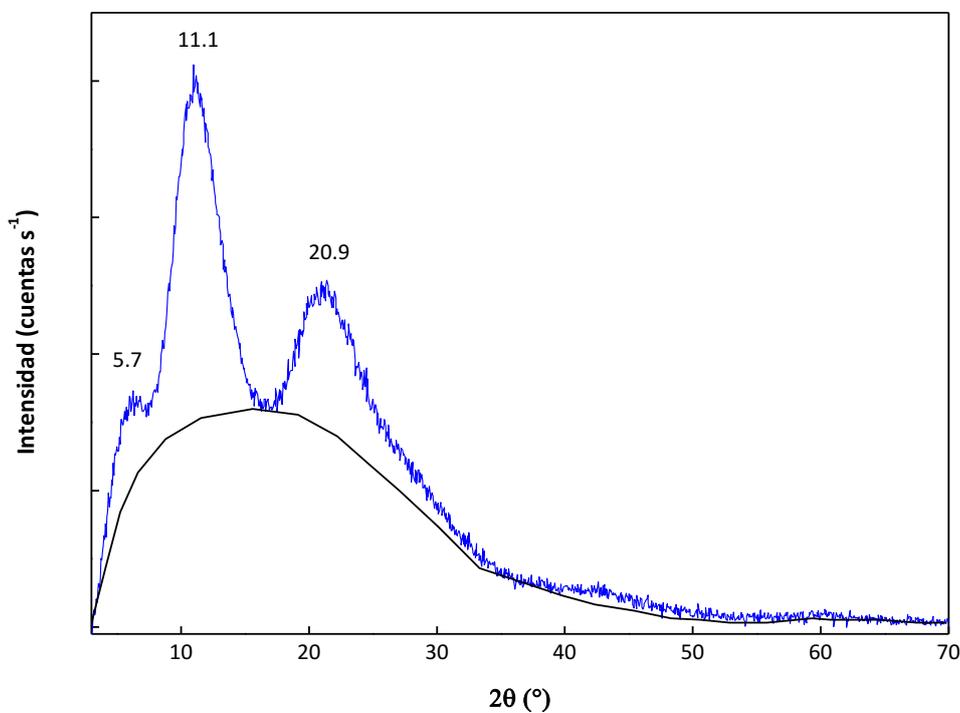


Figura 1.17. Espectro de difracción de rayos X de la muestra de polivinil pirrolidona (PVP) en polvo.

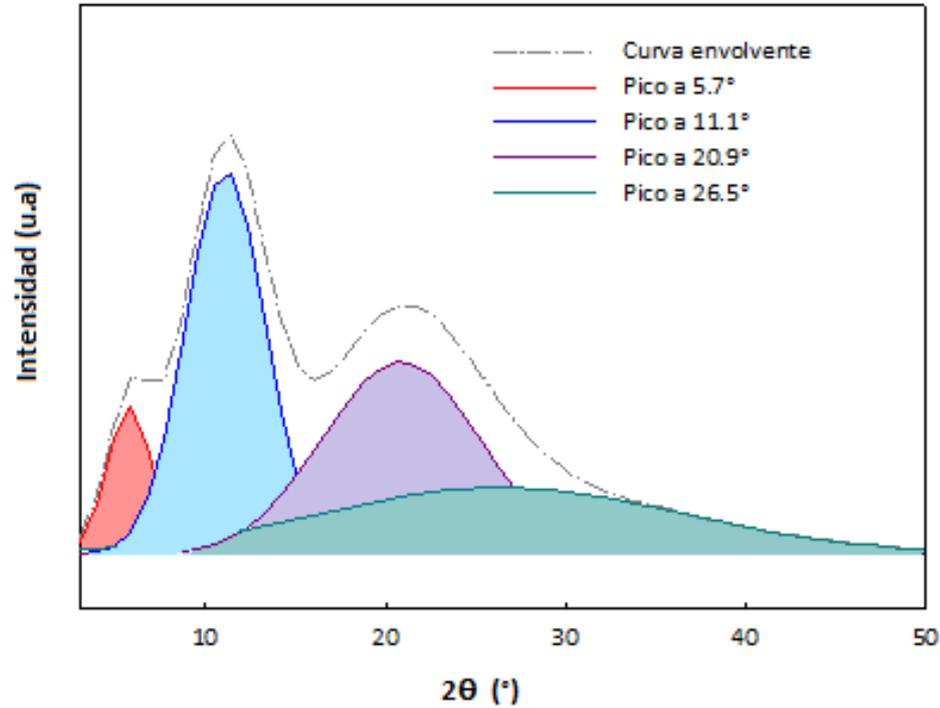


Figura 1.18. Espectro de difracción de rayos X de la muestra de polivinil pirrolidona (PVP) en polvo mostrando la deconvolución mediante una función de ajuste Gaussiana.

El difractograma de RX del PVP en polvo mostró dos picos ubicados a 2θ 11.1° y 20.9° relacionados a la naturaleza amorfa del polímero (Figura 1.17). Similares resultados fueron informados por Bhuiyan y col. (2015). El pico ancho en el difractograma del PVP sugiere que no hay difracción ni orden molecular tridimensional de largo alcance lo que es indicativo de un compuesto amorfo (Boonsuk y col., 2018).

La deconvolución del difractograma de RX se muestra en la Figura 1.18.

1.6 REFERENCIAS

- Abdel-Rahman, R. M., Hrdina, R., Abdel-Mohsen, A. M., Fouda, M. M. G., Soliman, A. Y., Mohamed, F. K., Pinto, T. D. (2015). Chitin and chitosan from Brazilian Atlantic Coast: Isolation, characterization and antibacterial activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 80, 107–120. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.06.027>
- Abdelrazek, E. M., Abdelghany, A. M., Badr, S. I., & Morsi, M. A. (2018). Structural, optical, morphological and thermal properties of PEO/PVP blend containing different concentrations of biosynthesized Au nanoparticles. *Journal of Materials Research and Technology*, 7(4), 419-431. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2017.06.009>
- Adelnia, H., Ensandoost, R., Moonshi, S. S., Gavvani, J. N., Vasafi, E. I., & Ta, H. T. (2021). Freeze/thawed polyvinyl alcohol hydrogels: Present, past and future. *European Polymer Journal*, 110974.
- Agulló, E., Mato, R., & Goycoolea, F. (2004). Quitina y quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones. *Perú, Programa CYTED, CIAD, AC, Fondo Editorial de La Pontificia Universidad Católica Del Perú*, 101–154.
- Ahsan, S. M., Thomas, M., Reddy, K. K., Sooraparaju, S. G., Asthana, A., & Bhatnagar, I. (2018). Chitosan as biomaterial in drug delivery and tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 110, 97–109. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.140>
- Aldana, A. A., González, A., Strumia, M. C., & Martinelli, M. (2012). Preparation and characterization of chitosan/genipin/poly(N-vinyl-2- pyrrolidone) films for controlled release drugs. *Materials Chemistry and Physics*, 134(1), 317–324. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2012.02.071>
- Ali, A., & Ahmed, S. (2018). A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 273–286. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.078>
- AOAC. (2019). *Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis*, (21st ed.). Washington, DC. Retrieved from <https://www.aoac.org/official-methods-of-analysis-21st-edition-2019/>
- Aranaz, I., Mengibar, M., Harris, R., Panos, I., Miralles, B., Acosta, N., ... Heras, A. (2009). Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Current Chemical Biology*, 3(2), 203–230. <https://doi.org/10.2174/2212796810903020203>
- Aslam, M., Kalyar, M.A., Raza, Z. A. (2018). Polyvinyl alcohol: a review of research status and use of polyvinyl alcohol based nanocomposites. *Polymer Engineering & Science*, 58(12), 2119-2132. <https://doi.org/10.1002/pen.24855>
- Baker, M. I., Walsh, S. P., Schwartz, Z., & Boyan, B. D. (2012). A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 100B(5), 1451–1457. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.32694>
- Berghoff, C. F. (2011). Desarrollo y caracterización de matrices compuestas quitosano/polímero sintético para regeneración de tejido óseo, 1–229. UNLP, La Plata, Argentina

http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2769/Documento_completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y

- Bof, M. J., Bordagaray, V. C., Locaso, D. E., & García, M. A. (2015). Chitosan molecular weight effect on starch-composite film properties. *Food Hydrocolloids*, 51, 281–294. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.05.018>
- Boonsuk, P., Kaewtatip, K., Chantarak, S., Kelarakis, A., & Chaibundit, C. (2018). Super-tough biodegradable poly (vinyl alcohol)/poly (vinyl pyrrolidone) blends plasticized by glycerol and sorbitol. *Journal of Applied Polymer Science*, 135(26), 46406. <https://doi.org/10.1002/app.46406>
- Borges, O., Borchard, G., de Sousa, A., Junginger, H. E., & Cordeiro-da-Silva, A. (2007). Induction of lymphocytes activated marker CD69 following exposure to chitosan and alginate biopolymers. *International Journal of Pharmaceutics*, 337(1–2), 254–264. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.01.021>
- Broussignac, P. (1968). Chitosan: a natural polymer not well known by the industry. *Chimie and Industrie Genie Chimique*, 99(9), 1241–1247.
- Bhuiyan, M. A. Q., Rahman, M. S., Rahaman, M. S., Shajahan, M., & Dafader, N. C. (2015). Improvement of swelling behaviour of poly (vinyl pyrrolidone) and acrylic acid blend hydrogel prepared by the application of gamma radiation. *Organic Chem Curr Res*, 4(138), 2161-0401. <https://doi.org/10.4172/2161-0401.1000138>
- Can, H. K. (2005). Synthesis of persulfate containing poly (N-vinyl-2-pyrrolidone) (PVP) hydrogels in aqueous solutions by γ -induced radiation. *Radiation Physics and Chemistry*, 72(6), 703–710. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2004.04.028>
- Chang, C., Lue, A., & Zhang, L. (2008). Effects of crosslinking methods on structure and properties of cellulose/PVA hydrogels. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 209(12), 1266–1273. <https://doi.org/10.1002/macp.200800161>
- Chen, Y. N., Jiao, C., Zhao, Y., Zhang, J., & Wang, H. (2018). Self-assembled polyvinyl alcohol–tannic acid hydrogels with diverse microstructures and good mechanical properties. *ACS omega*, 3(9), 11788-11795. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b02041>
- Cconislla Bello, J. L., Jacinto, C., Maza, I., Jahuira, M., Pando, A., Mayta, H., & Valderrama, A. (2016). Desarrollo de micropartículas de quitosano cuaternizado y entrecruzado para la adsorción de ácido desoxirribonucleico (Adn). *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 82(4), 467–479. <https://doi.org/10.37761/rsqp.v82i4.136>
- Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R. M., & Chiellini, E. (2011). Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 36(8), 981–1014. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.02.001>
- Dhawade, P. P., & Jagtap, R. N. (2012). Characterization of the glass transition temperature of chitosan and its oligomers by temperature modulated differential scanning calorimetry. *Pelagia Research Library Advances in Applied Science Research*, 3(3), 1372–1382. www.pelagiaresearchlibrary.com

- Domard, A., & Domard, M. (2001). Chitosan: structure-properties relationship and biomedical applications. In *Polymeric Biomaterials, Revised and Expanded* (pp. 187–212). Villeurbane, France.
- Dutta, P. K., Ravikumar, M. N. V., & Dutta, J. (2002). Chitin and chitosan for versatile applications. *Journal of Macromolecular Science - Polymer Reviews*, 42(3), 307–354. <https://doi.org/10.1081/MC-120006451>
- Fahmy, H. M., Abo-Shosha, M. H., & Ibrahim, N. A. (2009). Finishing of cotton fabrics with poly (N-vinyl-2-pyrrolidone) to improve their performance and antibacterial properties. *Carbohydrate Polymers*, 77(4), 845–850. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.03.003>
- Fernandes, J. C., Tavaría, F. K., Soares, J. C., Ramos, Ó. S., João Monteiro, M., Pintado, M. E., & Xavier Malcata, F. (2008). Antimicrobial effects of chitosans and chitoooligosaccharides, upon *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, in food model systems. *Food Microbiology*, 25(7), 922–928. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.05.003>
- Fernandez-Cervera, M., Heinamaki, J., Raanen, M., Maunu, S. L., Karjalainen, M., Nieto-Acosta, O. M., Yliruusi, J. (2004). Solid-state characterization of chitosans derived from lobster chitin. *Carbohydrate Polymers*, 58(4), 401–408. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.08.017>
- Gerasimenko, D. V., Avdienko, I. D., Bannikova, G. E., Zueva, O. Y., & Varlamov, V. P. (2004). Antibacterial effects of water-soluble low-molecular-weight chitosans on different microorganisms. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40(3), 253–257. <https://doi.org/10.1023/B:ABIM.0000025947.84650.b4>
- Gomaa, M., Hifney, A. F., Fawzy, M. A., & Abdel-Gawad, K. M. (2018). Use of seaweed and filamentous fungus derived polysaccharides in the development of alginate-chitosan edible films containing fucoïdan: Study of moisture sorption, polyphenol release and antioxidant properties. *Food Hydrocolloids*, 82, 239-247. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.03.056>
- Goycoolea, F. M., ArgOelles-Monal, W., Peniche, C., & Higuera-Ciapara, I. (2000). Chitin and Chitosan F.M. *Novel Macromolecules in Food Systems*, 265–308.
- Gupta, S., Pramanik, A. K., Kailath, A., Mishra, T., Guha, A., Nayar, S., & Sinha, A. (2009). Composition dependent structural modulations in transparent poly (vinyl alcohol) hydrogels. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 74(1), 186-190. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.07.015>
- Haaf, F., Sanner, A., & Straub, F. (1985). Polymers of N-vinylpyrrolidone: Synthesis, characterization and uses. *Polymer Journal*, 17(1), 143–152. <https://doi.org/10.1295/polymj.17.143>
- Halake, K., Birajdar, M., Kim, B. S., Bae, H., Lee, C. C., Kim, Y. J., ... Lee, J. (2014). Recent application developments of water-soluble synthetic polymers. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 20(6), 3913–3918. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2014.01.006>
- Hamidi, M., Azadi, A., & Rafiei, P. (2008). Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(15), 1638–1649. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.08.002>

- Harish Prashanth, K., Kittur, F.S., & Tharanathan, R.N. (2002). Solid state structure of chitosan prepared under different N-deacetylating conditions. *Carbohydrate Polymers*, 50(1), 27–33. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(01\)00371-X](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(01)00371-X)
- Heidari, F., Razavi, M., Bahrololoom, M. E., Tahriri, M., Rasoulboroujeni, M., Koturi, H., & Tayebi, L. (2018). Preparation of natural chitosan from shrimp shell with different deacetylation degree. *Materials Research Innovations*, 22(3), 177–181. <https://doi.org/10.1080/14328917.2016.1271591>
- Hernández-Cocoletzi, H., Águila-Almanza, E., Flores-Agustin, O., Viveros-Nava, E. L., & Ramos-Cassellis, E. (2009). Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. *Superficies y Vacío*, 22(3), 57–60.
- Huang, C. Y., Kuo, C. H., Wu, C. H., Ku, M. W., & Chen, P. W. (2018). Extraction of crude chitosans from squid (*Illex argentinus*) pen by a compressional puffing-pretreatment process and evaluation of their antibacterial activity. *Food Chemistry*, 254, 217–223. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.018>
- Huggins, M. L. (1942). The Viscosity of Dilute Solutions of Long-Chain Molecules. IV. Dependence on Concentration. *Journal of the American Chemical Society*, 64(11), 2716–2718.
- Illum, L., Jabbar-Gill, I., Hinchcliffe, M., Fisher, A. N., & Davis, S. S. (2001). Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 51(1–3), 81–96. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00171-5](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00171-5)
- Instanano. (2020). XRD Crystallite Size Calculator (Scherrer Equation). Retrieved August 20, 2020, from <https://www.instanano.com/2017/01/xrd-crystallite-size-calculator-scherrer-equation.html>
- Islam, S., Bhuiyan, M. A. R., & Islam, M. N. (2017). Chitin and Chitosan: Structure, Properties and Applications in Biomedical Engineering. *Journal of Polymers and the Environment*, 25(3), 854–866. <https://doi.org/10.1007/s10924-016-0865-5>
- Jayakumar, R., Prabakaran, M., Sudheesh Kumar, P. T., Nair, S. V., & Tamura, H. (2011). Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnology Advances*, 29(3), 322–337. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.01.005>
- Kamath, K.R., & Park, K. (1993). Biodegradable hydrogels in drug delivery. *Advanced* –84. [https://doi.org/10.1016/0169-409X\(93\)90027-2](https://doi.org/10.1016/0169-409X(93)90027-2)
- Kariduraganavar, M. Y., Kittur, A. A., & Kamble, R. R. (2014). Polymer synthesis and processing. In *Natural and Synthetic Biomedical Polymers* (pp. 1–31). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396983-5.00001-6>
- Kasaai, M. R., Arul, J., & Charlet, G. (2013). Fragmentation of chitosan by acids. *The Scientific World Journal*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/508540>
- Kean, T., & Thanou, M. (2010). Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(1), 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.09.004>
- Kenawy, E.-R., Kamoun, E. A., Mohy Eldin, M. S., & El-Meligy, M.A. (2014). Physically crosslinked poly(vinyl alcohol)-hydroxyethyl starch blend hydrogel membranes: Synthesis and

- characterization for biomedical applications. *Arabian Journal of Chemistry*, 7(3), 372–380. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.05.026>
- Khan, F., & Tanaka, M. (2018). Designing smart biomaterials for tissue engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms19010017>
- Khan, T. A., Peh, K. K., & Ch'ng, H. S. (2000). Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences: A Publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Société Canadienne Des Sciences Pharmaceutiques*, 3(3), 303–311.
- Kim, G. M. (2010). Fabrication of bio-nanocomposite nanofibers mimicking the mineralized hard tissues via electrospinning process. *Nanofibers*, 69-88.
- Kittur, F. S., Harish Prashanth, K. V., Udaya Sankar, K., & Tharanathan, R. N. (2002). Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry. *Carbohydrate Polymers*, 49(2), 185–193. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(01\)00320-4](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(01)00320-4)
- Koczkur, K. M., Mourdikoudis, S., Polavarapu, L., & Skrabalak, S. E. (2015). Polyvinylpyrrolidone (PVP) in nanoparticle synthesis. *Dalton Transactions*, 44(41), 17883–17905. <https://doi.org/10.1039/c5dt02964c>
- Kramer, E. O. (1938). Molecular weight of celluloses and cellulose derivates. *Molecular Weight of Celluloses and Cellulose Derivates*, 30, 1200–1203.
- Kulikov, S., Tikhonov, V., Blagodatskikh, I., Bezrodnikh, E., Lopatin, S., Khairullin, R., ... Abramchuk, S. (2012). Molecular weight and pH aspects of the efficacy of oligochitosan against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 545–550. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.017>
- Kumar, S., Koh, J., Tiwari, D. K., & Dutta, P. K. (2011). Optical study of chitosan-ofloxacin complex for biomedical applications. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*, 48(10), 789–795. <https://doi.org/10.1080/10601325.2011.603623>
- Kurakula, M., & Rao, G. K. (2020). Pharmaceutical assessment of polyvinylpyrrolidone (PVP): As excipient from conventional to controlled delivery systems with a spotlight on COVID-19 inhibition. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 60, 102046. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102046>
- Lamarra, J., Rivero, S., & Pinotti, A. (2016). Design of chitosan-based nanoparticles functionalized with gallic acid. *Materials Science and Engineering C*, 67, 717–726. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.05.072>
- Lamarra, Javier Andrés. (2019). *Matrices biodegradables como soportes de micro y nanopartículas activas para su aplicación como sistemas de liberación controlada*. Universidad Nacional de la Plata. Retrieved from <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/75093>
- Liu, H., Zhang, B., Shi, H., Tang, Y., Jiao, K., & Fu, X. (2008). Hydrothermal synthesis of monodisperse Ag₂Se nanoparticles in the presence of PVP and KI and their application as oligonucleotide labels. *Journal of Materials Chemistry*, 18(22), 2573–2580.

<https://doi.org/10.1039/b719207j>

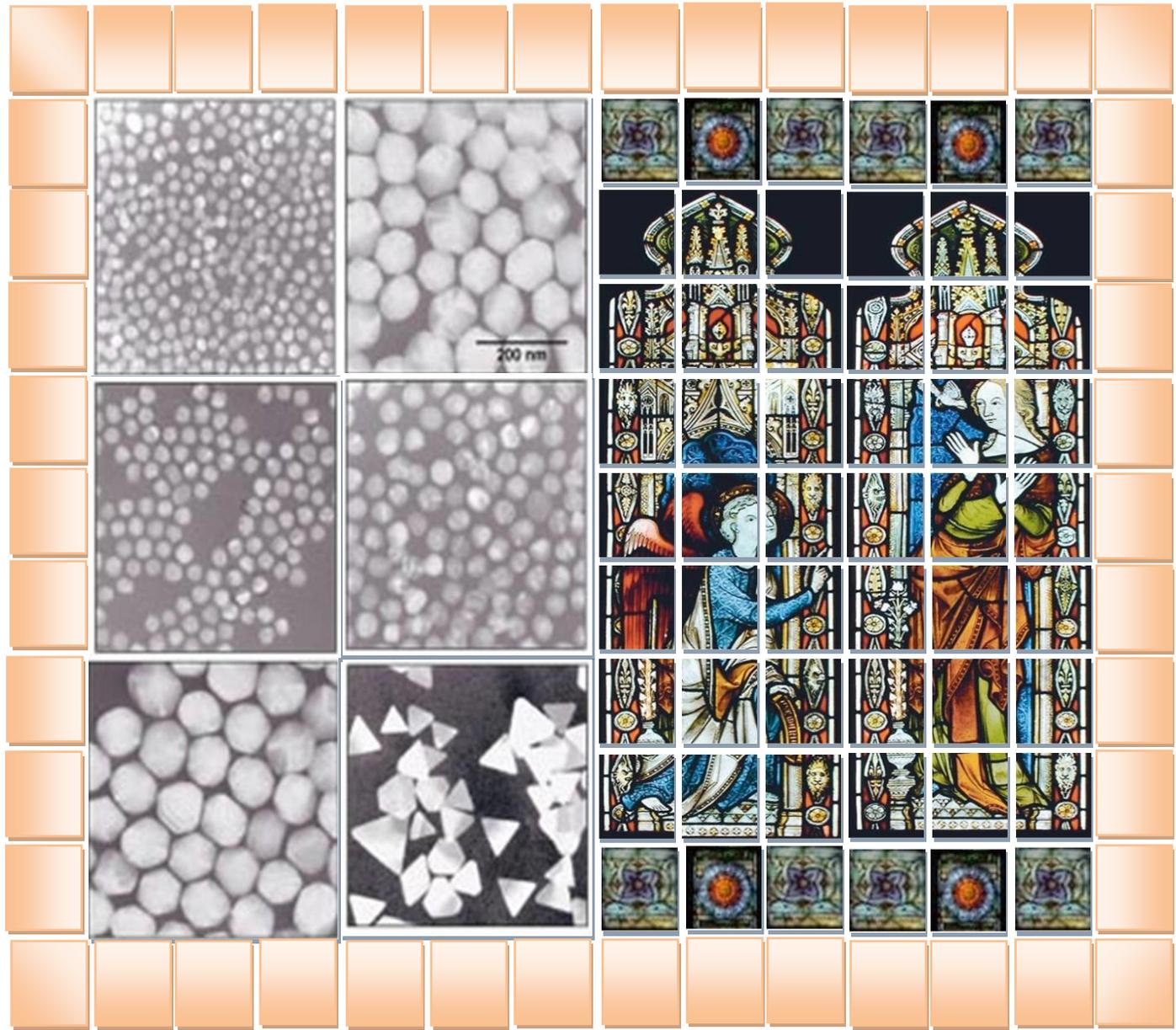
- Llópez Yurell, J., Fernández, G., Paneque, A., Nieto, O., Fernández, M., & Hidalgo, C. (2009). Estudio de quitosanos cubanos derivados de la quitina de la langosta. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 10(1), 11–27.
- Lv, S. H. (2016). High-performance superplasticizer based on chitosan. *Biopolymers and Biotech Admixtures for Eco-Efficient Construction Materials*, 131–150. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100214-8.00007-5>
- Majeti N.V. Ravi Kumar. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46(1), 1–27. [https://doi.org/10.1016/s1381-5148\(00\)00038-9](https://doi.org/10.1016/s1381-5148(00)00038-9)
- Mansur, H. S., Sadahira, C. M., Souza, A. N., & Mansur, A.A.P. (2008). FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde. *Materials Science and Engineering: C*, 28(4), 539–548. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2007.10.088>
- Mengibar, M., Mateos-Aparicio, I., Miralles, B., & Heras, Á. (2013). Influence of the physico-chemical characteristics of chito-oligosaccharides (COS) on antioxidant activity. *Carbohydrate Polymers*, 97(2), 776–782. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.05.035>
- Morandim-Giannetti, A. de A., Rubio, S. R., Nogueira, R. F., Ortega, F. dos S., Magalhães Junior, O., Schor, P., & Bersanetti, P. A. (2018). Characterization of PVA/glutaraldehyde hydrogels obtained using Central Composite Rotatable Design (CCRD). *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 106(4), 1558–1566. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33958>
- Morgado, P. I., Lisboa, P. F., Ribeiro, M. P., Miguel, S. P., Simões, P. C., Correia, I. J., & Aguiar-Ricardo, A. (2014). Poly (vinyl alcohol)/chitosan asymmetrical membranes: Highly controlled morphology toward the ideal wound dressing. *Journal of membrane science*, 469, 262–271. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2014.06.035>
- Nagpal, M., Maheshwari, D., Rakha, P., Dureja, H., Goyal, S., & Dhingra, G. (2012). Formulation development and evaluation of alginate microspheres of ibuprofen. *Journal of Young Pharmacists*, 4(1), 13–16. <https://doi.org/10.4103/0975-1483.93573>
- Nedra, D., Jayalal, R. G. U., & Karunaratne, V. (2012). Lichen Polysaccharides. *The Complex World of Polysaccharides*, (2001). <https://doi.org/10.5772/51021>
- Neto, C. G. T., Giacometti, J. A., Job, A. E., Ferreira, F. C., Fonseca, J. L. C., & Pereira, M. R. (2005). Thermal analysis of chitosan based networks. *Carbohydrate Polymers*, 62(2), 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.02.022>
- Oyervides-Muñoz, E., Pollet, E., Ulrich, G., de Jesús Sosa-Santillán, G., & Avérous, L. (2017). Original method for synthesis of chitosan-based antimicrobial agent by quaternary ammonium grafting. *Carbohydrate Polymers*, 157, 1922–1932. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.11.081>
- Park, S. Il, & Zhao, Y. (2004). Incorporation of a High Concentration of Mineral or Vitamin into Chitosan-Based Films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(7), 1933–1939. <https://doi.org/10.1021/jf034612p>

- Park, S. Y., Marsh, K. S., & Rhim, J. W. (2002). Characteristics of different molecular weight chitosan films affected by the type of organic solvents. *Journal of Food Science*, 67(1), 194–197. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb11382.x>
- Peniche, C., Argüelles-Monal, W., Peniche, H., & Acosta, N. (2003). Chitosan: An Attractive Biocompatible Polymer for Microencapsulation. *Macromolecular Bioscience*, 3(10), 511–520. <https://doi.org/10.1002/mabi.200300019>
- Pillai, C. K. S., Paul, W., & Sharma, C. P. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 34(7), 641–678. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2009.04.001>
- Rahmaninia, M., Rohi, M., Hubbe, M. A., Zabihzadeh, S. M., & Ramezani, O. (2018). The performance of chitosan with bentonite microparticles as wet-end additive system for paper reinforcement. *Carbohydrate Polymers*, 179, 328–332. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.09.036>
- Raimi-Abraham, B. T., Mahalingam, S., Edirisinghe, M., & Craig, D. Q. M. (2014). Generation of poly(N-vinylpyrrolidone) nanofibres using pressurised gyration. *Materials Science and Engineering C*, 39(1), 168–176. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.02.016>
- Ramírez, C. A., Delgado, E., & Andrade, A. (2016). Determinación del grado de desacetilación de quitosana mediante titulación potenciométrica, FTIR y Raman. *Cim*, 4(October), 769–776. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/309493340>
- Ramírez Castro, A. M., Escobar Sierra, D. M., & Vergara Castrillón, N. A. (2013). Determinación de la relación entre el porcentaje del grupo amino y el grado de desacetilación del quitosano. *Revista de Ciencias*, 18(1), 73–88. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/rcien/v18n1/v18n1a06.pdf>
- Ricciardi, R., Auriemma, F., De Rosa, C., & Lauprêtre, F. (2004). X-ray diffraction analysis of poly (vinyl alcohol) hydrogels, obtained by freezing and thawing techniques. *Macromolecules*, 37(5), 1921–1927. <https://doi.org/10.1021/ma035663q>
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 31(7), 603–632. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>
- Rivero, S., Damonte, L., García, M. A., & Pinotti, A. (2016). An Insight into the Role of Glycerol in Chitosan Films. *Food Biophysics*, 11(2), 117–127. <https://doi.org/10.1007/s11483-015-9421-4>
- Rivero, S. (2012). *Estudio y aplicación de películas activas a base de quitosano* (2012th ed.). Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina. Retrieved from http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/35612/Documento_completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Selvam, S., & Sundrarajan, M. (2012). Functionalization of cotton fabric with PVP/ZnO nanoparticles for improved reactive dyeability and antibacterial activity. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 1419–1424. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.09.025>
- Singla, A. K., & Chawla, M. (2001). Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects - an update. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53(8), 1047–1067.

<https://doi.org/10.1211/0022357011776441>

- Smith, J., Wood, E., & Dornish, M. (2004). Effect of Chitosan on Epithelial Cell Tight Junctions. *Pharmaceutical Research*, 21(1), 43–49. <https://doi.org/10.1023/B:PHAM.0000012150.60180.e3>
- Teodorescu, M., & Bercea, M. (2015). Poly(vinylpyrrolidone) – A Versatile Polymer for Biomedical and Beyond Medical Applications. *Polymer - Plastics Technology and Engineering*, 54(9), 923–943. <https://doi.org/10.1080/03602559.2014.979506>
- Tian, M., Tan, H., Li, H., & You, C. (2015). Molecular weight dependence of structure and properties of chitosan oligomers. *RSC Advances*, 5(85), 69445–69452. <https://doi.org/10.1039/c5ra08358c>
- Teodorescu, M., Bercea, M., & Morariu, S. (2019). Biomaterials of PVA and PVP in medical and pharmaceutical applications: Perspectives and challenges. *Biotechnology Advances*, 37(1), 109–131. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.008>
- Teramoto, N., Saitoh, M., Kuroiwa, J., Shibata, M., & Yosomiya, R. (2001). Morphology and mechanical properties of pullulan/ poly(vinyl alcohol) blends crosslinked with glyoxal. *Journal of Applied Polymer Science*, 82(9), 2273–2280. <https://doi.org/10.1002/app.2075>
- Tian, M., Tan, H., Li, H., & You, C. (2015). Molecular weight dependence of structure and properties of chitosan oligomers. *RSC Advances*, 5(85), 69445–69452. <https://doi.org/10.1039/c5ra08358c>
- Tsai, G. J., Su, W. H., Chen, H. C., & Pan, C. L. (2002). Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation. *Fisheries Science*, 68(1), 170–177. <https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2002.00404.x>
- Tsai, G. J., Zhang, S. L., & Shieh, P. L. (2004). Antimicrobial Activity of a Low-Molecular-Weight Chitosan Obtained from Cellulase Digestion of Chitosan. *Journal of Food Protection*, 67(2), 396–398. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.2.396>
- Tsaih, M. L., & Chen, R. H. (2003). The effect of reaction time and temperature during heterogenous alkali deacetylation on degree of deacetylation and molecular weight of resulting chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*, 88(13), 2917–2923. <https://doi.org/10.1002/app.11986>
- VandeVord, P. J., Matthew, H. W. T., DeSilva, S. P., Mayton, L., Wu, B., & Wooley, P. H. (2002). Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice. *Journal of Biomedical Materials Research*, 59(3), 585–590. <https://doi.org/10.1002/jbm.1270>
- WHO Technical Report Series 751, FAO/WHO Report No. 30, 1987.j.saa.2014.06.071
- Xia, W., Liu, P., Zhang, J., & Chen, J. (2011). Biological activities of chitosan and chito oligo saccharides. *Food Hydrocolloids*, 25(2), 170–179. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.03.003>
- Yokoyama, F., Masada, I., Shimamura, K., Ikawa, T., & Monobe, K. (1986). Morphology and structure of highly elastic poly(vinyl alcohol) hydrogel prepared by repeated freezing-and-melting. *Colloid & Polymer Science*, 264(7), 595–601. <https://doi.org/10.1007/BF01412597>
- Yoksan, R., Jirawutthiwongchai, J., & Arpo, K. (2010). Encapsulation of ascorbyl palmitate in

- chitosan nanoparticles by oil-in-water emulsion and ionic gelation processes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 76(1), 292–297. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.11.007>
- Zabska, M., Jaskiewicz, K., Kiersnowski, A., Szustakiewicz, K., Rathgeber, S., & Piglowski, J. (2011). Spontaneous exfoliation and self-assembly phenomena in polyvinylpyrrolidone/synthetic layered silicate nanocomposites. *Radiation Physics and Chemistry*, 80(10), 1125–1128. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2011.02.019>
- Zaharoff, D. A., Rogers, C. J., Hance, K. W., Schlom, J., & Greiner, J. W. (2007). Chitosan solution enhances the immunoadjuvant properties of GM-CSF. *Vaccine*, 25(52), 8673–8686. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.10.037>
- Zajac, A., Hanuza, J., Wandas, M., & Dymińska, L. (2015). Determination of N-acetylation degree in chitosan using Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 134, 114–120. <https://doi.org/10.1016/>
- Zhi, X., Fang, H., Bao, C., Shen, G., Zhang, J., Wang, K., Guo, S., Wan, T., & Cui, D. (2013). The immuno toxicity of graphene oxides and the effect of PVP-coating. *Biomaterials*, 34(21), 5254–5261. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.03.024>
- 21CFR173.55, CFR - code of federal regulations title 21. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=173.55>, 2019 accessed June 18, 2020



Capítulo 2

Nanocompuestos a base de quitosano y NpAg

2.1 INTRODUCCIÓN

2.1.1 Nanopartículas de Ag

La investigación en el campo de la nanotecnología ha revelado un enorme potencial para la ciencia, la ingeniería, y la tecnología. Ha permitido desarrollar nuevos materiales con diferentes tamaños, formas y estructuras, confiriendo control sobre sus propiedades físicas y químicas. La nanotecnología ha encontrado numerosas aplicaciones en diferentes ramas de la ciencia e ingeniería, incluyendo: biomedicina, la agricultura y la producción de alimentos, patentes industriales y medio ambiente (Ortiz-Castillo y col., 2020).

La modificación de las propiedades de la superficie, en particular la reducción del tamaño de las partículas, ha surgido como un enfoque para desarrollar nanomateriales con propiedades diferenciadas del material a granel.

Dentro de las nanopartículas metálicas, las nanopartículas de plata (NpAg) han sido objeto de numerosos estudios en el marco de la investigación de materiales. Las NpAg han demostrado tener una versátil capacidad de solucionar problemas relacionados con la salud e higiene, debido principalmente a sus propiedades antimicrobianas siendo esta aplicación la más explorada.

Entre las múltiples aplicaciones de NpAg se destacan diferentes sectores:

- Farmacéutico: uso en la formulación de productos de cuidado dermatológico (Gajbhiye y Sakharwade, 2016; Some y col., 2018).
- Agronómico: control biológico de diferentes plagas como el *fusarium* (Ahmad y col., 2016; Some y col., 2018; Strayer y col., 2016).
- Medio ambiente: remoción de compuestos contaminantes como pesticidas (Manimegalai y col., 2014; Some y col., 2018).
- Inocuidad alimentaria: control de crecimiento bacteriano (Bagherzade y col., 2017; Jayaramudu y col., 2017; Some y col., 2018), elaboración de materiales activos para el envasado de alimentos (Kraśniewska y col., 2020).

Capítulo 2 Nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de plata

- Salud: tratamiento de terapias anti-virales contra el VIH-1 (Elechiguerra y col., 2005) y el virus de la gripe (Pulit-Prociak y Banach, 2016), propiedades antiinflamatorias y anticancerígenas (Some y col., 2018).

Las NpAg tienen mayor aplicación comercial en comparación con otras nanopartículas como las de oro (Wei y col., 2015; Faried y col., 2016) en diseño de biosensores (Ahamed y col., 2010), producción de materiales en control ambiental (Hussain y col., 2011), catálisis, entre otros.

El tamaño, la estructura y las propiedades físicas, químicas y biológicas de las NpAg dependen del método de síntesis (Nair y Laurencin, 2007), existiendo una gran variedad de formas de obtención, métodos físicos, químicos y verdes (Figura 2.1).

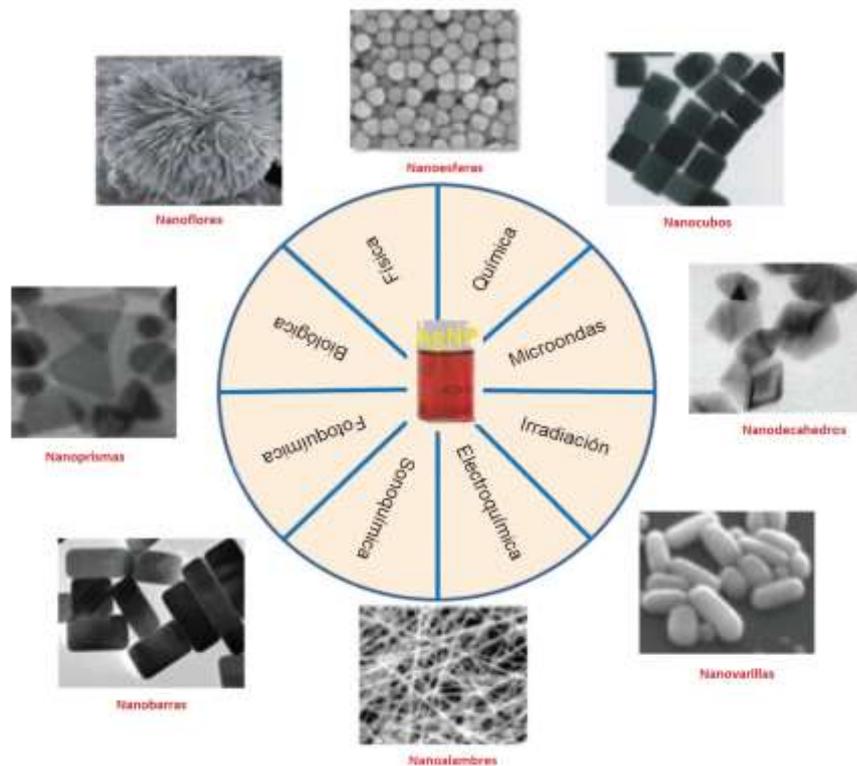


Figura 2.1. Métodos de obtención de nanopartículas de plata. Adaptado de Mukherji y col. (2018).

2.1.2 Síntesis verde de NpAg

La síntesis *verde* para la obtención de NpAg comprende procesos físico-químicos que se realizan usando una serie de metodologías en las cuales el producto final posee características eco-compatibles sin el empleo de agentes reductores tóxicos (Wei y col., 2015). En estos procesos se usan agentes bioreductores y estabilizantes como consorcios microbianos, extractos de origen fitoquímico y micológico, biomasa vegetal, péptidos, proteínas y polímeros biodegradables (Ramanathan y Gopinath, 2017; Alves y col., 2019).

La denominación *verde* de NpAg se debe a la presencia de un gran número de compuestos químicos orgánicos como carbohidratos, lípidos, proteínas, enzimas y coenzimas, fenoles flavonoides, terpenoides, alcaloides, gomas, entre otros. Todos estos compuestos son capaces de donar electrones para la reducción de iones Ag^+ a Ag^0 (Srikary col., 2016). En el caso de los extractos vegetales y bacterianos es común que el poder reductor sea generado por la deshidrogenación de los ácidos orgánicos como el ácido ascórbico, alcoholes como el catecol y por la conversión ceto/enol (Jha y col., 2009; Srikar y col., 2016).

Síntesis usando biopolímeros

En el enfoque *bottom-up*, dos fases principales de la reacción completan la formación de NpAg: nucleación y crecimiento de Np a través de procesos de coagulación y coalescencia. Durante la síntesis de Np, la agregación a través de la maduración Ostwald o aglomeración con el tiempo es un fenómeno espontáneo ya que reduce la relación superficie/ volumen. Para sintetizar nanopartículas de tamaño controlado, un desafío clave es superar la gran energía superficial de las Np y resistir la agregación (Harada y Katagiri, 2010; Thanh y col., 2014). La naturaleza de la formulación y varios parámetros del proceso, tales como temperatura, tiempo de reacción, presión y grado de mezcla se puede optimizar para controlar el crecimiento de las nanopartículas. La formulación típica contiene diversos productos químicos que sirven como sal precursora, agente reductor y agente estabilizante. La reducción química (Agnihotri y col., 2014; Song y col., 2009; van Dong y col., 2012) normalmente es facilitada por calentamiento. La sal precursora más utilizada es nitrato de plata (AgNO_3) (Shirtcliffe y col., 1999), mientras que poliol

Capítulo 2 Nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de plata

(etilenglicol, EG) (Sun y Xia, 2002), o citrato de sodio (TSC) (Caswell y col., 2003) se utilizan con frecuencia como agentes reductores.

En general, la formación de núcleos se logra mediante la reducción de la sal precursora del metal por el agente reductor. Esto puede ser alcanzado directamente por el agente reductor o el proceso puede ser asistido por el suministro de energía en diversas formas, incluyendo calentamiento convencional, por microondas o energía lumínica. En la síntesis de Np, el tamaño y la agregación se controlan mediante la estabilización debida a la repulsión estérica o electrostática de las nanopartículas formadas. En el caso de la estabilización basada en las cargas, las fuerzas de repulsión debidas a la carga superficial de las nanopartículas deben superar las fuerzas de corto alcance como las Van der Waals que causan la agregación. La estabilización electrostática se logra generalmente a través de especies aniónicas como citrato, halogenuros, o carboxilatos que adsorben o interactúan con las NpAg para impartir una carga negativa en la superficie. La carga superficial produce una doble capa eléctrica que resulta en una repulsión coulombica entre las nanopartículas. La estabilización estérica se puede lograr mediante la interacción de Np con grupos voluminosos, tales como polímeros orgánicos y catión alquilamonio que impiden la agregación mediante repulsión estérica (Abou y col., 2010).

La adición de estabilizantes o tensoactivos también puede facilitar el crecimiento dirigido de las Np (Mukherji y col., 2018). En cambio, la dispersión depende de la fuerza iónica y de otras condiciones de la solución (Handy y col., 2008; Fabrega y col., 2011).

Por estas razones, es frecuente que para la estabilización de las cargas sea necesario agregar agentes estabilizantes. Estos compuestos de naturaleza orgánica no deben ser tóxicos (Bar y col., 2009; Fabrega y col., 2011). Una alternativa es el uso de polímeros sintéticos y/o naturales, entre los cuales se puede mencionar el alcohol polivinílico (PVA), la polivinilpirrolidona (PVP) y la policaprolactona (PCL). El uso de estos polímeros en la obtención de NpAg permite que las mismas puedan tener aplicaciones biomédicas (Alavi y Rai, 2019b; Dhote y col., 2018; Rolim y col., 2019; Tamayo y col., 2018). Los biopolímeros usados como la celulosa, quitosano, alginato de sodio, ácido poliláctico (PLA) y colágeno poseen alta biocompatibilidad y biodegradabilidad (Alavi y Rai, 2019; Hu y col., 2019).

Capítulo 2 Nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de plata

En el caso del quitosano, las reacciones se llevan a cabo *in situ* y los grupos funcionales como los alcoholes tienden a oxidarse en el proceso siendo estos los agentes reductores (Muñoz-Bonilla y col., 2019; Venkatesham y col., 2012). Existen diferentes metodologías en la obtención de NpAg a partir de quitosano, desde el uso de condiciones de altas temperaturas y presiones por medio de autoclaves (Muñoz-Bonilla y col., 2019; Wong y col., 2020), hasta la simple incubación de la mezcla de quitosano con la solución de AgNO₃ a altas temperaturas (100°C).

Zain y col. (2014) usaron ácido acético en la formulación para la obtención de las NpAg; la mezcla de reacción se usó en condiciones básicas. La desventaja de esta metodología es que como consecuencia del cambio de pH se produce la precipitación del quitosano debido a su pK_a. Para la generación de una matriz activa, se debe resuspender el producto de reacción en condiciones ácidas, generando una serie de etapas que pueden llegar a perjudicar la estabilidad de las NpAg. Por las consideraciones expuestas, la síntesis *in situ* de NpAg a partir de soluciones de Q teniendo en cuenta las características entrecruzantes que pueden generarse entre la red polimérica y las NpAg formadas como consecuencia de la oxidación de los grupos funcionales del biopolímero es una buena alternativa. Estas condiciones pueden estabilizar las NpAg formadas además de permitir la formulación de materiales activos a partir de las soluciones filmogénicas de quitosano con incorporación de NpAg.

2.1.3 Formulación de nanocompuestos

Es bien sabido que las nanopartículas tienden a formar aglomerados y por otro lado, la aplicación de nanopartículas aisladas podría dar lugar a problemas de seguridad. Una de las estrategias para la administración de nanopartículas como tratamiento antimicrobiano podría ser a través de un vehículo, siendo las películas poliméricas los materiales más utilizados (Muñoz-Escobar y Reyes-López, 2020).

Las matrices nanocompuestas son una nueva generación de materiales con una combinación de polímeros de base biológica y rellenos que tienen al menos una dimensión a escala nanométrica (Jamróz y col., 2019). Los nanocompuestos consisten en una matriz polimérica (fase continua) y un relleno (fase discontinua), donde al menos una dimensión es <100 nm. La dimensión nanométrica y el tipo de nanopartículas

Capítulo 2 Nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de plata

proporcionan un efecto sinérgico al material, mejorando las propiedades resultantes de los nanocompuestos en comparación con los de la matriz (Paul y Robeson, 2008; Chivrac y col., 2009). Los nanorefuerzos son únicos en el sentido de que no afectan la naturaleza de la matriz polimérica. Solo se incorporan un pequeño porcentaje de estos nanomateriales (0.5-5%) en el polímero y la mejora es significativa debido a la gran área superficial (Pettersson y Oksman, 2006). En las matrices de nanocompuestos, el biopolímero actúa como una matriz, mientras que los nanopartículas se dispersan para mejorar las propiedades funcionales (Jamróz y col., 2019).

Muchos estudios han considerado el refuerzo de una matriz biopolimérica usando nanopartículas, generando matrices compuestas y mejorando las propiedades funcionales de los materiales (Kraśniewska y col., 2020; Kraśniewska y col., 2019; Zambrano-Zaragoza y col., 2018).

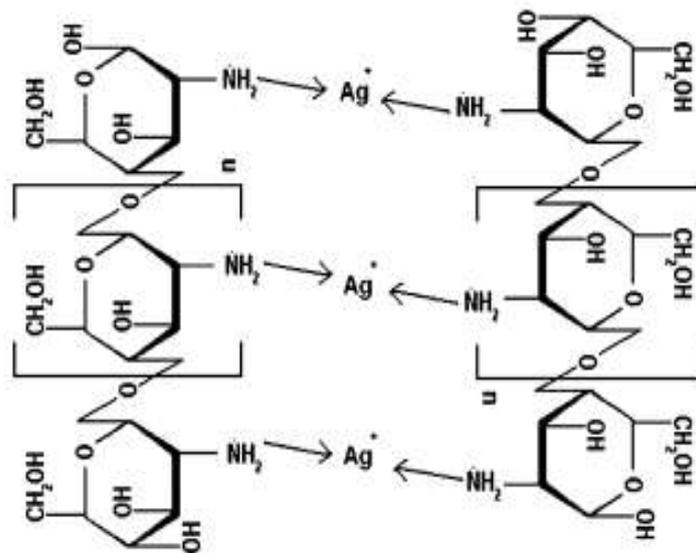


Figura 2.2. Esquema mostrando las propiedades quelantes de la cadena de quitosano por iones plata. Adaptado de Thomas y col. (2009).

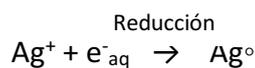
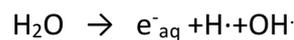
El uso de nanopartículas de Ag en la industria alimentaria extiende la vida útil de los productos al prevenir el crecimiento de microorganismos alteradores y la aparición de microflora patógena (Kraśniewska y col., 2019; Mihindikulasuriya y Lim, 2014; Liao y col., 2019). Varios investigadores (Regiely col., 2013; Youssefy col., 2015) han formulado

Capítulo 2 Nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de plata

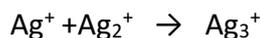
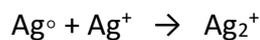
matrices de Q con el agregado de NpAg. Estas películas activas resultaron eficientes para la reducción de microorganismos como *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhimurium*, *B. cereus* y *Listeria monocytogenes*. Además se observó que mejoraron las propiedades estructurales y mecánicas de las matrices con el agregado de NpAg y se redujo la solubilidad.

Un enfoque simple para la formación de nanopartículas *in situ* consiste en el uso de quitosano para luego obtener películas dado que es un polímero quelante con capacidad de adsorción para una serie de iones metálicos debido a los grupos amino (-NH₂) e hidroxilo (-OH) en su estructura. Esta acción quelante del quitosano por el ión plata se puede representar en forma esquemática en la [Figura 2.2](#). Con los electrones del nitrógeno, los grupos amino sirven como ligandos o sitios de unión para los iones metálicos formando complejos.

Dos sitios de coordinación de la plata están ocupados por pares de electrones de grupos -NH₂ de dos cadenas diferentes de quitosano. Dado que el quitosano es un polímero semirrígido, es poco probable que los dos grupos -NH₂ coordinados con iones plata estén en la misma cadena de quitosano debido al impedimento estérico. La solución acuosa de quitosano es sometida a un calentamiento que a su vez reduce los iones plata a nanopartículas de plata con formación de átomos de hidrógeno como se muestra a continuación



El átomo neutro reacciona con los iones Ag⁺ para formar *clusters* estabilizados de Ag



Estos grupos pueden unirse y formar nanopartículas más grandes pero el quitosano entra en juego y estabiliza las nanopartículas de plata, previniendo la aglomeración. Varios investigadores han usado esta característica para reducir sales metálicas ([Hardy y col., 2004](#); [Sanpui y col., 2008](#)).

Capítulo 2 Nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de plata

En la síntesis se observa que el quitosano en polvo o en condiciones de pH neutro no reacciona con AgNO_3 debido a que sus cadenas laterales se encuentran desprotonadas y consecuentemente factores como la solubilidad y la interacción con solventes acuosos se ven afectados. En presencia de un pH bajo y a una temperatura elevada, se puede observar la reducción de Ag^+ a Ag^0 , con el quitosano actuando como agente reductor y como estabilizante de las NpAg producidas.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo general

Formular nanocompuestos mediante la síntesis *verde* de nanopartículas de plata *in situ* en una matriz de quitosano usado como agente estabilizante y agente reductor.

2.2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar las nanopartículas de plata obtenidas *in situ*
- Desarrollar matrices nanocompuestas a base quitosano con diferentes concentraciones de nanopartículas de plata (NpAg)
- Estudiar las propiedades fisicoquímicas, mecánicas y de barrera de los nanocompuestos desarrollados
- Analizar la influencia de las relaciones Q:NpAg (QAg₁, QAg₂, QAg₃ y QAg₄) sobre las propiedades térmicas mediante DSC, DMA y TGA y las propiedades microestructurales de las películas a través de las técnicas de ATR-FTIR, DRX, SEM

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1 Síntesis de nanopartículas de plata

Para las síntesis de las nanopartículas (NpAg) *in situ*, nitrato de plata 30 mM (PM_{NO_3Ag} : 170 g mol^{-1} , PM_{Ag} : 107 g mol^{-1}) se solubilizó en una solución de quitosano al 1% para obtener diferentes concentraciones, y se llevó a estufa a 95°C durante 6 horas (Figura 2.3).



Figura 2.3. Esquema de síntesis verde *in situ* de nanopartículas de plata a partir de $AgNO_3$ y quitosano como agente reductor.

2.3.2 Caracterización de las nanopartículas

Las nanopartículas de plata se caracterizaron empleando diferentes métodos, UV-Visible, DLS, TEM y SEM combinado con EDS, fluorescencia y DRX.

Para las medidas de absorbancia entre 200 y 700 nm se utilizó un lector de placas UV-VIS (Biotek, modelo Synergy HT) que permitió detectar la banda correspondiente al plasmón de superficie de las nanopartículas.

Capítulo 2 Nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de plata

La observación microscópica de la morfología de las partículas se llevó a cabo mediante un microscopio electrónico SEM FEI QUANTA 200 (Países Bajos) en combinación con un análisis de rayos X de energía dispersiva (EDS), utilizado para dar información sobre la composición química de las muestras. Las muestras se montaron en tacos de bronce utilizando una cinta doble faz y se examinaron con un recubrimiento de oro a alta presión y un voltaje de aceleración de 12.5 kV.

Las características morfológicas de las nanopartículas se analizaron utilizando un microscopio electrónico de transmisión (JEM 1200EX II Jeol, Japón) equipado con una cámara digital (ES500W Erlangshen CCD Gatan). Brevemente, se colocó una gota de la suspensión en una rejilla de cobre pretratada y recubierta con una fina película de carbono amorfo. El exceso de la solución se eliminó con un papel de filtro y se secó a temperatura ambiente. La distribución de los tamaños de las nanopartículas se obtuvo a través del análisis de las fotografías por medio de los programas Image J y Origin.

El tamaño hidrodinámico medio y el potencial zeta (PZ) de las nanopartículas, suspendidas en agua de grado Milli-Q fueron determinados por un Zetasizer Nano-ZS Malvern Instruments (Worcestershire, Inglaterra) equipado con un correlador digital Modelo ZEN3600. El PZ y el diámetro de la partícula se informaron como el promedio de cinco determinaciones por muestra. Las pruebas se realizaron por triplicado.

Los espectros de fluorescencia de las suspensiones de nanopartículas se registraron a temperatura ambiente con un espectrofluorómetro Perkin-Elmer LS-50B (Beaconsfield, Inglaterra) provisto de una lámpara pulsada de xenón como fuente de excitación (ancho de pulso $<10 \mu\text{s}$, 60 Hz) y un fotomultiplicador R928. El instrumento se encuentra conectado a una PC para el almacenamiento y tratamiento de datos a través del software FL Winlab.

Para la obtención de los patrones de difracción de rayos X de las nanopartículas en polvo y de las películas se usó un equipo X'Pert Pro P Analytical Model PW 3040/60 (Holanda). Los ensayos se realizaron entre $4\text{-}100^\circ$ (2θ) con un paso de 0.04° , una diferencia de potencial de 40 kV y una densidad de corriente de 30mA utilizando la línea $\text{Cu K}\alpha$ (1.542 \AA).

2.3.3 Obtención de los nanocompuestos

Una vez sintetizadas las NpAg, las suspensiones se mezclaron con la solución de quitosano en distintas proporciones como se puede observar en la [Tabla 2.1](#). Luego de formuladas las suspensiones filmogénicas, las mismas se extendieron en moldes y se secaron en estufa a 37°C hasta alcanzar peso constante. Las películas nanocompuestas con distintas proporciones de nanopartículas se denominaron QAg_x, donde x=1,2,3,4.

Tabla 2.1. Formulación de las suspensiones expresando la concentración de NpAg en g/ 100 g de Q (p/p) y en g/ 100 ml de solución de quitosano 1% (p/v)

Formulación	Concentración de NpAg	
	% (p/p _Q)	% (p/v)
Q	0	0
QAg ₁	2.91	0.029
QAg ₂	5.33	0.053
QAg ₃	7.38	0.074
QAg ₄	9.14	0.093

2.3.4 Caracterización de las películas nanocompuestas a base de quitosano

Las películas nanocompuestas se caracterizaron mediante ensayos de tracción, ángulo de contacto, permeabilidad al vapor de agua y solubilidad. Asimismo, se analizaron desde el punto de vista térmico mediante DSC, DMA y TGA, microestructural empleando DRX y ATR-FTIR. Previo a la realización de los ensayos, las películas se acondicionaron a 20°C y 65% de HR durante 10 días.

Las medidas de los espesores de las muestras llevaron a cabo utilizando un medidor electrónico CheckLine 900 (EEUU) para materiales no conductores y sustratos no ferrosos. Los valores informados fueron el promedio de al menos 10 medidas.

El contenido de humedad de las películas se determinó midiendo el peso a tiempo inicial y luego de ser secadas en estufa a 105°C hasta peso constante. Las muestras se analizaron por triplicado, y los resultados obtenidos fueron expresados en porcentaje (g agua/100 g película).

Capítulo 2 Nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de plata

La permeabilidad al vapor de agua (WVP) se determinó usando una modificación de la norma ASTM E96 (Mali y col., 2002). Para realizar las determinaciones, las películas se colocaron en celdas de acrílico (Figura 2.1), las que se dispusieron en contenedores herméticos. El gradiente de 75% de HR a través de las películas se obtuvo colocando sílica gel anhidra en la celda (0% HR) y una solución saturada de NaCl en el contenedor (75% HR). La diferencia de presión parcial de vapor de agua existente a ambos lados de la película proporciona la fuerza impulsora para el flujo de vapor a través de la misma. Este gradiente corresponde a 1753.55 Pa, expresado como presión parcial de vapor de agua a 20°C. Se registró el cambio en el peso de la celda en una balanza analítica con una precisión de 0.0001g a intervalos regulares de tiempo. A partir de los ensayos se graficó la ganancia en peso de la celda en función del tiempo. Los datos se regresionaron linealmente y se calculó la permeabilidad al vapor de agua ($\text{g s}^{-1} \text{m}^{-1} \text{Pa}^{-1}$) considerando el espesor de las películas y la diferencia de presión parcial de vapor de agua.

Para determinar la solubilidad de las películas muestras de 3x3 cm se pesaron y colocaron en vasos de precipitado conteniendo 80 ml de agua destilada bajo agitación constante durante 1 hora a 20°C. Las piezas remanentes se extrajeron del agua, se secaron en estufa a $105 \pm 1^\circ\text{C}$ hasta alcanzar un peso constante. Los valores informados corresponden al promedio de tres ensayos.

La capacidad de hinchamiento de las películas fue medida por inmersión de piezas previamente pesadas en agua destilada durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, las muestras se extrajeron y se secaron superficialmente para remover el exceso de agua y se pesaron nuevamente. Las muestras fueron analizadas al menos por triplicado. El hinchamiento se calculó como:

$$\text{Hinchamiento (\%)} = \frac{w_i - w_f}{w_i} \times 100 \quad \text{Ec. 2.1}$$

donde, w_i es el peso inicial de los especímenes antes de estar en contacto con agua y w_f es el peso de las muestras después de 1 hora de contacto con agua.

El ángulo de contacto de las muestras se midió utilizando un goniómetro Rame-Hart modelo 500 (Rame-Hart Instruments Co., USA) a temperatura ambiente. Las películas se

Capítulo 2 Nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de plata

montaron sobre portaobjetos de vidrio 7.6 cm x 2.5 cm usando una cinta adhesiva bifaz. Para la determinación se colocó una gota de agua Mili-Q con una jeringa dispensadora sobre la superficie de la película y la morfología se registró con una cámara digital de alta definición. La medición del ángulo de contacto se realizó sobre al menos 8 gotas por película usando un software de análisis de imágenes (DROPIImageAdvanced v2.2).

El porcentaje de elongación y la máxima resistencia a la tracción de cada muestra se evaluaron utilizando un texturómetro TA.XT2i-Stable Micro Systems (Inglaterra). Las sondas de la película se estiraron con un sistema de sujeción por tensión A/TG a una velocidad constante de 0.5 mm s⁻¹. Se utilizó el software Texture Expert Exceed para registrar las curvas de fuerza (N) en función de la deformación (mm).

Los valores informados corresponden a la media aritmética de siete determinaciones individuales. Como señalan [Auras y col. \(2004\)](#) y [Siracusay col. \(2012\)](#), el área bajo esta curva, expresada en J, representa la tenacidad del material.

El ángulo de contacto se midió a temperatura ambiente con el goniómetro Ramé-Hart Model 500 (Ramé-Hart Instrument Co., EE.UU.). Se utilizaron gotas de agua de grado Milli-Q para determinar los ángulos de contacto en la superficie de la película, y la forma de la gota se registró con una cámara. Los ángulos de contacto de 10 gotas se realizaron mediante un software de análisis de imágenes (DROPIImage Advanced v2.2).

Los espectros ATR-FTIR de las películas y de nanocompuestos se adquirieron entre 4000 y 400 cm⁻¹ con una resolución espectral de 4 cm⁻¹ y 32 escaneos utilizando un Nicolet, iS10 Thermo Scientific (Madison, USA) en el modo de reflectancia total atenuada (accesorio Smart iTX). Para el procesamiento de datos se utilizó el software Omnic 8 (Thermo Scientific, Madison, USA).

Los análisis por DSC de las muestras se llevaron a cabo en un calorímetro diferencial de barrido (DSC Q100, TA Instruments, EEUU). Para el ensayo, muestras de películas (3-5mg) se colocaron en cápsulas de aluminio, las que se cerraron herméticamente. Como referencia se empleó una cápsula vacía. Los parámetros vinculados al proceso se determinaron con el Universal Analysis V1.7F software (TA Instruments). Los ensayos se realizaron bajo la forma modulada a una velocidad de calentamiento de 10°C min⁻¹ en un intervalo de temperaturas de -50 a 200°C. Luego de que el primer barrido fue

Capítulo 2 Nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de plata

completado, la muestra se enfrió hasta alcanzar una temperatura de -50°C . Posteriormente se registró una segunda corrida en el rango de temperaturas de -50° hasta 300°C .

Para hacer los ensayos de TGA se utilizó un equipo TG-DTA (Rigaku, EVO2) (Japón). El calentamiento de las muestras en cápsulas de aluminio se realizó a $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ desde temperatura ambiente hasta 700°C bajo atmósfera de aire (caudal 30 ml min^{-1}).

Los análisis dinámico-mecánicos se llevaron a cabo en un equipo DMA Q800 (TA Instruments, New Castle, EEUU) usando pinzas de tensión. Las películas se cortaron con una geometría rectangular (30 mm de largo, 6 mm de ancho). La temperatura varió entre 20 y 200°C a una velocidad de calentamiento de $5^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Las curvas del módulo de almacenamiento (E'), el módulo de pérdida (E'') y la $\text{Tan } \delta$ (E''/E') en función de la temperatura fueron registradas y analizadas utilizando el software Universal Análisis 2000.

Para evaluar las propiedades de barrera al UV, opacidad y transparencia, muestras de películas rectangulares fueron colocadas sobre placas de cultivo y para las medidas de absorbancia entre 200 y 700 nm se utilizó el lector de placas UV-VIS (Biotek, modelo Synergy HT). Los valores informados fueron la media aritmética de tres determinaciones.

El área bajo de la curva registrada, definida como la opacidad de la película, fue determinada por integración entre 400 y 700 nm (Villaruel y col., 2015). La opacidad fue informada en unidades de absorbancia por nanómetro. Asimismo, la transparencia de las películas fue calculada por el método descrito por Zhang y Han (2006) usando la relación entre la absorbancia a 600 nm y el espesor de las películas. Los resultados informados se expresaron como $A_{600}\text{ mm}^{-1}$. Las muestras fueron analizadas por triplicado. La barrera UV se determinó como el área bajo la curva registrada entre 200 y 400 nm .

Por otra parte, el color de las películas se midió mediante un colorímetro Minolta CR 400 Series (Osaka, Japón) calibrado con un estándar ($Y=93.2$; $x=0.3133$; $y =0.3192$). Se utilizó la escala CIELab midiendo la luminosidad (L) y las coordenadas cromáticas a^* (rojo-verde) y b^* (amarillo-azul).

2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.4.1 Caracterización de las nanopartículas

Análisis de las NpAg por espectroscopía UV-Visible

Diferentes concentraciones de nanopartículas de plata se sintetizaron usando una solución de quitosano al 1% (p/p) como agente reductor. La nomenclatura y la concentración % de nanopartículas de plata (p/p_Q) y (p/v) se enumeran en la [Tabla 2.1](#). La síntesis controlada de nanopartículas se basó en el enfoque de reducción usando un tratamiento térmico ([Figura 2.4](#)).



Figura 2.4. Ilustración esquemática del mecanismo de formación de nanopartículas de plata mostrando las etapas en función del tiempo. Adaptado de [Polte y col. \(2012\)](#).

La formación de NpAg a partir de AgNO₃ fue confirmada por análisis espectral UV-Visible. Las nanopartículas de plata tienen electrones libres, que dan lugar a las bandas de absorción de resonancia del plasmón superficial (SPR) ([Noginov y col., 2007](#)). La [Figura 2.3](#) muestra el espectro UV-Vis de la suspensión coloidal de nanopartículas de plata en la solución de quitosano. El progreso de la reacción fue monitoreado por espectroscopía UV-visible ([Figura 2.5](#)). El pico de resonancia del plasmón superficial se observó a 430 nm acompañado por el cambio de color de la suspensión de amarillo a marrón amarillento.

Capítulo 2 Nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de plata

De acuerdo a Rezazadeh y col. (2020) y Gahlawat y Choudhury (2019) la ausencia de picos en la región 470-700 nm indicó la falta de aglomeración de las NpAg y por ende la estabilidad de la suspensión.

La capacidad del quitosano para estabilizar las NpAg en el tiempo se evaluó durante tres meses en la oscuridad. Los espectros de los NpAg se mantuvieron completamente estables durante el almacenamiento, lo que indicó que no hubo cambios en la cantidad de nanopartículas de plata ni agregación (Gopinath y col, 2015). Los resultados sugirieron que el quitosano podría ser utilizado como agente estabilizante para las nanopartículas de plata. En este contexto, Kalaivani y col. (2018) reportaron que el quitosano protege las partículas de la aglomeración ya que los átomos de nitrógeno del grupo amino responsables de la absorción de Np por el mecanismo de quelación mantienen el doblete de electrones libres.

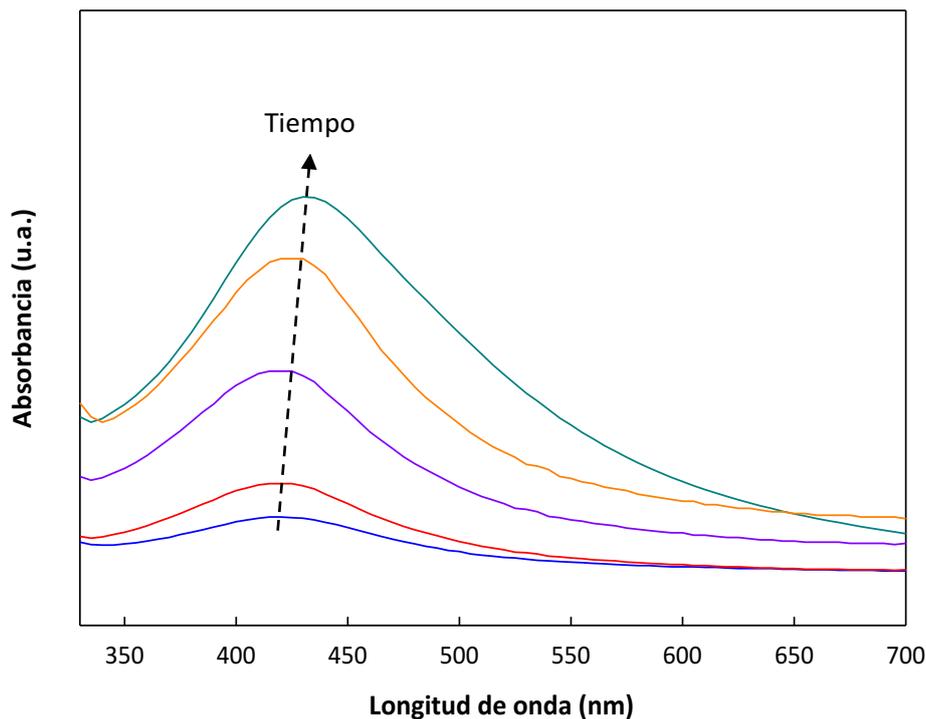


Figura 2.5. Espectro de absorción UV-Vis de nanopartículas de plata en una solución de quitosano en función del tiempo de calentamiento a 90°C.

Análisis por microscopía TEM y SEM

El tamaño de las NpAg se analizó mediante el programa Image J sobre micrografías obtenidas por microscopía TEM (Figura 2.6). En la Figura 2.6a se observa la presencia de nanopartículas en la suspensión de quitosano y en la Figura 2.6b las NpAg después de un proceso de separación por filtración. La distribución del tamaño de las partículas mostrada en el histograma (Figura 2.6c) exhibió valores en el rango 2-20 nm con un tamaño medio de 13 nm, soportando los resultados obtenidos por UV-Vis (Figura 2.3).

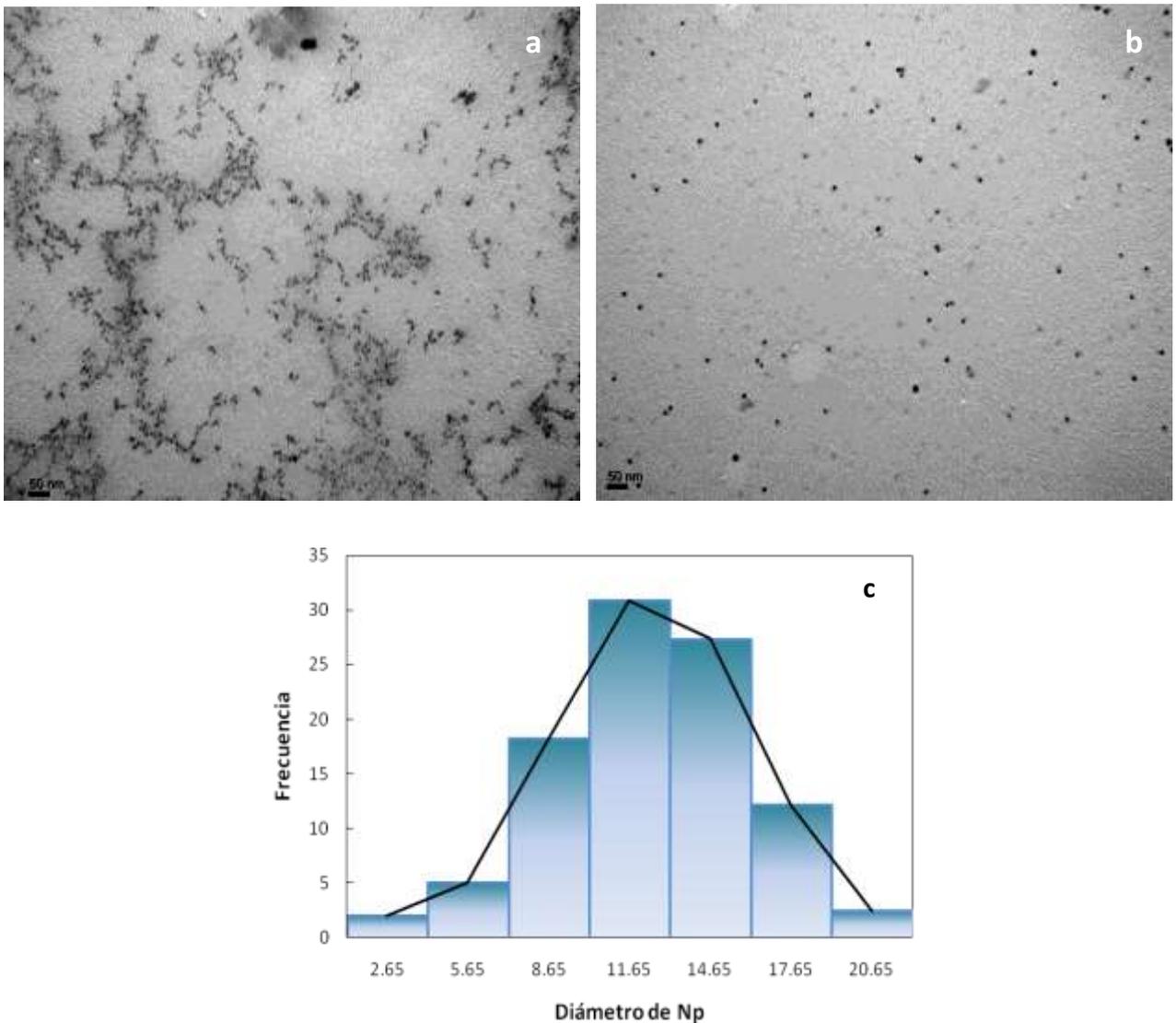


Figura 2.6. Micrografías obtenidas por TEM de nanopartículas de plata inmersas en una suspensión de quitosano (**a**) y aisladas y resuspendidas en agua destilada (**b**). Histograma mostrando la distribución de tamaño de las NpAg (**c**).

Capítulo 2 Nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de plata

De acuerdo a Xia y Halas (2005) las formas de las NpAg que se pueden obtener son las mostradas en la Figura 2.7. El SEM fue empleado para visualizar las formas de las NpAg (Figura 2.8). La imagen electrónica EDS y su correspondiente mapa de distribución del elemento Ag se muestran en la Figura 2.8a y b. Las micrografías obtenidas por SEM de las NpAg en la matriz de quitosano y después de un proceso de filtración se pueden ver en la Figura 2.8 c y d, donde se puede visualizar la forma cúbica de la mayoría de las partículas (Figura 2.8). Las nanopartículas metálicas de Ag mostraron el pico de absorción típico aproximadamente a 3 keV y algunas señales débiles en el espectro se debieron a los átomos de moléculas unidas a la superficie de las nanopartículas (Figura 2.8e).

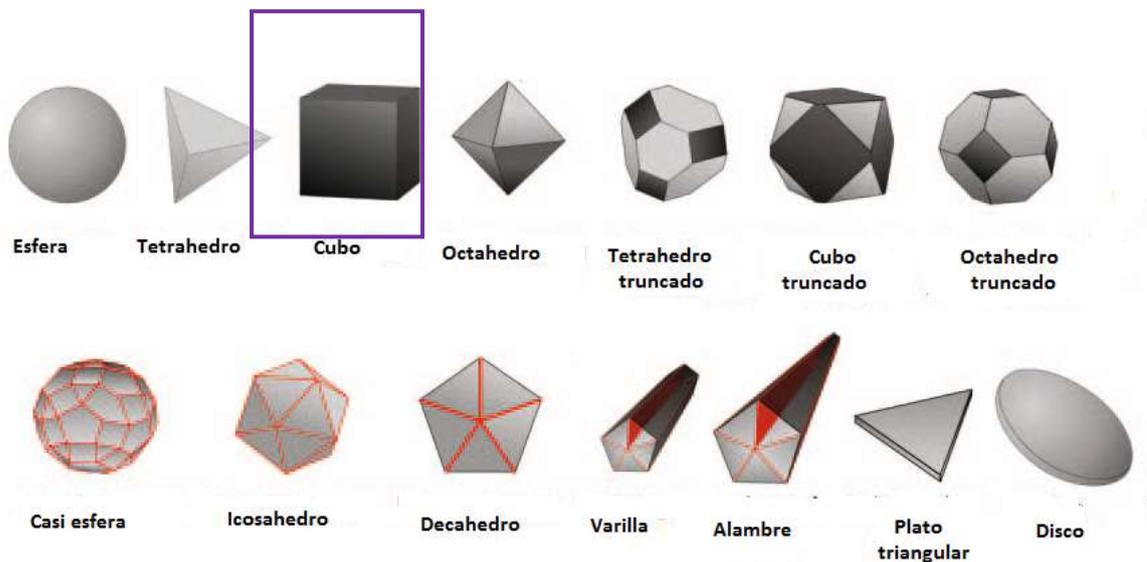


Figura 2.7. Ilustración esquemática de formas de nanoestructuras de plata. Las formas en la fila superior son cristales individuales y en la segunda fila son partículas agrupadas. Adaptado de Xia y Halas (2005).

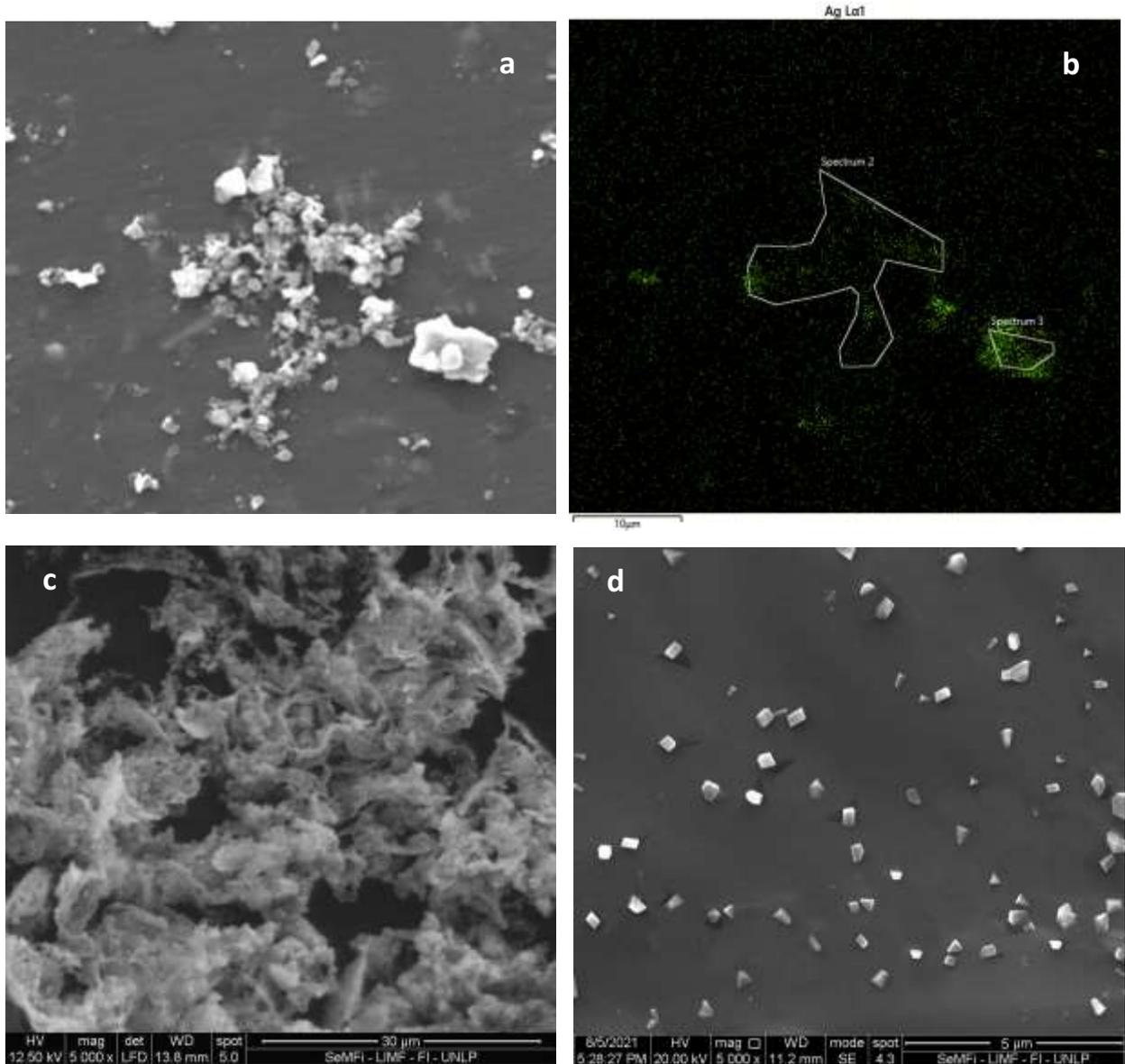
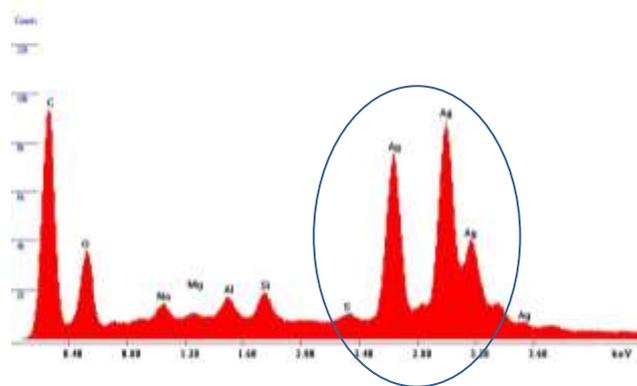


Figura 2.8. (a) Imagen electrónica EDS de nanopartículas de plata, (b) mapa del análisis elemental de la superficie por EDS mostrando la distribución de NpAg, (c) micrografías obtenidas por SEM de la suspensión de NpAg en la matriz de quitosano, (d) suspensión filtrada de NpAg, (e) espectro EDS exhibiendo los picos de Ag correspondiente al área marcada en (b).

e



Patrón de difracción de RX

Los resultados obtenidos por DRX confirmaron la formación de NpAg con los picos distintivos ubicados a valores 2θ 38.2°, 44.4°, 64.6°, 77.5° y 81.7° correspondientes a los planos (111), (200), (220), (311) y (222), respectivamente (Figura 2.9) (Arjunan y col., 2016; Basavegowda y Lee, 2013).

El pico intenso a 38° indicó un alto grado de cristalinidad (Sangsuk 2010; Suriati y col., 2014). Picos característicos similares fueron reportados por otros investigadores (Suriati y col., 2014). Sin embargo, también se puede observar que los picos son relativamente anchos, indicando que el material está compuesto de cristalitas de plata muy pequeños (Suriati y col., 2014).

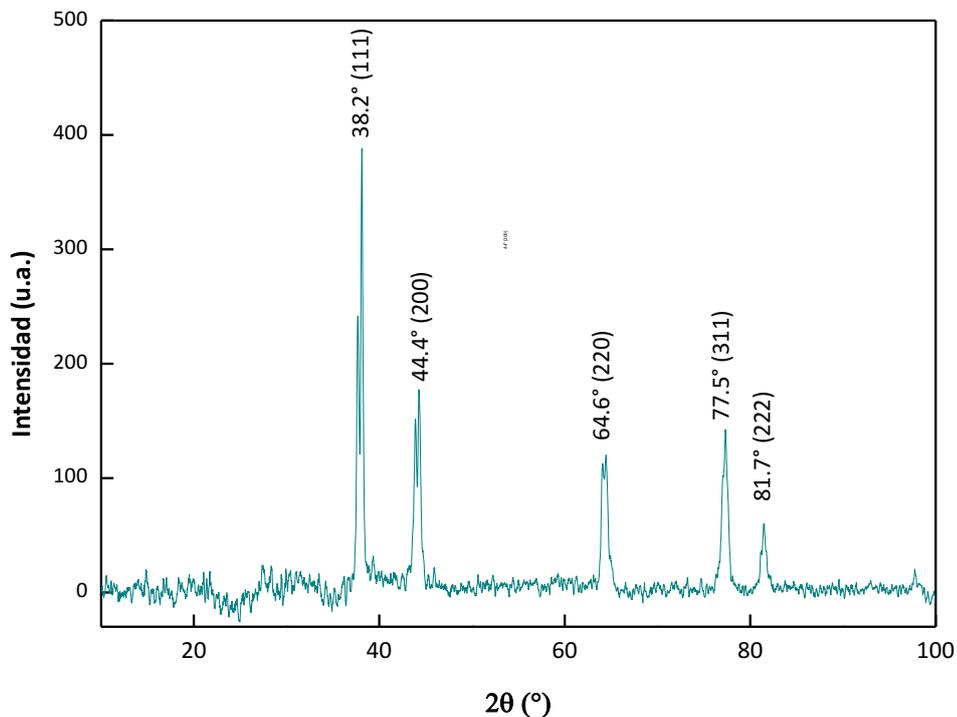


Figura 2.9. Patrón de difracción de RX de nanopartículas de plata obtenidas *in situ* usando una solución de quitosano 1% como agente reductor.

Los datos fueron confirmados utilizando datos estándar de difracción de polvo de la Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS no. 04-0783). Los picos de Ag correspondieron a una simetría cúbica centrada en las caras (fcc) (Sohn y col., 2010).

Tabla 2.2. Ángulo de difracción 2θ y espaciado interplanar teórico y experimental de nanopartículas de plata para los índices de Miller (h k l)

h k l	d_{hkl} (Å)	$2\theta_{hkl}$ (°)	d_{exp} (Å)	$2\theta_{exp}$ (°)	Tamaño del cristalito (nm)
1 1 1	2.359	38.10	2.359	38.314	4.65
2 0 0	2.046	44.28	2.043	44.27	4.74
2 2 0	1.444	64.42	1.444	64.51	5.19
3 1 1	1.232	77.37	1.233	77.37	7.44

La estructura del cristal de plata es cúbica centrada en las caras, con una celda unidad $a=4.086$ Å. La determinación de la posición 2θ de los cuatro primeros picos en el patrón de difracción y el espaciado interplanar d_{hkl} de cada pico (Tabla 2.2) se calcularon como:

$$\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{(h^2 + k^2 + l^2)}{a^2}$$

$$\Rightarrow d_{hkl} = \sqrt{\frac{(h^2 + k^2 + l^2)}{a^2}} \quad \text{Ec. 2.2}$$

El valor de $2\theta_{hkl}$ se calculó a partir del espaciado interplanar entre átomos usando la ley de Bragg:

$$2 d_{hkl} \sin\theta_{hkl} = n \lambda$$

$$\Rightarrow \sin\theta_{hkl} = \frac{\lambda}{2 d_{hkl}} \quad \text{Ec. 2.3}$$

El tamaño del cristalito se calculó con el programa X'Pert HighScore Plus. Se determinó el *background* y se estimaron los parámetros de pico como intensidad, ancho, posición y forma y se empleó la ecuación de Debye-Scherrer (Kaviyarasu y col., 2015; Lamarra y col., 2017).

$$D = \frac{K \lambda}{\beta \cos \theta} \quad \text{Ec. 2.4}$$

donde,

D es el tamaño cristalino, λ es la longitud de onda del incidente de rayos X ($\lambda=0.1540\text{nm}$), K es la constante de Scherrer (0.90), β es el ancho completo a la mitad de la intensidad máxima en radianes, θ es el ángulo de difracción de Bragg en grados.

Tamaño por DLS

El tamaño de las NpAg también se determinó a través de DLS. La distribución estuvo centrada alrededor de 197 nm como se muestra en la [Figura 2.10](#). Este valor fue mayor al determinado por medio de TEM y SEM como se puede observar en las [Figuras 2.6 y 2.8](#). Este resultado se podría explicar debido a la presencia de quitosano como se muestra en la [Figura 2.6c](#) obtenida por microscopía SEM.

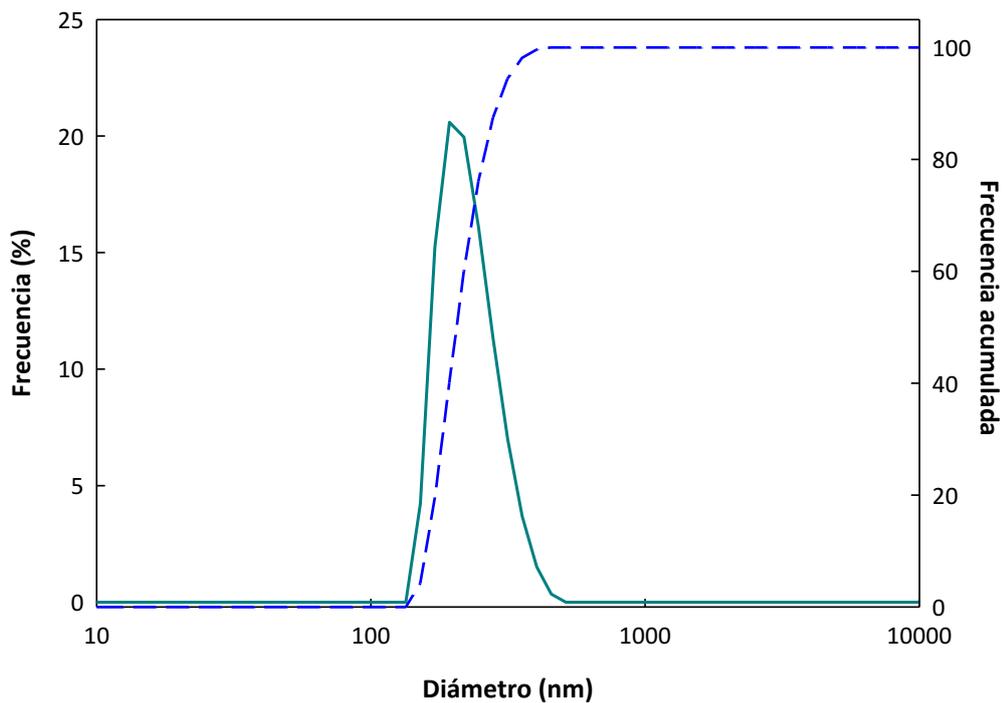


Figura 2.10. Perfil de distribución de tamaño de las nanopartículas de Ag mostrando la frecuencia % y la frecuencia acumulada.

Espectro de fluorescencia de la suspensión de NpAg en quitosano

La Figura 2.11 muestra el espectro de fluorescencia de emisión de las nanopartículas de plata cuando la excitación se produjo a una longitud de onda de 350 nm. Resultados similares fueron informados por Liu y col. (2007).

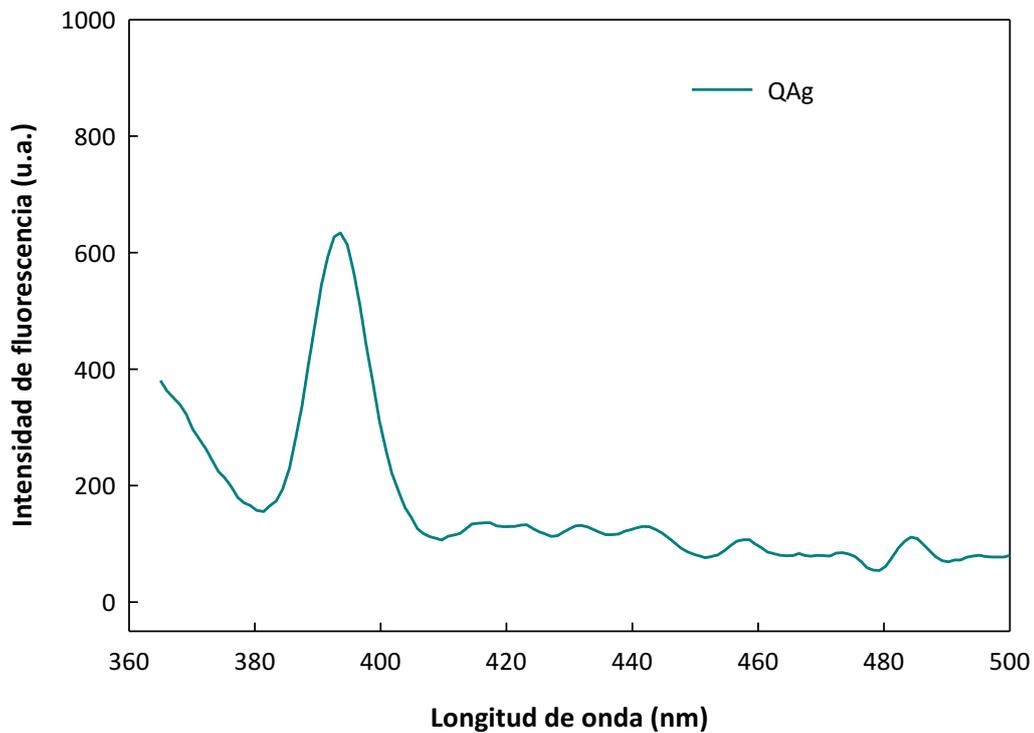


Figura 2.11. Espectro de fluorescencia de nanopartículas de plata obtenidas *in situ* usando una solución de quitosano 1% como agente reductor.

2.4.2 Análisis de los nanocompuestos QAg

Propiedades de resistencia al agua

Las matrices nanocompuestas presentaron un espesor entre 52.5 y 56.3 μm . El espesor se controló manteniendo la constancia entre el cociente masa seca y la superficie de la placa de moldeo.

En la Tabla 2.3 se muestran las propiedades relacionadas con la resistencia al agua de las matrices nanocompuestas en comparación con la película de quitosano. Para la determinación del porcentaje de solubilidad los ensayos se llevaron a cabo bajo agitación

Capítulo 2 Nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de plata

controlada en agua de calidad milli-Q. La película de Q control mostró un elevado porcentaje de solubilidad (52.2%). Las NpAg estimularon la formación de enlaces entre los grupos funcionales de las cadenas de Q, lo que condujo a una disminución en la disponibilidad de grupos hidroxilo y amino, limitando las interacciones entre el Q y el agua por enlaces de hidrógeno. La ocupación de porciones hidrofílicas de la molécula de Q por interacciones con las NpAg y al aumento del entrecruzamiento de la matriz con la formación e incorporación de las nanopartículas pudo causar un acceso limitado de las moléculas de agua a las cadenas de carácter hidrofílico de Q (Thomas y col., 2009). Sin embargo, entre las matrices nanocompuestas no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$). Además se evidenció un hinchamiento de la matriz, pero manteniendo las características estructurales del material. Las matrices QAg₁, QAg₂, QAg₃ y QAg₄ presentaron bajas solubilidades en comparación con la solubilidad del Q control, presentando una disminución del 97.3% en promedio ($p < 0.05$). Por lo tanto, la solubilidad de la matriz se podría adaptar controlando la concentración de las NpAg, permitiendo una amplia gama de posibles aplicaciones.

Tabla 2.3. Propiedades relacionadas con la resistencia al agua de matrices nanocompuestas a base de quitosano funcionalizadas con NpAg

Matriz	Humedad (%)	Solubilidad (%)	Hinchamiento (%)
Q	18.1 (1.3) ^a	52.2 (3.1) ^b	370 (23) ^d
QAg ₁	20.6 (1.5) ^a	2.7 (1.5) ^a	192 (9) ^a
QAg ₂	20.8 (1.3) ^a	1.5 (0.1) ^a	171 (17) ^a
QAg ₃	20.5 (0.2) ^a	1.2 (0.9) ^a	324 (12) ^c
QAg ₄	20.2 (1.4) ^a	0.3 (0.4) ^a	260 (27) ^b

^a Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

De acuerdo a Thomas y col. (2009), la menor absorción de agua de la película de nanoplata puede atribuirse al hecho de que la unión de nanopartículas de plata con los

átomos de O ricos en electrones y átomos de N de las aminas presentes en las cadenas de quitosano produce enlaces cruzados adicionales dentro de la matriz.

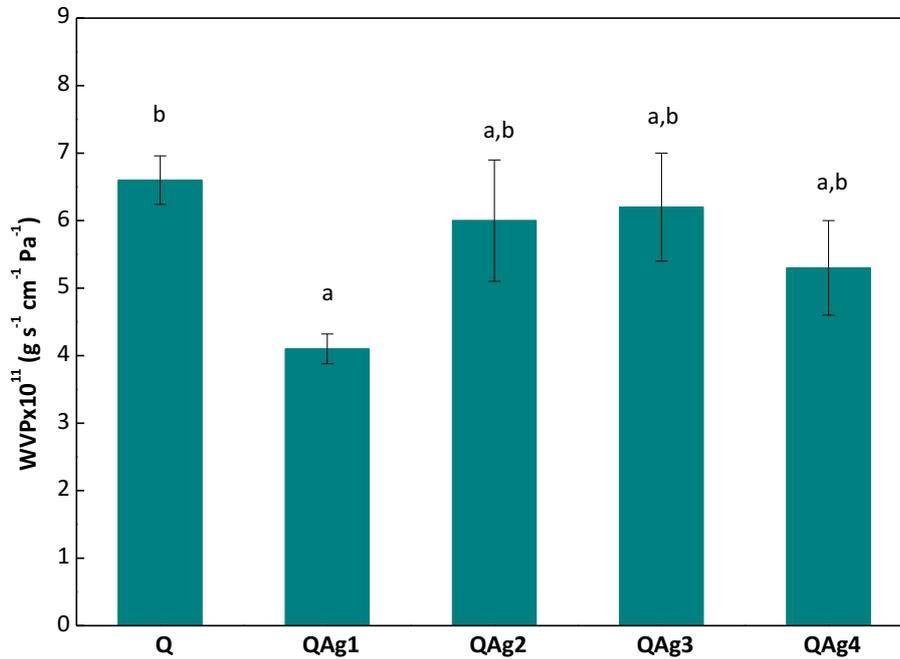


Figura 2.12. Permeabilidad al vapor de agua (WVP) de los nanocompuestos a base de quitosano funcionalizadas con NpAg.

Nuevamente, el fenómeno de reticulación permitiría explicar la disminución de la afinidad de los nanocompuestos hacia el agua, lo que es beneficioso cuando se pretende conservar la integridad del producto y la resistencia a la misma. Möller y col.(2004) informaron la reticulación de películas basadas en Q-hidroxi-propil-metilcelulosa utilizando ácido cítrico como agente entrecruzante.

El contenido de humedad no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$) con la incorporación de las NpAg a la matriz de quitosano a pesar del entrecruzamiento de la matriz biopolimérica (Park y Zhao, 2004).

La Figura 2.12 muestra la variación de la permeabilidad al vapor de agua (WVP) de las matrices Q con agregado de NpAg y de la película control. La película Q presentó valores similares a los informados por Rivero y col. (2009). La presencia de nanopartículas ejerció

Capítulo 2 Nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de plata

un efecto significativo sobre las propiedades de WVP solo en el caso de la concentración más baja, QAg₁ ($p < 0.05$). Resultados similares fueron informados por [Ortega y col. \(2017\)](#).

Con respecto a los resultados de WVP obtenidos para las otras formulaciones, se pudo observar que no presentaron diferencias significativas con respecto al control ($p > 0.05$). Esto se debió posiblemente a que, con el aumento de la concentración de nanopartículas, durante el secado, se generó la aglomeración en zonas puntuales de la matriz y este fenómeno posibilitó la movilidad de las moléculas de agua en forma más directa (menor tortuosidad). Según lo reportado por [Salari y col. \(2018\)](#) la incorporación de NpAg reforzó significativamente la matriz de Q y mejoró las propiedades de resistencia al agua como solubilidad e hinchamiento, además de la WVP de las películas con la menor proporción de NpAg. De acuerdo a [Thomas y col. \(2009\)](#), la menor absorción de agua de las películas nanocompuestas podría atribuirse al hecho de que la unión de nanopartículas de plata con los átomos de O ricos en electrones y átomos de N de las aminas presentes en las cadenas de quitosano produce enlaces cruzados adicionales dentro de la matriz de la película.

Para determinar la hidrofobicidad de las matrices de nanocompuestas funcionalizadas con NpAg se midió el ángulo de contacto del agua en la superficie de la película ([Tabla 2.4](#)). La película Q control presentó una mayor hidrofilia en comparación con las matrices nanocompuestas, con un ángulo de contacto de 72.8° debido a los grupos hidroxilo del quitosano. Como se puede observar en la [Tabla 2.4](#), después de la incorporación de las NpAg a la matriz de Q, el ángulo de contacto aumentó significativamente ($p < 0.05$). Esto podría ser atribuido a la hidrofobicidad de las NpAg que llevaron a un aumento de las propiedades hidrofóbicas superficiales de las matrices QAg (QAg₁, QAg₂, QAg₃ y QAg₄) ([Kanmani y Rhim, 2014a](#)). Por otro lado [Salari y col. \(2018\)](#) compararon el ángulo de contacto entre matrices de Q con diferentes concentraciones de NpAg y nanopartículas de celulosa (NCC), atribuyendo el fenómeno a la reducción de los grupos hidrofílicos libres y al aumento de la cohesión en la superficie como resultado de la interacción de las cadenas de Q con las nanopartículas ([Ojagh y col., 2010](#); [Salari y col., 2018](#)).

Tabla 2.4 Ángulo de contacto de las matrices compuestas de quitosano con agregado distintas proporciones de nanopartículas de plata (NpAg)

72.8°(1.3) ^a	76.4°(4.5) ^b	80.4°(4.8) ^c	93.5° (2.6) ^d	94.2°(1.4) ^d
Q	QAg ₁	QAg ₂	QAg ₃	QAg ₄

^a Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas (p<0.05)

Propiedades ópticas

Las propiedades de color se midieron en el espacio CIELab. A partir de la apariencia visual de las películas (Figura 2.13) se observó que la adición de las NpAg dio lugar a cambios de color hacia un tono rojizo mostrando un incremento significativo en los parámetros a* y b* y una disminución en L* (p<0.05) (Figura 2.14 y Tabla 2.5).

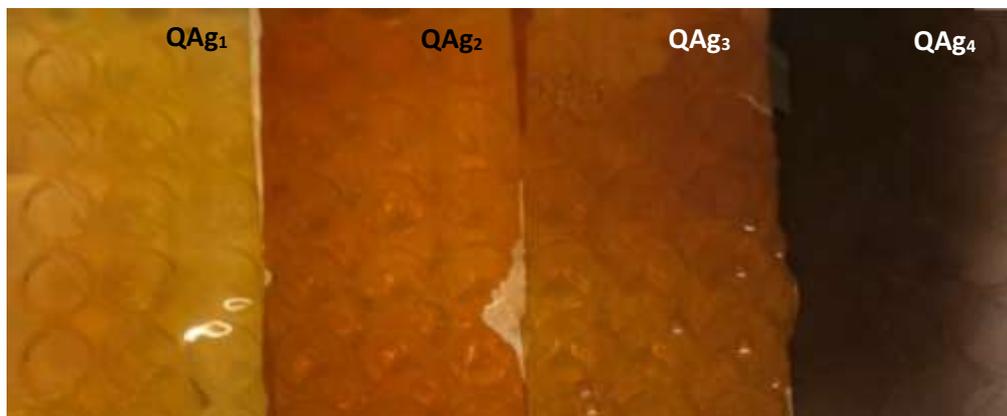


Figura 2.13. Apariencia visual de las matrices nanocompuestas formuladas con quitosano y nanopartículas de plata con distintas concentraciones (ver Tabla 2.1).

Las diferencias de color (ΔE) de las películas se calcularon a partir de la siguiente ecuación

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad \text{Ec. 2.5}$$

donde,

Capítulo 2 Nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de plata

$$\Delta L^* = L^* - L_0^*$$

$$\Delta a^* = a^* - a_0^*$$

$$\Delta b^* = b^* - b_0^*$$

Siendo,

L_0^* , a_0^* , b_0^* son los valores de los parámetros de color del estándar y L^* , a^* , b^* los correspondientes a las películas.

Asimismo, el índice de pardeamiento (IP), que representa la pureza del color marrón, se calculó empleando las ecuaciones:

$$IP = \frac{100(x - 0.031)}{0.172} \quad \text{Ec. 2.6}$$

$$x = \frac{a^* + 1.75 L^*}{5.645 L^* + a^* - 3.012 b^*} \quad \text{Ec. 2.7}$$

Los valores de ΔE resultaron mayores que 2.0 en todos los casos, siendo este valor utilizado como umbral de diferencia de color perceptible para el ojo de los consumidores (Arrieta y col., 2017) (Figura 2.14 y Tabla 2.5). Los materiales basados en QAg mostraron diferencias de color totales significativas con respecto a Q ($p < 0.05$) pero prácticamente constantes entre los nanocompuestos independientemente de la concentración de NpAg ($p > 0.05$). Una tendencia similar fue informada por Lamarra y col. (2017) trabajando con matrices de quitosano con incorporación de nanopartículas cargadas con ácido gálico.

Los valores de índice de pardeamiento también fueron significativamente diferentes entre QAg y las películas Q ($p < 0.05$) (Tabla 2.5).

Tabla 2.5. Parámetros de color a^* , b^* , diferencia de color ΔE^* e índice de pardeamiento IP de las matrices nanocompuestas formuladas a base de quitosano

Muestras	a^*	b^*	IP
Q	-1.36 (0.1) ^a	11.9 (0.2) ^a	12.3 (0.4) ^a
QAg ₁	22.5 (0.9) ^b	24.4 (2.6) ^b	111.0 (10.0) ^b
QAg ₂	28.1 (2.6) ^{b,c}	24.0 (2.7) ^b	121.7 (9.8) ^{b,c}
QAg ₃	26.1 (1.8) ^{b,c}	23.9 (1.4) ^b	148.6 (12.4) ^c
QAg ₄	30.2 (1.5) ^c	25.1 (2.3) ^b	282.2 (11.8) ^d

*Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre muestras.

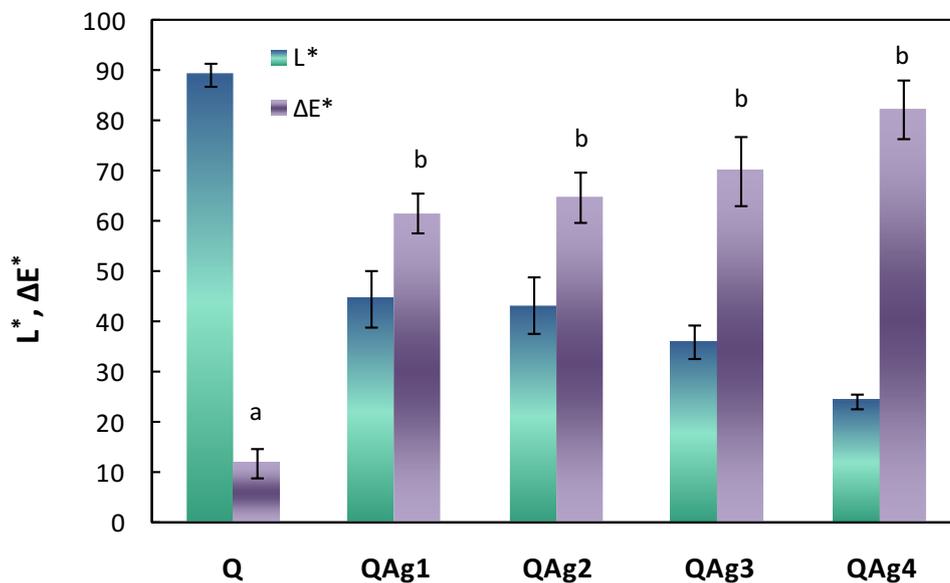


Figura 2.14. Parámetro de luminosidad L^* y diferencia de color ΔE^* de las matrices nanocompuestas QAg_x respecto a la película control Q (L^* : color verde; ΔE^* : color violeta). $\Delta E^* = (\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{1/2}$

La opacidad y la capacidad de barrera a la radiación UV se determinaron a partir de los espectros de absorbancia obtenidos en un espectrofotómetro. La adición de NpAg redujo la transmisión de la luz en la región visible del espectro entre 400 y 700 nm mostrando un aumento en los valores de opacidad ($p < 0.05$), como se puede ver en la [Tabla 2.6](#). A partir de los resultados obtenidos en la región 200-400 nm, pudo inferirse que la presencia de NpAg aumentó la capacidad de barrera al UV de las películas a base de quitosano.

Capítulo 2 Nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de plata

Similares valores fueron informados por Ortega y col. (2021) trabajando con películas de almidón con inclusión de nanopartículas de plata.

La transparencia también disminuyó, lo que se tradujo en un incremento en los valores de $Abs_{600} \times mm^{-1}$ (Tabla 2.6 y Figura 2.15).

Tabla 2.6. Propiedades ópticas de las matrices nanocompuestas formuladas a base de quitosano

Muestras	Transparencia $Abs_{600} \times mm^{-1}$	Opacidad ($AU \times nm^{-1}$)	Barrera UV ($AU \times nm^{-1}$)
Q	1.37 (0.11) ^a	20.9 (0.1) ^a	77.2 (2.7) ^a
QAg ₁	4.64 (0.22) ^b	176.2 (5.5) ^{b,c}	430 (12) ^b
QAg ₂	4.31 (0.15) ^b	165.3 (10.0) ^b	425 (11) ^b
QAg ₃	7.39 (0.56) ^c	170.8 (13.4) ^{b,c}	444 (23) ^b
QAg ₄	8.54 (0.37) ^c	211.2 (20.2) ^c	467 (21) ^b

*Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre muestras.



Figura 2.15. Fotografías mostrando la legibilidad decreciente de un texto ubicado detrás de películas de quitosano y de las matrices nanocompuestas formuladas con quitosano y nanopartículas de plata con concentraciones crecientes.

Propiedades mecánicas

El esfuerzo a la ruptura de la matriz nanocompuesta QAg₁ con la menor concentración de NpAg no presentó diferencias significativas ($p>0.05$) con respecto a la película Q. Sin embargo, cuando la concentración de nanopartículas aumentó el esfuerzo se incrementó y las diferencias se tornaron significativas ($p<0.05$) en relación al valor de Q pero no entre las matrices ($p>0.05$).

Con respecto a la elongación %, solo la matriz nanocompuesta QAg₁ presentó diferencias significativas ($p<0.05$) con una elongación promedio de 15.9% (Tabla 2.7).

Este comportamiento se podría atribuir a la menor cantidad de nanopartículas que estableció interacciones entre las cadenas del biopolímero permitiendo una mayor elongación de la matriz. Cuando la concentración se incrementó el efecto entrecruzante llevó a la formación de una matriz más fuerte y rígida como puede verse en los perfiles mostrados en la Figura 2.16.

En general, las nanopartículas de plata formadas *in situ* en la matriz Q actuaron como refuerzo aumentando la resistencia de las películas y disminuyendo la elongación de las mismas.

Tabla 2.7. Valores de esfuerzo (MPa) y elongación % para las matrices nanocompuestas a base de quitosano funcionalizadas con NpAg

Formulación	Esfuerzo (MPa)	Elongación %
Q	51.7 (7.0) ^a	8.2 (1.1) ^a
QAg ₁	60.3 (5.4) ^{a,b}	15.9 (1.3) ^b
QAg ₂	75.8 (8.5) ^b	6.1 (0.7) ^a
QAg ₃	82.2 (4.5) ^b	6.5 (1.5) ^a
QAg ₄	78.6 (5.1) ^b	10.1 (2.2) ^a

^a Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas ($p<0.05$)

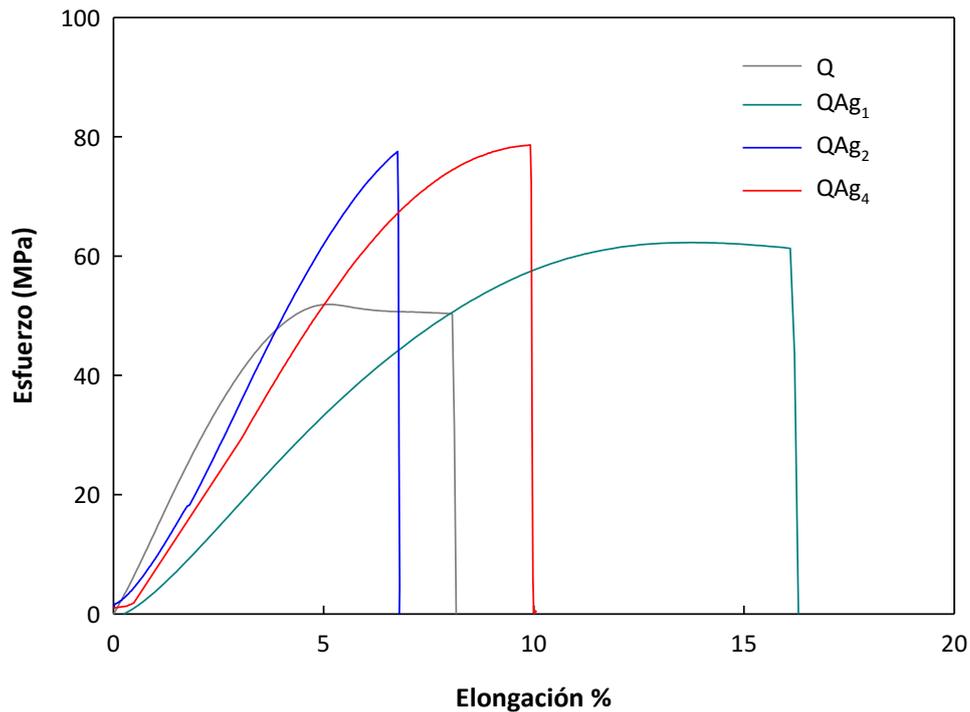


Figura 2.16. Perfiles mecánicos de películas de quitosano y nanocompuestos QAg_x con x=1,2,4

La mejora de las propiedades físicas y mecánicas de las películas de nanocompuestos a base de Q se debió principalmente al efecto de relleno de las nanopartículas y las fuertes interacciones entre los componentes de QAg.

Análisis térmico

Los termogramas de DSC del quitosano y de los nanocompuestos exhibieron un pico endotérmico relacionado con la pérdida de agua (Figura 2.17a). La presencia de nanopartículas no cambió significativamente la posición de la temperatura de pico ($p > 0.05$). Asimismo, se analizaron las curvas de calor reversible obtenidas por MDSC y se determinaron las temperaturas de transición vítrea (T_g) como puede observarse en la Figura 2.17b. La segunda T_g de los nanocompuestos se visualizó en todos los casos a temperaturas por encima de los 150°C. La posición de la primera T_g en algunos casos no resultó visible pero fue cercana a 80°C para QAg₁ y a 100°C para QAg₃ (Tabla 2.8).

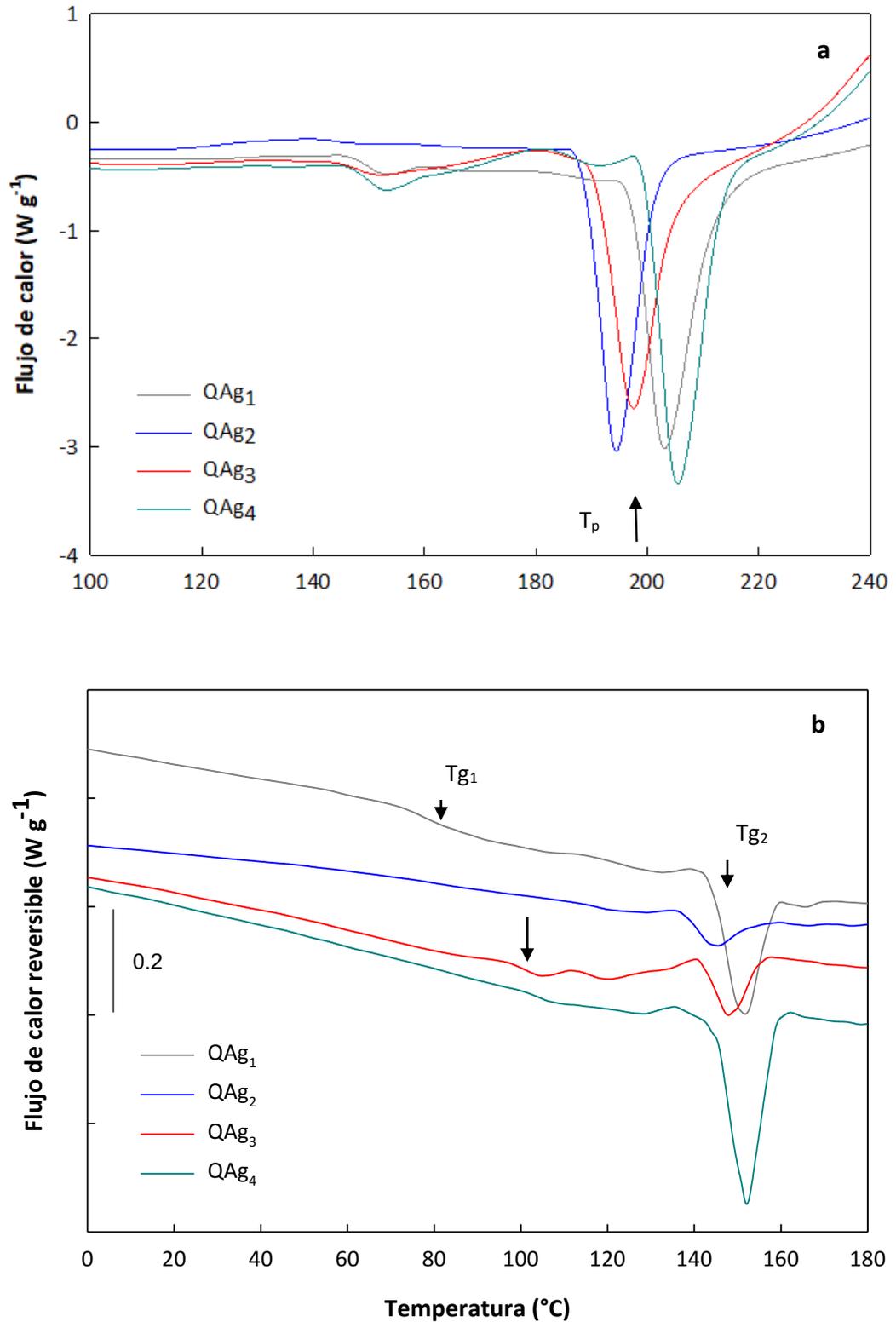


Figura 2.17. Termogramas obtenidos por calorimetría diferencial de barrido. **(a)** Curvas de flujo de calor de nanocompuestos QAg mostrando la temperatura de pico (T_p), **(b)** cambio en la línea de base de la señal de flujo de calor reversible indica la temperatura de transición vítrea (T_g) obtenida por DSC modulado.

Tabla 2.8. Análisis térmico de las películas Q y los nanocompuestos con distintas concentraciones de NpAg realizado a partir de las curvas de flujo de calor obtenidas por DSC y MDSC

Formulación	T _p (°C)	ΔH _p (J g ⁻¹)	T _{g1} (°C)	T _{g2} (°C)
Q	122.4 (3.6)	288.3 (6.6)	91.4 (1.8)	-
QAg ₁	203.5 (2.5)	159.0 (4.7)	77.5 (3.1)	147.7 (2.2)
QAg ₂	194.3 (3.7)	153.7 (6.2)	-	141.2 (3.9)
QAg ₃	197.4 (2.0)	151.6 (5.5)	100.9 (2.5)	145.8 (2.8)
QAg ₄	205.3 (3.9)	166.8 (8.8)	-	148.1 (3.7)

^a Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas (p<0.05)

Estos valores de T_g pudieron ser corroborados por la técnica de DMA (Figura 2.18). El evento observado en las curvas de Tan δ de las películas de Q corresponde a la relajación α, asociada a la temperatura de transición vítrea dinámica (T_g). Esta relajación refleja la movilidad de los segmentos de las cadenas largas en los dominios amorfos del polímero (Lazaridou y Biliaderis, 2002).

La T_g de las películas formuladas solo con Q se localizó a una temperatura de 91°C, valor similar al hallado mediante MDSC (91.4°C). Los nanocompuestos tuvieron un carácter menos hidrofílico. En la Figura 2.18 la T_g de la película Q se observó a 91°C. Mientras tanto, los nanocompuestos exhibieron dos T_{gs} correspondientes a la fase rica en quitosano a 100° y 89°C, y a la fase rica en nanopartículas a 182° y 215°C, para QAg₂ y QAg₄, respectivamente. Sorprendentemente, la T_g correspondiente al nanocompuesto con mayor contenido de NpAg experimentó un corrimiento a menor temperatura. Según Rana y col. (2010) este resultado podría atribuirse al efecto hidrofílico sinérgico del quitosano y la Ag donde el agua adsorbida funciona como plastificante.

El análisis térmico de los sistemas nanocompuestos por TGA mostró que durante la etapa de calentamiento, el quitosano exhibió una pérdida de peso en tres pasos. A partir de las curvas de TGA (Figura 2.19), se confirmó que tanto el quitosano como los nanocompuestos poseen grupos polares y por lo tanto el agua puede ser fácilmente absorbida en los sistemas por puentes de hidrógeno. La primera pérdida se produjo en el

rango de temperaturas 25-180°C correspondiente a la evaporación de la humedad. La segunda pérdida de 180-400°C fue causada por la descomposición del hidrocarburo. La pérdida en el rango 400-620°C se atribuyó a la descomposición del quitosano residual. Los nanocompuestos exhibieron un comportamiento similar. Sin embargo, los termogramas de los nanocompuestos tuvieron menor pérdida de peso a 620°C (Figura 2.19). La descomposición ocurrió a menor temperatura porque la plata actuaría como un catalizador para la reacción a la descomposición (Nootsuwan y col., 2018).

Al final del proceso, los nanocompuestos de plata demostraron una mayor estabilidad que las películas de quitosano ya que a 600°C, 4 y 8.8% de material no sufrió degradación. Eso significa que las matrices contenían 4-8.8% de NpAg (Tabla 2.9). Resultados similares fueron informados por Rana y col. (2010) y Vimala y col. (2010).

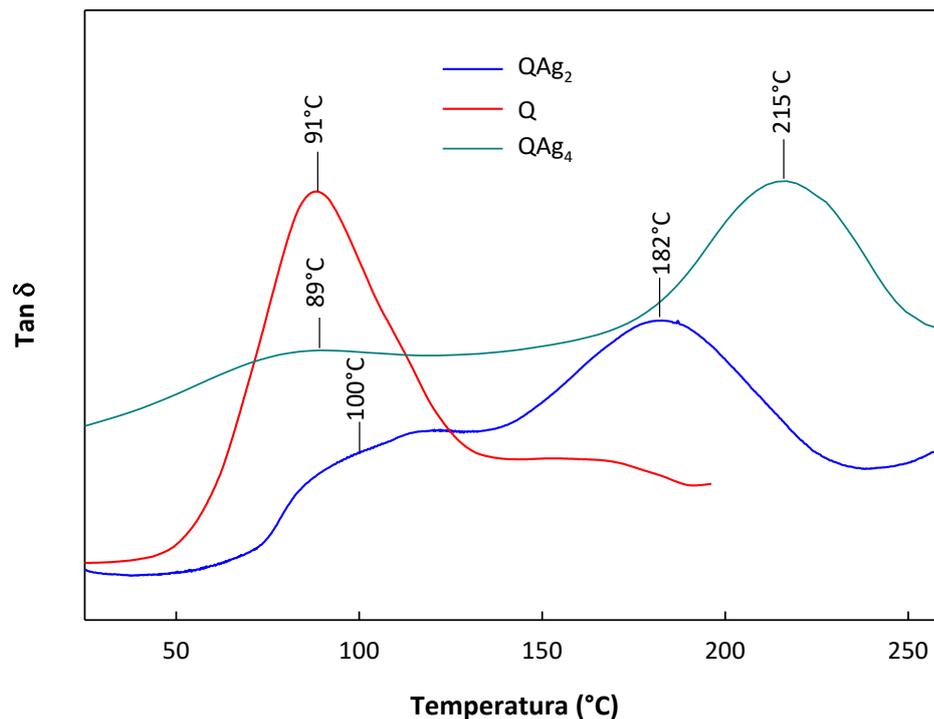


Figura 2.18. Análisis dinámico mecánico (DMA) de películas de quitosano y nanocompuestos QAg₂ y QAg₄ formulados con Q y NpAg.

Asimismo, los picos de la curva DTA indicaron las temperaturas de la velocidad máxima de las tres etapas de degradación. La primera temperatura indicó la pérdida de agua, la

Capítulo 2 Nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de plata

segunda llamada temperatura de combustión pasó de 286° en Q a 232°C en QAg y la tercera temperatura de degradación denominada temperatura de carbonización de 582° en Q a 514° en QAg₂ y 465°C en QAg₄. Cabe señalar que en la tercera etapa los picos tuvieron mayor intensidad, lo que de acuerdo a [Rana y col. \(2010\)](#) indicaría una mayor estabilidad térmica de la matriz.

Tabla 2.9. Pérdidas de peso de la película Q y los nanocompuestos QAg obtenidas por TGA para las diferentes etapas

	I etapa		II etapa		III etapa		Peso residual (%)
	T _{final} (°C)	Pérdida masa (%)	T _{final} (°C)	Pérdida masa (%)	T _{final} (°C)	Pérdida masa (%)	
Q	180	15.19	400	39.95	620	43.64	1.22
QAg ₂	180	17.19	400	40.36	620	38.44	4.01
QAg ₄	180	12.96	400	41.81	620	36.37	8.86

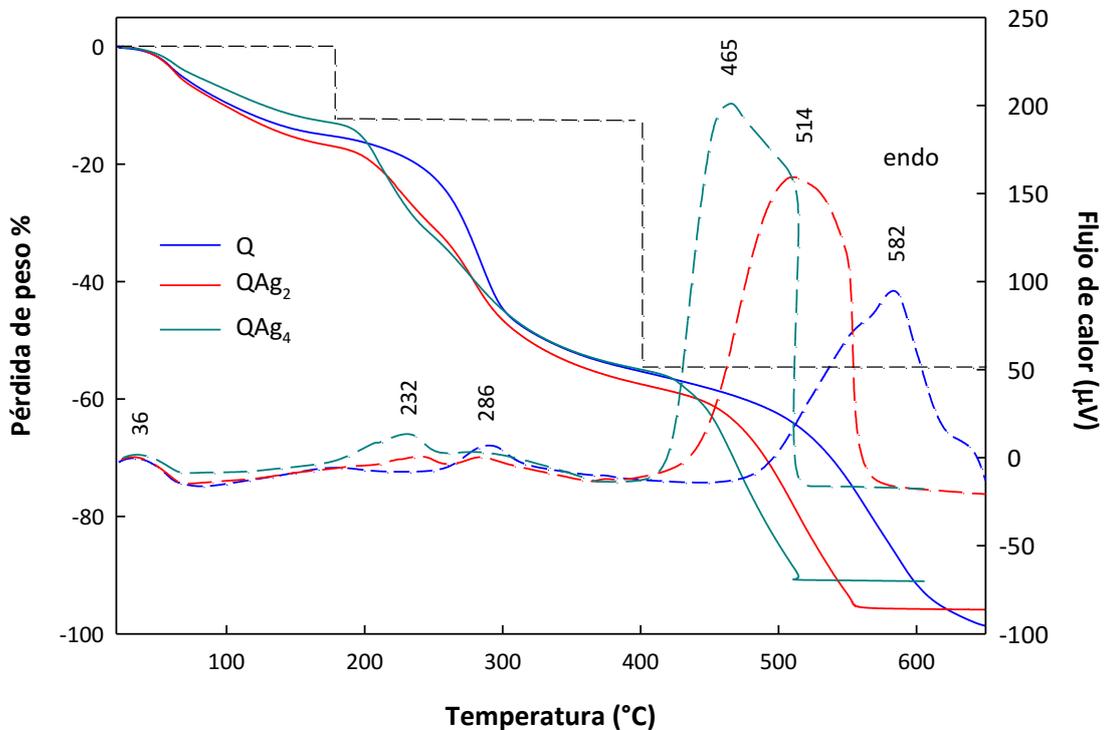


Figura 2.19. Termogramas obtenidos por TGA de muestras de Q y nanocompuestos formulados a base de Q funcionalizados con NpAg.

Análisis microestructural por SEM

Las micrografías del corte transversal de la película de quitosano revelaron la distribución uniforme de las nanopartículas de plata (Figura 2.20). El polímero natural quitosano nuclea y estabiliza las NpAg formadas y, por lo tanto, evita su agregación. La razón es la propiedad quelante de la cadena de quitosano con sus grupos NH₂ que fija las NpAg (Thomas y col., 2009).

El análisis de la composición elemental del nanocompuesto por EDS indicó claramente la presencia de Ag (Figura 2.20c y d). Además, se detectaron los elementos C, O y Au debido al recubrimiento.

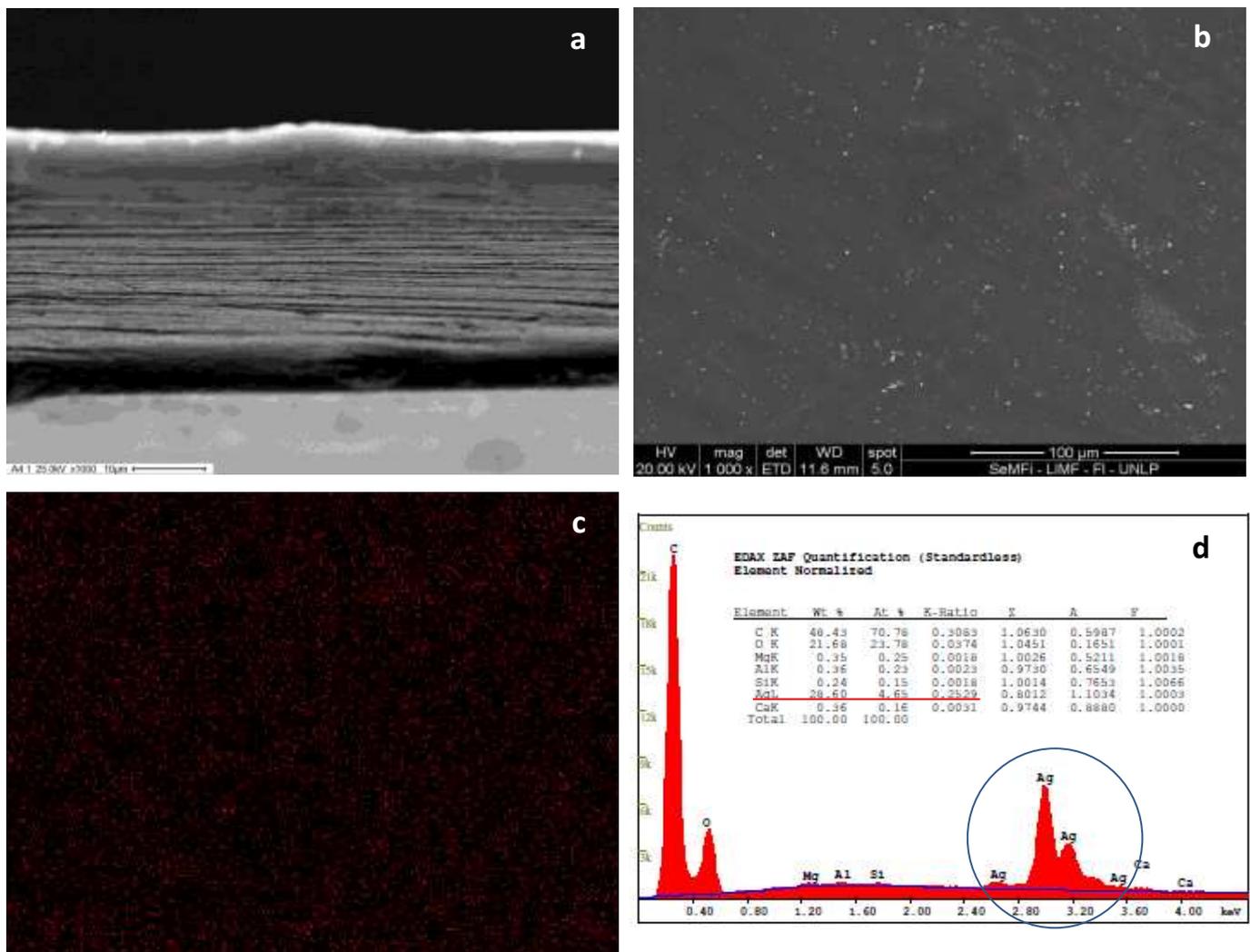


Figura 2.20. Micrografías obtenidas por SEM de nanocompuestos a base de quitosano funcionalizados con nanopartículas de Ag (a) corte transversal, (b) superficie. Los mapas de Ag fueron obtenidos mediante una microsonda de análisis elemental (c) y (d).

DRX de las matrices nanocompuestas

Como se puede ver en la [Figura 2.21](#), la matriz de quitosano exhibió picos localizados en 2θ 7.8° , 10.9° , 17.7° y 22.4° , característicos de este polímero. La inclusión de nanopartículas de plata produjo un ensanchamiento del pico de reflexión ubicado a 22.4° y la desaparición de los picos a menores valores de 2θ . Asimismo, se pudieron visualizar los picos característicos de las NpAg descritos en la [Sección 2.4.1 Caracterización de las nanopartículas](#) localizados a 38.1° , 44.3° , 64.4° y 77.4° .

El grado de cristalinidad se calculó del difractograma como la relación entre el área cristalina y el área total de los picos ([Singh y col., 2014](#)).

La deconvolución del difractograma de rayos X en el rango $4-40^\circ$ puso de manifiesto la existencia de 2 picos, uno cercano a 19° y otro a 24° ([Figura 2.20](#)), con una clara disminución del grado de cristalinidad ([Tabla 2.9](#)).

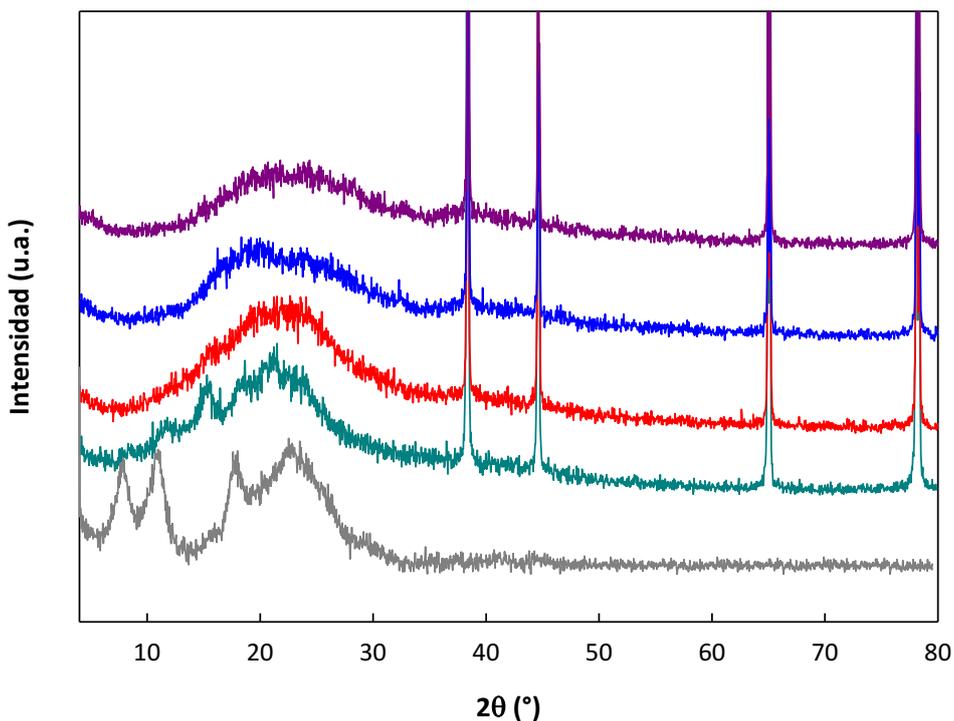


Figura 2.21. Patrones de difracción obtenidos por DRX de películas de quitosano (Q) y nanocompuestos a base de Q funcionalizados con nanopartículas de plata (QAg).

Tabla 2.10. Tamaño del cristalito (nm) obtenido de la ecuación de Debye-Scherrer y grado de cristalinidad (%) de los nanocompuestos QAg, con diferentes relaciones Q:NpAg

Formulación	Posición del pico (2θ)	FWHM	Tamaño del cristalito (nm)	Grado de cristalinidad (%)
Q	22.6	1.889	8.9	38.5 ^c
QAg ₁	20.9	1.259	6.7	40.3 ^c
QAg ₂	19.6	1.889	4.5	28.8 ^b
QAg ₃	19.7	1.889	4.4	26.6 ^b
QAg ₄	18.9	1.574	5.3	20.2 ^a

FWHM: ancho total a mitad de altura. El error típico es $\pm 2\%$.

Asimismo, el tamaño del cristalito se calculó con el programa X'Pert HighScore Plus según el procedimiento descrito en la *Sección 2.4.1 Caracterización de las nanopartículas- Patrón de difracción de RX* (Tabla 2.10). El tamaño no fue significativamente diferente para los nanocompuestos con concentraciones de NpAg superiores a la matriz QAg₂.

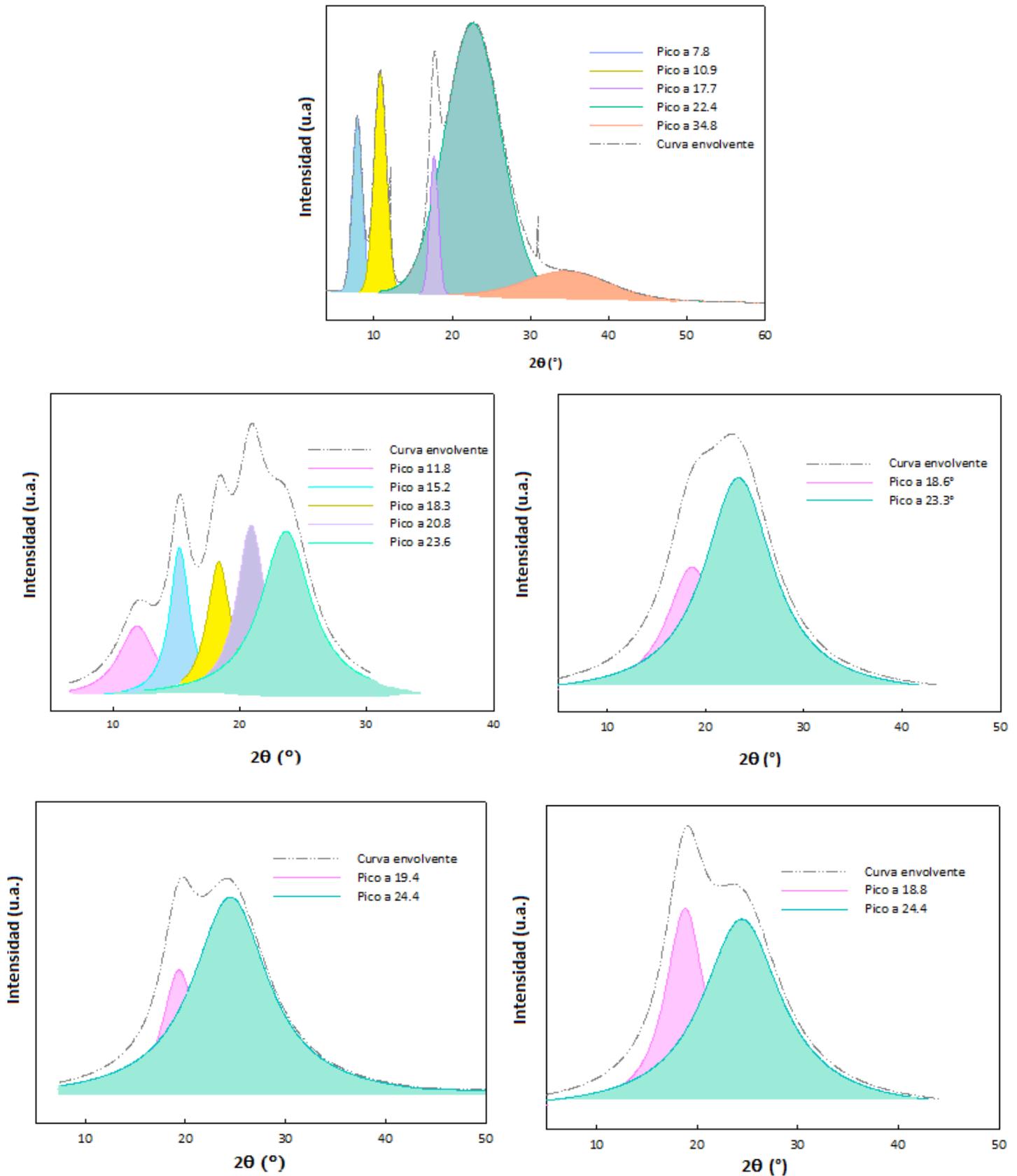


Figura 2.22. Deconvolución del patrón de difracción de rayos X mostrando las curvas de ajuste para películas de quitosano **(a)** y nanocompuestos con diferente relación Q:NpAg: **(b)** QAg₁, **(c)** QAg₂, **(d)** QAg₃ y **(e)** QAg₄. Se muestran la curva envolvente total (línea gris de punto y raya) y los componentes gaussianos individuales (líneas completas de color). 115

Análisis ATR-FTIR

En la [Figura 2.23](#) se muestran los espectros ATR-FTIR de la película de quitosano individual y matrices cargadas con nanopartículas de plata.

El espectro de la película de quitosano mostró una banda ancha entre 3500 y 3000 cm^{-1} correspondiente a vibraciones del estiramiento del grupo -OH, superpuestas a la banda N-H, indicando la formación de enlaces intermoleculares. Las bandas a 2921 y 2878 cm^{-1} se asociaron a las vibraciones de estiramiento al grupo C-H asimétrico y simétrico, respectivamente ([Islam y Yasin, 2012](#); [Pereira dos Santos y col., 2019](#)). Además, el espectro mostró bandas de absorción características a 1632 cm^{-1} asociado a la amida I y a la deformación asimétrica de NH_3^+ y a 1540 cm^{-1} relacionada con el grupo amida II, a la vibración de flexión de N-H y a la deformación simétrica del NH_3^+ . A partir de estos resultados, se pudo observar que el quitosano no estaba totalmente desacetilado y, por esta razón, la presencia de grupos acetilados (R-C=O) y desacetilados (-NH) se encontraron presentes en las películas estudiadas ([Thomas y col., 2009](#)). La principal diferencia entre los espectros del quitosano puro y los nanocompuestos con NpAg radicó en el cambio en las intensidades relativas de las bandas infrarrojas situadas a 1632 cm^{-1} y 1540 cm^{-1} (región marcada en celeste). Un aumento en la intensidad de la última banda sugirió que la plata afectó a los grupos amino del quitosano, ya que estas bandas se originaron a partir de las vibraciones de deformación del grupo NH en las aminas primarias ([Božanić y col., 2010](#); [Goudarzi y col., 2016](#)). La banda a 1450 cm^{-1} se atribuyó a la flexión del CH y a 1065 cm^{-1} al estiramiento del CO. Además, las bandas en el rango 1400-1300 cm^{-1} se atribuyeron a los grupos metileno y metilo, entre 1150 y 1025 cm^{-1} se relacionaron con el estiramiento del grupo C-O de los enlaces glucosídicos y la banda a 848 cm^{-1} con estructuras de tipo piranosa del quitosano ([Costa-Junior y col., 2009](#); [Mansur y col., 2009](#)).

La presencia de un pico ubicado a 3350 cm^{-1} en la región 3600-3000 cm^{-1} (N-H y estiramiento O-H) en el espectro de Q se transformó en una región más achatada, signo de una mayor prevalencia del grupo O-H ya que el grupo N-H estuvo involucrado en la interacción con la plata ([Nate y col., 2018](#)). Los grupos funcionales O-H y N-H tuvieron fuerte afinidad hacia los iones plata (región marcada en salmón). La diferencia en

Capítulo 2 Nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de plata

electronegatividad entre los átomos de O y N juega un papel importante ya que establece el sitio de deprotonación que puede favorecer la unión de electrones libres al metal.

La metodología PCA de las regiones espectrales $1200-800\text{ cm}^{-1}$ y $3700-2700\text{ cm}^{-1}$ permitió analizar las diferencias entre las muestras con distintas concentraciones de NpAg (Figura 2.24). Las muestras se separaron en *clusters* o grupos en los que la variabilidad fue prácticamente explicada por PC1 en más del 90% mientras PC2 representó entre el 2 y el 7% para la primera y segunda ventana espectral, respectivamente.

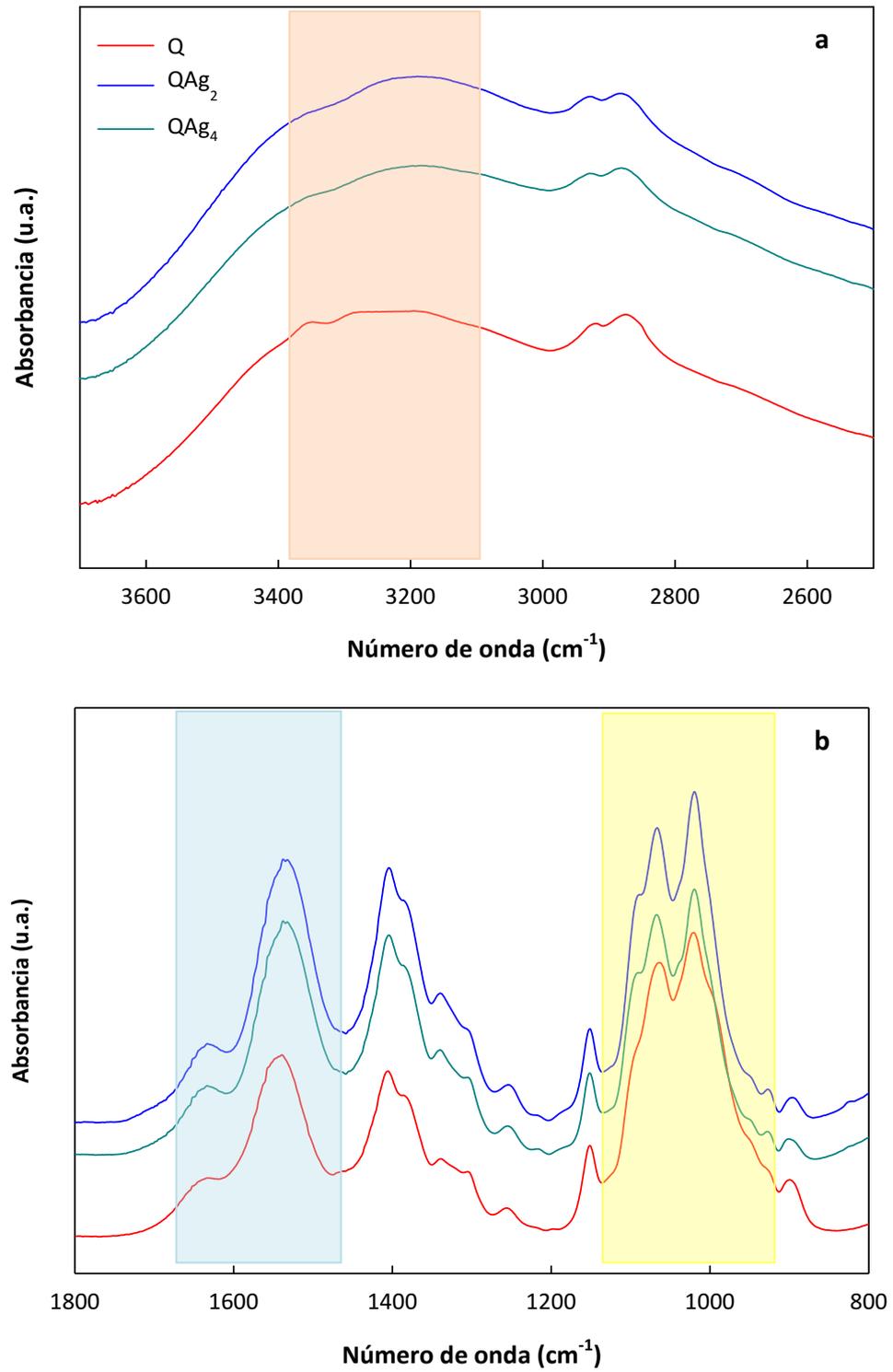


Figura 2.23. Espectros ATR-FTIR de las películas Q y de las matrices nanocompuestas QAg₂ y QAg₄ mostrando las regiones **(a)** 3600-2600 cm⁻¹ y **(b)** 1800-800 cm⁻¹.

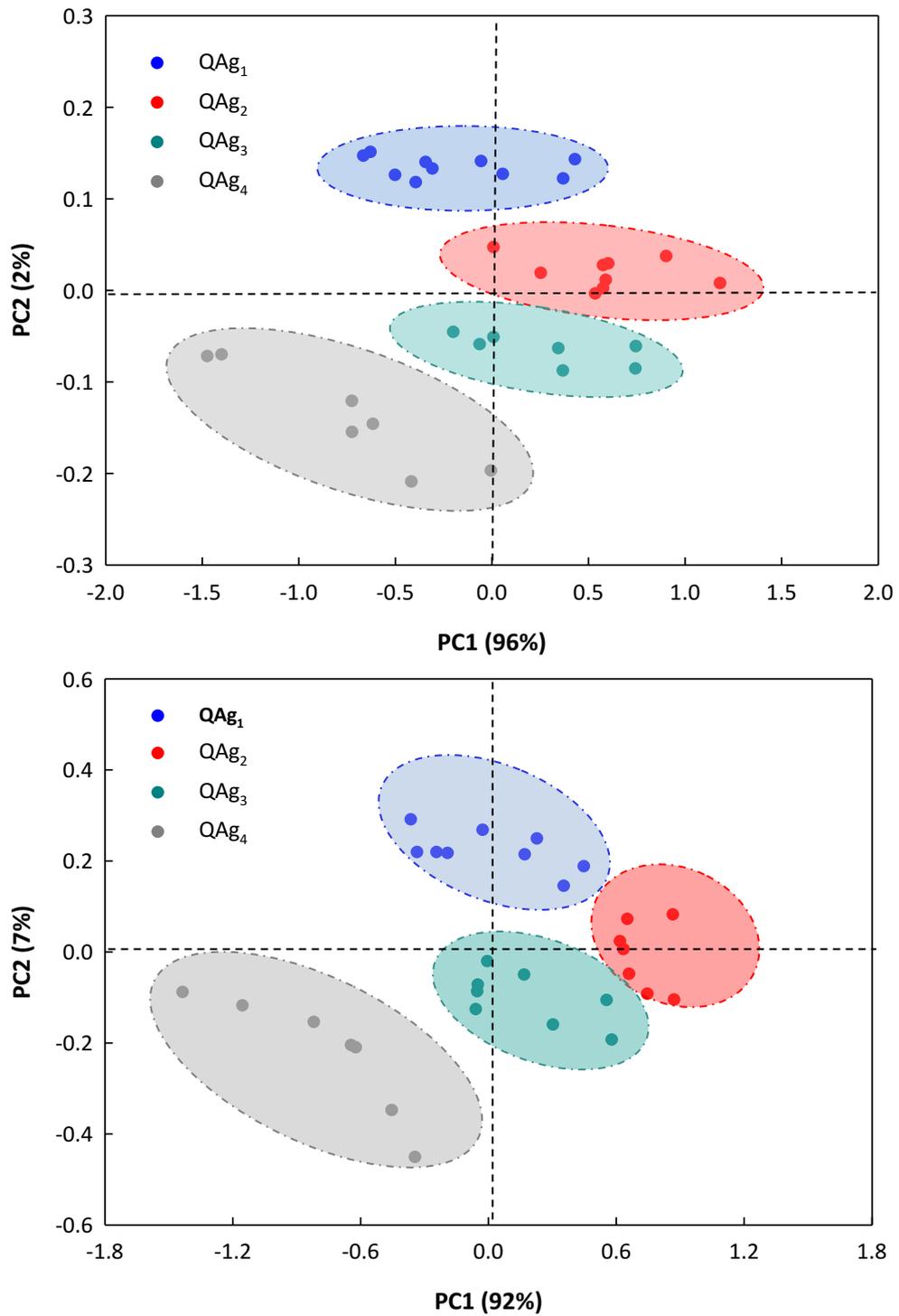


Figura 2.24. Gráfico biplot de las muestras QAg_x con distintas concentraciones de NpAg. Análisis PCA de las regiones espectrales (a) 1200-800 cm⁻¹ y (b) 3700-2700 cm⁻¹.

2.5 CONCLUSIONES

Se implementó una metodología *in situ* en un solo paso para la obtención de nanopartículas de plata usando quitosano como agente reductor y estabilizante. La presencia de plata elemental debida a la reducción de los iones plata fue probada por análisis EDS y DRX. Este enfoque se puede utilizar en la producción a gran escala de nanocompuestos de quitosano funcionalizados con nanopartículas de plata.

En las matrices nanocompuestas, la distribución de NpAg fue homogénea debido a la capacidad quelante del quitosano que impidió la aglomeración de las partículas. Asimismo, los nanocompuestos QAg presentaron buenas propiedades mecánicas y muy baja solubilidad, a la vez que el ángulo de contacto fue alto, alrededor de 90°, indicando la formación de una superficie más hidrofóbica que la de las películas de quitosano. Las interacciones establecidas entre el quitosano y las nanopartículas explicarían los cambios evidenciados en la solubilidad de las matrices.

2.6 REFERENCIAS

- Abou El-Nour, K. M. M., Eftaiha, A., Al-Warthan, A., & Ammar, R. A. A. (2010). Synthesis and applications of silver nanoparticles. *Arabian Journal of Chemistry*, 3(3), 135–140. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2010.04.008>
- Agnihotri, S., Mukherji, S., & Mukherji, S. (2014). Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5-100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Advances*, 4(8), 3974–3983. <https://doi.org/10.1039/c3ra44507k>
- Ahamed, M., Alsalhi, M.S., & Siddiqui, M.K.J. (2010). Clinica chimica acta silver nanoparticle applications and human health. *Clinica Chimica Acta*, 411(23–24), 1841–1848. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.08.016>
- Ahmad, B., Shireen, F., Bashir, S., Khan, I., & Azam, S. (2016). Green synthesis, characterisation and biological evaluation of AgNPs using *Agave americana*, *Mentha spicata* and *Mangifera indica* aqueous leaves extract. *IET Nanobiotechnology*, 10(5), 281–287. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2015.0053>
- Ahmed, S., Ahmad, M., Swami, B. L., & Ikram, S. (2016). Review A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications : A green expertise. *Journal of Advanced Research*, 7(1), 17–28. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2015.02.007>
- Alavi, M., & Rai, M. (2019). Recent progress in nanoformulations of silver nanoparticles with cellulose, chitosan, and alginic acid biopolymers for antibacterial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103 (21–22), 8669–8676. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10126-4>
- Alves, T., Souza, J. de, Rodrigues, L., Souza, R., & Pereira, L. (2019). Ecotoxicology and environmental safety silver nanoparticles : An integrated view of green synthesis methods, transformation in the environment, and toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 171, 691–700. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.12.095>
- Arjunan, N., Kumari, H. L. J., Singaravelu, C. M., Kandasamy, R., & Kandasamy, J. (2016). Physicochemical investigations of biogenic chitosan-silver nanocomposite as antimicrobial and anticancer agent. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 77–87. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.003>
- Arrieta, M. P., Sessini, V., & Peponi, L. (2017). Biodegradable poly(ester-urethane) incorporated with catechin with shape memory and antioxidant activity for food packaging. *European Polymer Journal*, 94, 111–124. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.06.047>

Capítulo 2 Nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de plata

- Auras, R., Harte, B., & Selke, S. (2004). An overview of polylactides as packaging materials. *Macromolecular Bioscience*, 4(9), 835–864. <https://doi.org/10.1002/mabi.200400043>
- Bagherzade, G., Tavakoli, M.M., & Namaei, M.H. (2017). Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of saffron (*Crocus sativus* L.) wastages and its antibacterial activity against six bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(3), 227–233. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.12.014>
- Bar, H., Bhui, D.K., Sahoo, G.P., Sarkar, P., De, S.P., & Misra, A. (2009). Green synthesis of silver nanoparticles using latex of *Jatropha curcas*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 339(1–3), 134–139. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2009.02.008>
- Basavegowda, N., & Rok Lee, Y. (2013). Synthesis of silver nanoparticles using Satsuma mandarin (*Citrus unshiu*) peel extract: A novel approach towards waste utilization. *Materials Letters*, 109, 31–33. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2013.07.039>
- Božanić, D. K., Trandafilović, L. v., Luyt, A. S., & Djoković, V. (2010). Green synthesis and optical properties of silver–chitosan complexes and nanocomposites. *Reactive and Functional Polymers*, 70(11), 869–873. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2010.08.001>
- Caswell, K. K., Bender, C. M., & Murphy, C. J. (2003). Seedless, surfactant less wet chemical synthesis of silver nanowires. *Nano Letters*, 3(5), 667–669. <https://doi.org/10.1021/nl0341178>
- Chivrac, F., Pollet, E., & Avérous, L. (2009). Progress in nano-biocomposites based on polysaccharides and nanoclays. *Materials Science and Engineering R: Reports*, 67(1), 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2009.09.002>
- Costa-Júnior, E. S., Barbosa-Stancioli, E. F., Mansur, A. A. P., Vasconcelos, W. L., & Mansur, H. S. (2009). Preparation and characterization of chitosan/ poly(vinyl alcohol) chemically crosslinked blends for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, 76(3), 472–481. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.11.015>
- Dhote, V. K., Dhote, K., Pandey, S. P., Shukla, T., Maheshwari, R., Mishra, D. K., & Tekade, R. K. (2018). Fundamentals of polymers science applied in pharmaceutical product development. In *Basic Fundamentals of Drug Delivery*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817909-3.00003-0>
- Elechiguerra, J. L., Burt, J. L., Morones, J. R., Camacho-Bragado, A., Gao, X., Lara, H. H., & Yacaman, M.J. (2005). Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *Journal of Nanobiotechnology*, 3, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-3-6>
- Fabrega, J., Luoma, S. N., Tyler, C. R., Galloway, T. S., & Lead, J. R. (2011). Silver nanoparticles: Behaviour and effects in the aquatic environment. *Environment International*, 37(2), 517–531. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2010.10.012>

Capítulo 2 Nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de plata

- Faried, M., & Shameli, K. (2016). Synthesis of silver nanoparticles via green method using ultrasound irradiation in seaweed *Kappaphycusalvarezii* media. *Research on Chemical Intermediates*, 42(12)(May 2016), 7991–8004. <https://doi.org/10.1007/s11164-016-2574-z>
- Gahlawat, G., & Choudhury, A. R. (2019). A review on the biosynthesis of metal and metal salt nanoparticles by microbes. *RSC Advances*, 9(23), 12944–12967. <https://doi.org/10.1039/c8ra10483b>
- Gajbhiye, S., & Sakharwade, S. (2016). Silver nanoparticles in cosmetics. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*, 6(1), 48-53. <https://doi.org/10.4236/jcda.2016.61007>
- Gopinath, V., Priyadarshini, S., Venkatkumar, G., Saravanan, M., & Mubarak Ali, D. (2015). Tribulus terrestris leaf mediated biosynthesis of stable antibacterial silver nanoparticles. *Pharmaceutical Nanotechnology*, 3(1), 26-34.
- Goudarzi, M., Mir, N., Mousavi-Kamazani, M., Bagheri, S., & Salavati-Niasari, M. (2016). Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles prepared from two novel natural precursors by facile thermal decomposition methods. *Scientific Reports*, 6(1), 32539. <https://doi.org/10.1038/srep32539>
- Handy, R. D., vonderKammer, F., Lead, J. R., Hassellöv, M., Owen, R., & Crane, M. (2008). The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles. *Ecotoxicology*, 17(4), 287–314. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0199-8>
- Harada, M., & Katagiri, E. (2010). Mechanism of silver particle formation during photo reduction using in situ time-resolved SAXS analysis. *Langmuir*, 26(23), 17896–17905. <https://doi.org/10.1021/la102705h>
- Hardy, J. J. E., Hubert, S., Macquarrie, D. J., & Wilson, A. J. (2004). Chitosan-based heterogeneous catalysts for Suzuki and Heck reactions. *Green Chemistry*, 6(1), 53–56. <https://doi.org/10.1039/b312145n>
- Hu, S., Cai, X., Qu, X., Yu, B., Yan, C., Yang, J., Li, F., Zheng, Y., & Shi, X. (2019). Preparation of biocompatible wound dressings with long-term antimicrobial activity through covalent bonding of antibiotic agents to natural polymers. *International Journal of Biological Macromolecules*, 123, 1320–1330. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.122>
- Hussain, J. I., Kumar, S., Hashmi, A. A., & Khan, Z. (2011). Silver nanoparticles: Preparation, characterization, and kinetics. *Advanced Materials Letters*, 2(3), 188–194. <https://doi.org/10.5185/amlett.2011.1206>

Capítulo 2 Nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de plata

- Islam, A., & Yasin, T. (2012). Controlled delivery of drug from pH sensitive chitosan/ poly (vinyl alcohol) blend. *Carbohydrate Polymers*, 88(3), 1055–1060. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.01.070>
- Jamróz, E., Kulawik, P., & Kopel, P. (2019). The effect of nanofillers on the functional properties of biopolymer-based films: A review. *Polymers*, 11(4), 1–43. <https://doi.org/10.3390/polym11040675>
- Jayaramudu, T., Varaprasad, K., Kim, H. C., Kafy, A., Kim, J. W., & Kim, J. (2017). Calcinated tea and cellulose composite films and its dielectric and lead adsorption properties. *Carbohydrate Polymers*, 171, 183–192. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.04.077>
- Jayaramudu, T., Varaprasad, K., Raghavendra, G. M., Sadiku, E. R., MohanaRaju, K., & Amalraj, J. (2017). Green synthesis of tea Ag nanocomposite hydrogels via mint leaf extraction for effective antibacterial activity. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 28(14), 1588–1602. <https://doi.org/10.1080/09205063.2017.1338501>
- Jha, A. K., Prasad, K., Prasad, K., & Kulkarni, A. R. (2009). Plant system: Nature's nano factory. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 73(2), 219–223. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.05.018>
- Kalaivani, R., Maruthupandy, M., Muneeswaran, T., HameedhaBeevi, A., Anand, M., Ramakritinan, C.M., & Kumaraguru, A. K. (2018). Synthesis of chitosan mediated silver nanoparticles (Ag NPs) for potential antimicrobial applications. *Frontiers in Laboratory Medicine*, 2(1), 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.flm.2018.04.002>
- Kanmani, P., & Rhim, J. W. (2014). Physical, mechanical and antimicrobial properties of gelatin based active nanocomposite films containing AgNPs and nanoclay. *Food Hydrocolloids*, 35, 644–652. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.08.011>
- Kraśniewska, K., Galus, S., & Gniewosz, M. (2020). Biopolymers-based materials containing silver nanoparticles as active packaging for food applications—A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3). <https://doi.org/10.3390/ijms21030698>
- Kraśniewska, K., Pobiega, K., & Gniewosz, M. (2019). Pullulan-biopolymer with potential for use as food packaging. *International Journal of Food Engineering*, 15(9), 1–14. <https://doi.org/10.1515/ijfe-2019-0030>
- Lamarra, J., Giannuzzi, L., Rivero, S., & Pinotti, A. (2017). Assembly of chitosan support matrix with gallic acid-functionalized nanoparticles. *Materials Science and Engineering C*, 79, 848–859. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.104>

Capítulo 2 Nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de plata

- Lazaridou, A., & Biliaderis, C. G. (2002). Thermo physical properties of chitosan, chitosan–starch and chitosan–pullulan films near the glass transition. *Carbohydrate Polymers*, 48(2), 179–190. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(01\)00261-2](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(01)00261-2)
- Liao, C., Li, Y., & Tjong, S. C. (2019). Bactericidal and cytotoxic properties of silver nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2). <https://doi.org/10.3390/ijms20020449>
- Liu, C., Yang, X., Yuan, H., Zhou, Z., & Xiao, D. (2007). Preparation of silver nanoparticle and its application to the determination of ct-DNA. *Sensors*, 7(5), 708–718. <https://doi.org/10.3390/s7050708>
- Mali, S., Grossmann, M. V. E., Garcia, M. A., Martino, M. N., & Zaritzky, N. E. (2002). Microstructural characterization of yam starch films. *Carbohydrate Polymers*, 50(4), 379–386. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(02\)00058-9](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(02)00058-9)
- Manimegalai, G., Shanthakumar, S., & Sharma, C. (2014). Silver nanoparticles: synthesis and application in mineralization of pesticides using membrane support. *International Nano Letters*, 4(2). <https://doi.org/10.1007/s40089-014-0105-8>
- Mansur, H. S., de S. Costa, E., Mansur, A. A. P., & Barbosa-Stancioli, E. F. (2009). Cytocompatibility evaluation in cell-culture systems of chemically crosslinked chitosan/ PVA hydrogels. *Materials Science and Engineering: C*, 29(5), 1574–1583. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.12.012>
- Mihindukulasuriya, S. D. F., & Lim, L. T. (2014). Nanotechnology development in food packaging: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 40(2), 149–167. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.09.009>
- Möller, H., Grelier, S., Pardon, P., & Coma, V. (2004). Antimicrobial and physicochemical properties of chitosan - HPMC-based films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(21), 6585–6591. <https://doi.org/10.1021/jf0306690>
- Mukherji, S., Bharti, S., Shukla, G., & Mukherji, S. (2019a). Synthesis and characterization of size- and shape-controlled silver nanoparticles. In *Physical Sciences Reviews* (Vol. 4, Issue 1). <https://doi.org/10.1515/psr-2017-0082>
- Mukherji, S., Bharti, S., Shukla, G., & Mukherji, S. (2019b). Synthesis and characterization of size- and shape-controlled silver nanoparticles. In *Physical Sciences Reviews* (Vol. 4, Issue 1). De Gruyter. <https://doi.org/10.1515/psr-2017-0082>
- Muñoz-bonilla, A., Echeverría, C., Sonseca, Á., Arrieta, M. P., & Fern, M. (2019). Bio-Based polymers with antimicrobial properties towards sustainable development. *Materials*, 12(4), 641. <https://doi.org/10.3390/ma12040641>

Capítulo 2 Nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de plata

- Muñoz-Escobar, A., & Reyes-López, S.Y. (2020). Antifungal susceptibility of *Candida* species to copper oxide nanoparticles on polycaprolactone fibers (PCL-CuONPs). *PLoS ONE*, *15*(2), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228864>
- Nair, L. S., & Laurencin, C. T. (2007). Silver nanoparticles : Synthesis and therapeutic applications. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, *3*(4), 301–316. <https://doi.org/10.1166/jbn.2007.041>
- Nate, Z., Moloto, M.J., Mubiayi, P.K., & Sibiya, P.N. (2018). Green synthesis of chitosan capped silver nanoparticles and their antimicrobial activity. *MRS Advances*, *3*(42–43), 2505–2517. <https://doi.org/10.1557/adv.2018.368>
- Noginov, M. A., Zhu, G., Bahoura, M., Adegoke, J., Small, C., Ritzo, B. A., Drachev, V. P., & Shalae, V. M. (2007). The effect of gain and absorption on surface plasmons in metal nanoparticles. *Applied Physics B: Lasers and Optics*, *86*(3), 455–460. <https://doi.org/10.1007/s00340-006-2401-0>
- Nootsuwan, N., Sukthavorn, K., Wattanathana, W., Jongrungruangchok, S., Veranitisagul, C., Koonsaeng, N., & Laobuthee, A. (2018). Development of antimicrobial hybrid materials from polylactic acid and nano-silver coated chitosan. *Oriental Journal of Chemistry*, *34*(2), 683–692. <https://doi.org/10.13005/ojc/340210>
- Ojagh, S. M., Rezaei, M., Razavi, S. H., & Hosseini, S. M. H. (2010). Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food Chemistry*, *122*(1), 161–166. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.033>
- Ortega, F., Arce, V. B., & Garcia, M. A. (2021). Nanocomposite starch-based films containing silver nanoparticles synthesized with lemon juice as reducing and stabilizing agent. *Carbohydrate Polymers*, *252*, 117208. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117208>
- Ortega, F., Giannuzzi, L., Arce, V. B., & García, M. A. (2017). Active composite starch films containing green synthesized silver nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, *70*, 152–162. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.03.036>
- Ortiz-Castillo, J. E., Gallo-Villanueva, R. C., Madou, M. J., & Perez-Gonzalez, V. H. (2020). Anisotropic gold nanoparticles: A survey of recent synthetic methodologies. *Coordination Chemistry Reviews*, *425*, 213489. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213489>
- Park, S. il, & Zhao, Y. (2004). Incorporation of a high concentration of mineral or vitamin into chitosan-based films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(7), 1933–1939. <https://doi.org/10.1021/jf034612p>
- Paul, D. R., & Robeson, L. M. (2008). Polymer nanotechnology: Nanocomposites. *Polymer*, *49*(15), 3187–3204. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2008.04.017>

Capítulo 2 Nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de plata

- Pereira dos Santos, E., Nicácio, P. H. M., Coêlho Barbosa, F., Nunes da Silva, H., Andrade, A. L. S., LiaFook, M. V., de Lima Silva, S. M., & Farias Leite, I. (2019). Chitosan/essential oils formulations for potential use as wound dressing: Physical and antimicrobial properties. *Materials*, *12*(14), 2223. <https://doi.org/10.3390/ma12142223>
- Petersson, L., & Oksman, K. (2006). Biopolymer based nanocomposites: Comparing layered silicates and microcrystalline cellulose as nanoreinforcement. *Composites Science and Technology*, *66*(13), 2187–2196. <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2005.12.010>
- Polte, J., Tuae, X., Wuithschick, M., Fischer, A., Thuenemann, A. F., Rademann, K., Kraehnert, R., & Emmerling, F. (2012). Formation mechanism of colloidal silver nanoparticles: Analogies and differences to the growth of gold nanoparticles. *ACS Nano*, *6*(7), 5791–5802. <https://doi.org/10.1021/nn301724z>
- Pulit-Prociak, J., & Banach, M. (2016). Silver nanoparticles - A material of the future...? *Open Chemistry*, *14*(1), 76–91. <https://doi.org/10.1515/chem-2016-0005>
- Ramanathan, S., & Gopinath, S. C. B. (2017). Potentials in synthesizing nanostructured silver particles. *Microsystem Technologies*, *23*(10), 4345–4357. <https://doi.org/10.1007/s00542-017-3382-0>
- Rana, D., & Matsuura, T. (2010). Surface modifications for antifouling membranes. *Chemical Reviews*, *110*(4), 2448–2471. <https://doi.org/10.1021/cr800208y>
- Rana, V. K., Pandey, A. K., Singh, R. P., Kumar, B., Mishra, S., & Ha, C. S. (2010). Enhancement of thermal stability and phase relaxation behavior of chitosan dissolved in aqueous l-lactic acid: Using “silver nanoparticles” as nano filler. *Macromolecular Research*, *18*(8), 713–720. <https://doi.org/10.1007/s13233-010-0801-9>
- Regiel, A., Irusta, S., Kyzioł, A., Arruebo, M., & Santamaria, J. (2013). Preparation and characterization of chitosan-silver nanocomposite films and their antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*. *Nanotechnology*, *24*(1). <https://doi.org/10.1088/0957-4484/24/1/015101>
- Rezazadeh, N. H., Buazar, F., & Matroodi, S. (2020). Synergistic effects of combinatorial chitosan and polyphenol biomolecules on enhanced antibacterial activity of biofunctionalized silver nanoparticles. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76726-7>
- Rivero, S., Garcia, M. A., & Pinotti, A. (2009). Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan. *Journal of Food Engineering*, *90*(4), 531–539. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.07.021>
- Rolim, W. R., Pieretti, J. C., Renó, D. L. S., Lima, B. A., Nascimento, M. H. M., Ambrosio, F. N., Lombello, C. B., Brocchi, M., de Souza, A. C. S., & Seabra, A. B. (2019). Antimicrobial activity

Capítulo 2 Nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de plata

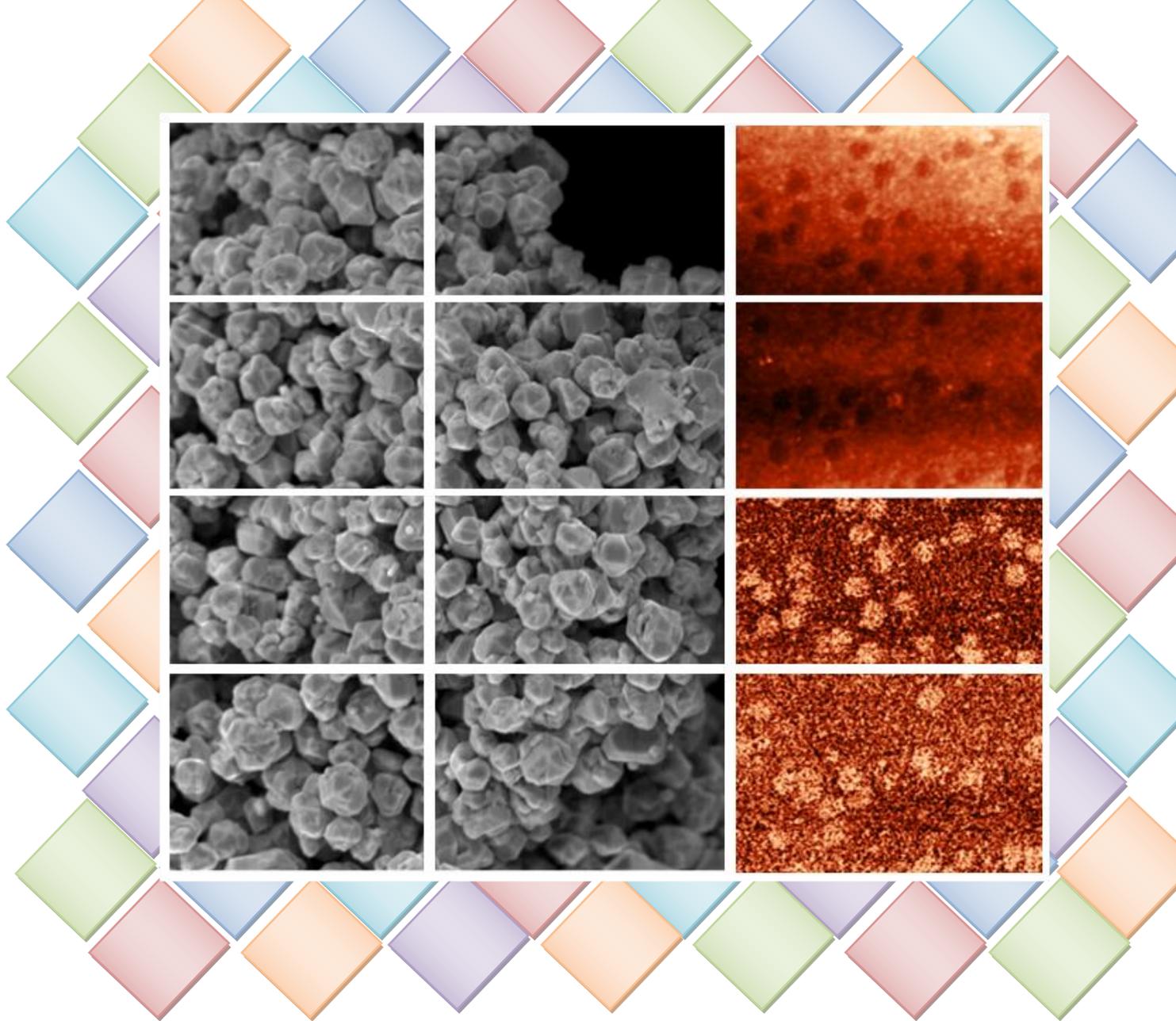
- and cytotoxicity to tumor cells of nitric oxide donor and silver nanoparticles containing PVA/PEG films for topical applications. *ACS Applied Materials and Interfaces*. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b19021>
- Salari, M., SowtiKhiabani, M., RezaeiMokarram, R., Ghanbarzadeh, B., & SamadiKafil, H. (2018). Development and evaluation of chitosan based active nanocomposite films containing bacterial cellulose nanocrystals and silver nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, *84*, 414–423. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.05.037>
- Sangsuk, S. (2010). Preparation of high surface area silver powder via Tollens process under sonication. *Materials Letters*, *64*(6), 775–777. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2010.01.013>
- Sanpui, P., Murugadoss, A., Prasad, P. V. D., Ghosh, S. S., & Chattopadhyay, A. (2008). The antibacterial properties of a novel chitosan-Ag-nanoparticle composite. *International Journal of Food Microbiology*, *124*(2), 142–146. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.004>
- Shirtcliffe, N., Nickel, U., & Schneider, S. (1999). *Reproducible Preparation of Silver Sols with Small Particle Size Using Borohydrid Reduction: For Use as Nuclei for Preparation of Larger Particles*. <http://www.idealibrary.com>
- Siracusa, V., Blanco, I., Romani, S., Tylewicz, U., Rocculi, P., & Rosa, M. D. (2012). Poly (lactic acid)-modified films for food packaging application: Physical, mechanical, and barrier behavior. *Journal of Applied Polymer Science*, *125*(S2), E390-E401. <https://doi.org/10.1002/app.36829>
- Sohn, J. H., Pham, L. Q., Kang, H. S., Park, J. H., Lee, B. C., & Kang, Y. S. (2010). Preparation of conducting silver paste with Ag nanoparticles prepared by e-beam irradiation. *Radiation Physics and Chemistry*, *79*(11), 1149–1153. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2010.06.005>
- Some, S., Kumar Sen, I., Mandal, A., Aslan, T., Ustun, Y., Yilmaz, E. Ş., Kati, A., Demirbas, A., Mandal, A. K., & Ocsoy, I. (2018). Biosynthesis of silver nanoparticles and their versatile antimicrobial properties. *Materials Research Express*, *6*(1), 012001. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/aae23e>
- Song, K. C., Lee, S. M., Park, T. S., & Lee, B. S. (2009). Preparation of colloidal silver nanoparticles by chemical reduction method. *Korean Journal of Chemical Engineering*, *26*(1), 153-155.
- Srikar, S. K., Giri, D. D., Pal, D. B., Mishra, P. K., & Upadhyay, S. N. (2016). Green synthesis of silver nanoparticles: A review. Green and sustainable chemistry. *Green and Sustainable Chemistry*, *6*, 34–56. <https://doi.org/10.4236/gsc.2016.61004>

Capítulo 2 Nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de plata

- Strayer, A., Ocoy, I., Tan, W., Jones, J. B., & Paret, M. L. (2016). Low concentrations of a silver-based nanocomposite to manage bacterial spot of tomato in the greenhouse. *Plant Disease*, 100(7), 1460–1465. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-15-0580-RE>
- Sun, Y., & Xia, Y. (2002). Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles. *Science*, 298(5601), 2176–2179. <https://doi.org/10.1126/science.1077229>
- Suriati, G., Mariatti, M., & Azizan, A. (2014). Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method: Effect of reducing agent and surfactant concentration. *International Journal of Automotive and Mechanical Engineering*, 10, 1920. <https://doi.org/10.15282/ijame.10.2014.9.0160>
- Tamayo, L., Palza, H., Bejarano, J., & Zapata, P. A. (2018). Polymer composites with metal nanoparticles: Synthesis, properties, and applications. Synthesis, properties, and applications. In *Polymer Composites with Functionalized Nanoparticles: Synthesis, Properties, and Applications*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814064-2.00008-1>
- Thanh, N. T. K., Maclean, N., & Mahiddine, S. (2014). Mechanisms of nucleation and growth of nanoparticles in solution. In *Chemical Reviews* (Vol. 114, Issue 15, pp. 7610–7630). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/cr400544s>
- Thomas, V., Yallapu, M.M., Sreedhar, B., & Bajpai, S.K. (2009). Fabrication, characterization of chitosan/ nanosilver film and its potential antibacterial application. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 20(14), 2129–2144. <https://doi.org/10.1163/156856209X410102>
- van Dong, P., Hoang Ha, C., Binh, L. T., & Kasbohm, J. (2012). *Chemical synthesis and antibacterial activity of novel-shaped silver nanoparticles*. *International Nano Letters*, 2(1), 1-9 <http://www.inl-journal.com/content/2/1/9>
- Venkatesham, M., Ayodhya, D., Madhusudhan, A., Babu, N. V., & Veerabhadram, G. (2012). A novel green one-step synthesis of silver nanoparticles using chitosan: catalytic activity and antimicrobial studies. *Applied Nanoscience*, 4(1), 113–119. <https://doi.org/10.1007/s13204-012-0180-y>
- Villarruel, S., Giannuzzi, L., Rivero, S., & Pinotti, A. (2015). Changes induced by UV radiation in the presence of sodium benzoate in films formulated with polyvinyl alcohol and carboxymethyl cellulose. *Materials Science and Engineering C*, 56, 545–554. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.07.003>
- Vimala, K., Mohan, Y. M., Sivudu, K. S., Varaprasad, K., Ravindra, S., Reddy, N. N., Padma, Y., Sreedhar, B., & MohanaRaju, K. (2010). Fabrication of porous chitosan films impregnated with silver nanoparticles: A facile approach for superior antibacterial application. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 76(1), 248–258. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.10.044>

Capítulo 2 Nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de plata

- Wei, L., Lu, J., Xu, H., Patel, A., Chen, Z. S., & Chen, G. (2015). Silver nanoparticles: Synthesis, properties, and therapeutic applications. *Drug Discovery Today*, 20(5), 595–601. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.11.014>
- Wong, L. W., Hou, C. Y., Hsieh, C. C., Chang, C. K., Wu, Y. S., & Hsieh, C. W. (2020). Preparation of antimicrobial active packaging film by capacitively coupled plasma treatment. *Lwt*, 117, 108612. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108612>
- Xia, Y., & Halas, N.J. (2005). Shape-controlled synthesis and surface plasmonic properties of metallic nanostructures. *MRS Bulletin*, 30(5), 338–348. <https://doi.org/10.1557/mrs2005.96>
- Youssef, A. M., Abou-Yousef, H., El-Sayed, S. M., & Kamel, S. (2015). Mechanical and antibacterial properties of novel high performance chitosan/ nanocomposite films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 76, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.02.016>
- Zain, N. M., Stapley, A. G. F., & Shama, G. (2014). Green synthesis of silver and copper nanoparticles using ascorbic acid and chitosan for antimicrobial applications. *Carbohydrate Polymers*, 112, 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.05.081>
- Zambrano-Zaragoza, M. L., González-Reza, R., Mendoza-Muñoz, N., Miranda-Linares, V., Bernal-Couoh, T. F., Mendoza-Elvira, S., & Quintanar-Guerrero, D. (2018). Nanosystems in edible coatings: A novel strategy for food preservation. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3). <https://doi.org/10.3390/ijms19030705>
- Zhang, Y., & Han, J. H. (2006). Plasticization of pea starch films with monosaccharides and polyols. *Journal of Food Science*, 71(6), 253–261. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00075.x>



Capítulo 3

***Nanocompuestos a base
de quitosano y NpCu***

3.1 INTRODUCCIÓN

3.1.1 Nanopartículas de cobre y matrices nanocompuestas a base de polímeros

Las nanopartículas y los materiales nanoestructurados han atraído la atención en el universo de la ciencia debido a su utilización en diversos campos. Las nanopartículas metálicas han ido ganando atención en los últimos años debido a su costo relativamente bajo y a sus propiedades antimicrobianas

Recientemente, las nanopartículas de cobre (NpCu) han sido objeto de numerosas investigaciones debido a sus aplicaciones en apósitos para heridas y propiedades biocidas (Borkow y col., 2009; Nasrollahzadeh y col., 2015), como sensores de gas, procesos catalíticos (Nasrollahzadeh y col., 2016, 2017), superconductores de alta temperatura y células solares (Guo y col., 2007; Rafique y col., 2017). Asimismo, las NpCu han sustituido a nanopartículas de oro, plata y platino en diferentes áreas como materiales conductores térmicos y aplicaciones microelectrónicas.

La síntesis de nanopartículas de cobre no ha sido tan explorada como las de otros metales debido a su naturaleza fácilmente oxidable (Sampath y col., 2014). Los problemas de agregación y oxidación pueden ser superados mediante el uso de agentes protectores como polímeros (Crooks y col., 2001) y ligandos orgánicos. Sin embargo, varios métodos han sido reportados. Nanopartículas de cobre han sido sintetizadas con éxito por descomposición térmica (Kim y col., 2006), reducción inducida por tiol en agua supercrítica (Ziegler y col., 2001), deposición por vapor (Ponce y Klabunde, 2005), sonoelectroquímica (Haas y col., 2006), pulverización con llama (Athanassiou y col., 2006) y métodos de reducción química (Chen y col., 2006). En el caso de las NpCu sintetizadas a partir de extractos vegetales podrían utilizarse como parte de la medicación, la administración selectiva de medicamentos y las aplicaciones cosméticas.

Ahmed y col. (2011) sintetizaron nanopartículas de cobre nanocristalino con morfología variable, nanocubos (50 nm), nanobarras (diámetro de 3 nm y longitud de 50 nm) y nanoesferas (5 nm) utilizando el método de microemulsión y posterior tratamiento a 400°C en atmósfera de hidrógeno. Los autores indicaron que la concentración desempeñó un papel importante en el control de la forma y el tamaño del cobre

Capítulo3: Nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de cobre

nanocristalino. Los estudios muestran que, a bajas concentraciones, las partículas esféricas (10 nm) se ensamblan en 3 dimensiones (cubos de 50 nm de lado). A concentraciones intermedias hay un conjunto ordenado en una dimensión de partículas esféricas (~3 nm) que conduce a nanobarras (3 nm de diámetro y 50 nm de longitud), mientras que a alta concentraciones hay una aglomeración aleatoria de partículas esféricas (5 nm). A baja concentración iónica, las moléculas de surfactante impiden la agregación de las partículas debido a la presencia de su larga cadena de hidrocarburos y el proceso de nucleación dando como resultado estructuras de tipo cubo. Con el aumento de la concentración iónica, las estructuras de tipo cubo se vuelven inestables y se rompen en barras. Al aumentar adicionalmente la concentración de reactivos, los tensoactivos tienden a formar agregados que podrían conducir a nanoestructuras agregadas aleatorias.

Entre los biopolímeros capaces de inmovilizar y estabilizar las nanopartículas, los polímeros a base de quitosano de origen natural son particularmente interesantes para este propósito debido a su buena biocompatibilidad, no toxicidad y biodegradabilidad (Pazos-Ortiz y col., 2017). Desde el punto de vista químico, el quitosano tiene capacidad para interactuar con iones metálicos, sustancias halógenas orgánicas y moléculas biológicas, a través de una variedad de mecanismos que incluyen quelación, atracción electrostática e intercambio iónico (Arena y col., 2017). La elección del quitosano como estabilizador de las nanopartículas de cobre se debe a su capacidad para quelar metales, lo que lo convierte en un candidato perfecto para la síntesis de Np metálicas (Huleihel y col., 2009).

El quitosano puede formar diversos enlaces químicos con componentes metálicos, mejorando así la estabilidad de las nanopartículas (Muzzarelli, 2011). Los métodos basados en la reducción química por biopolímeros ofrecen las mejores posibilidades de ser económicos y respetuosos con el medio ambiente (Zainy col., 2014). Por otra parte, las nanopartículas de Cu se han sintetizado utilizando alginato como agente estabilizador (Díaz-Visurraga y col., 2012).

Manikandan y Sathiyabama (2015) sintetizaron NpCu añadiendo solución ácida de quitosano a una solución de CuSO_4 bajo agitación durante 12 h a 70°C. La microscopía

Capítulo3: Nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de cobre

electrónica de transmisión (TEM) permitió visualizar el tamaño esférico homogéneo de las nanopartículas en el rango 20-30 nm, así como la respuesta antibacteriana contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas.

[Sampath y col. \(2014\)](#) sintetizaron NpCu usando un método de reducción verde donde la polivinilpirrolidona (PVP), el ácido L-ascórbico (AA) y la hidrazida del ácido isonicotínico (INH) se utilizaron como agente estabilizante, agente antioxidante y agente reductor, respectivamente y el agua como disolvente a 60-70°C (pH 7) en presencia de aire.

[Wang y col. \(2006\)](#) obtuvieron nanocubos de cobre utilizando ácido ascórbico como agente reductor y PVP (polivinilpirrolidona) como agente estabilizante. Los autores utilizaron un método simple en solución para la síntesis de nanocubos en presencia de PVP, que podría actuar no sólo como estabilizante sino también como controlante de forma de las nanopartículas. La integración de las nanopartículas de óxido metálico mejora sus propiedades antimicrobianas y físicas, químicas y mecánicas.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivo general

Formular nanocompuestos mediante la síntesis *verde* de nanopartículas de cobre en una solución de polivinilpirrolidona (PVP) y ácido ascórbico sometida a calentamiento. La polivinilpirrolidona se usó como estabilizante y el ácido ascórbico como agente reductor.

3.2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar las nanopartículas de cobre obtenidas en PVP
- Desarrollar matrices nanocompuestas mediante mezclas de la suspensión de nanopartículas de cobre en PVP con quitosano
- Estudiar las propiedades fisicoquímicas, mecánicas y de barrera de los nanocompuestos desarrollados
- Analizar la influencia de las relaciones Q:NpCu (QCu₁, QCu₂, QCu₃ y QCu₄) sobre las propiedades térmicas mediante DSC, DMA y TGA y las propiedades microestructurales de las matrices a través de las técnicas de ATR-FTIR, DRX, SEM, AFM

3.3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1 Síntesis de nanopartículas de cobre

Sulfato de cobre (II) pentahidratado 30 mM se solubilizó en una solución de polivinil pirrolidona (PVP) al 1% (p/v). Luego se añadió ácido ascórbico al 10% y se ajustó el pH a 7 por medio de una solución de NaOH 0.5 M. La mezcla se colocó en una estufa a 90°C durante 6 h hasta la aparición de una coloración marrón rojiza. El ácido ascórbico se utilizó como agente antioxidante para proteger las nanopartículas del proceso de oxidación. Para la preparación de todas las soluciones se usó agua de grado Milli-Q. Las suspensiones fueron sonicadas usando un Sonic Vibra-Cell.

3.3.2 Formulación de nanocompuestos a base de quitosano

A continuación, se preparó una solución de quitosano con una concentración del 1% (p/v) por solubilización en una solución de ácido acético al 1% (v/v). Las NpCu formadas en la solución de PVP precipitaron y se separaron por centrifugación. El volumen de PVP se sustituyó por un volumen equivalente de quitosano. Se comprobó a ausencia de cualquier exceso de NpCu en la solución sobrenadante por medio de espectrofotometría. En otras palabras, todos los iones Cu^{2+} presentes en el medio habían reaccionado. La solución de quitosano y las nanopartículas NpCu se mezclaron para obtener diferentes relaciones NpCu:Q (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Formulación de las suspensiones expresando la concentración de NpCu en g/ 100 g de Q (p/p) y en g/ 100 ml de solución de quitosano 1% (p/v)

Formulación	Concentración de NpCu	
	% (p/p _Q)	% (p/v)
Q	0	0
QCu ₁	1.90	0.019
QCu ₂	3.81	0.038
QCu ₃	5.72	0.057
QCu ₄	7.62	0.076

Capítulo3: Nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de cobre

Las películas y matrices nanocompuestas se obtuvieron por moldeo y secado en estufa de convección forzada a 37°C (Figura 3.1). Luego se acondicionaron en una cámara controlada a 20°C y 65% de humedad relativa (HR) antes de realizar los análisis.

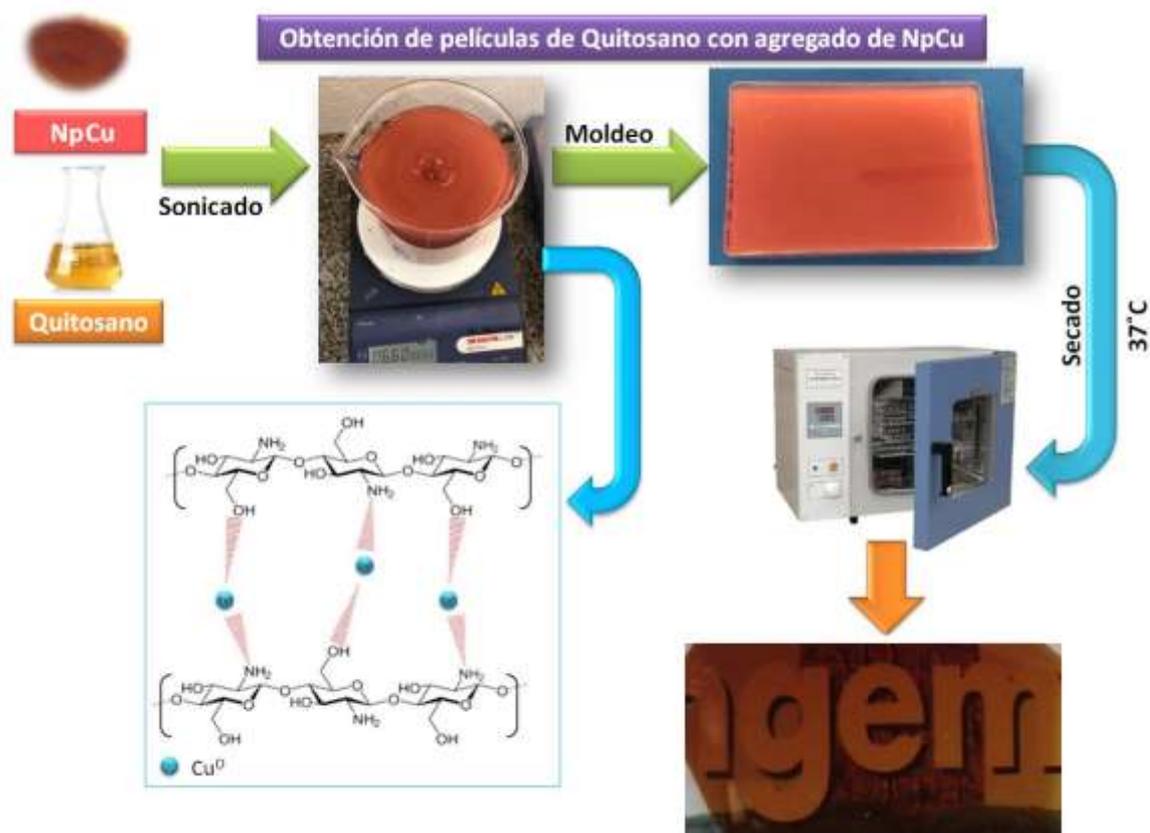


Figura 3.1. Descripción de las etapas en la obtención de las matrices nanocompuestas a partir de la solución filmogénica de quitosano con NpCu por la técnica de secado en estufa con convección forzada.



Figura 3.2. Fotografías mostrando las suspensiones de quitosano con nanopartículas formuladas con diferentes proporciones Np:Q mostradas en la [Tabla 3.1](#).

Las películas nanocompuestas fueron etiquetadas como QCu_x , con $x = 1, 2, 3, 4$, respectivamente, indicando concentraciones crecientes de NpCu ([Figura 3.2](#)).

3.3.3 Caracterización de las nanopartículas de cobre

La caracterización de las nanopartículas de cobre se realizó según la metodología descrita en el [Capítulo 2](#).

3.3.4 Caracterización de matrices a base de quitosano

Las matrices de los nanocompuestos obtenidas se caracterizaron por sus propiedades mecánicas, solubilidad, ángulo de contacto, permeabilidad al vapor de agua, propiedades mecánicas, análisis térmico, ensayos DRX y ATR-FTIR. El análisis microscópico se realizó usando SEM, TEM y AFM. Parte de la metodología fue descrita en el [Capítulo 2](#).

Análisis AFM

La topografía superficial se evaluó utilizando un microscopio de fuerza atómica AFM-NT-MDT-SMENA Solver Pro/electroiman long. 0:35 en condiciones atmosféricas y sin contacto. Las muestras fueron barridas a diferentes escalas 100, 50, 20, 10, 5, 3 y 1 μm y posteriormente analizadas.

Espectroscopía de tiempo de vida media de aniquilación de positrones (PALS)

Para los ensayos, se utilizaron especímenes circulares con un espesor en el rango 1.3-1.5 mm para asegurar la aniquilación de los positrones, los cuales se ubicaron en los extremos de una fuente de ^{22}Na embebida en un alambre de Kapton. Los tiempos de vida

media se cuantificaron empleando un sistema rápido-rápido de coincidencias convencionalmente utilizado en espectroscopía nuclear con dos detectores plásticos. El tiempo de resolución (definido como el ancho a mitad del máximo, FWHM) fue de 260 ps y se acumularon 3x60 cuentas luego de cada espectro (Rivero y col., 2016). Cada muestra se midió tres veces con un espectro de tiempo de vida individual teniendo 3×10^6 cuentas integradas.

Del análisis se obtuvieron dos tiempos de vida discretos y uno continuo correspondiente al componente de vida larga. Este tiempo de vida larga da el tiempo de vida del orto-positronio (o-Ps) representado por una distribución continua de $1/\tau_3$. El espectro de tiempo de vida del positronio se analizó usando el programa POSITRONFIT dando las componentes discretas de tiempo de vida (τ_1 , τ_2 y τ_3). Usualmente la tercera componente de tiempo de vida (τ_3) está asociada con el radio de los sitios de volumen libre y la intensidad I_3 está vinculada con la concentración de estos sitios (Muramatsu y col., 2001; Peng y col., 2007).

Técnicas quimiométricas PCA y PLS

El análisis de componentes principales (PCA) es una técnica multivariante. Se utiliza cuando se tiene una matriz de datos con un elevado número de variables con el objetivo de reducir la matriz de datos y transformar las variables en otras variables, siendo estas últimas las denominadas componentes principales, que son combinaciones lineales de las variables originales, donde se recoge la mayor parte de la información relevante contenida en los datos. La cantidad de información que contiene cada componente viene determinada por la varianza; cuanto mayor sea la varianza, más información posee esta componente. Para evaluar las diferencias espectrales entre las muestras que contenían distintas proporciones de nanopartículas, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) en los espectros ATR-FTIR en el rango de 1700-1400 cm^{-1} . Teniendo en cuenta las diferencias espectrales asociadas a la presencia de nanopartículas de cobre en el gráfico de puntuaciones del PCA, se calibró un modelo PLS para determinar la relación entre la concentración de NpCu y la absorbancia correspondiente a 900 cm^{-1} .

El análisis multivariado y el procesamiento de datos se realizaron en los espectros ATR-FTIR, utilizando el software The Unscrambler® (versión 8, CAMO, Noruega).

3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.4.1. Caracterización de las nanopartículas

Formación de las nanopartículas de cobre

El mecanismo propuesto para la síntesis de las nanopartículas de cobre se muestra en la [Figura 3.3](#). La estructura de PVP tiene un esqueleto de polivinilo con nitrógeno y grupos polares de oxígeno (C=O), que pueden ocupar los orbitales híbridos del ion cobre para formar un complejo PVP-Cu²⁺ ([Giuffrida y col., 2008](#)). Asimismo, la propiedad antioxidante del ácido ascórbico se atribuye a su capacidad para captar radicales libre y especies reactivas de oxígeno ([Yu y col., 2009](#)), acompañadas de la donación de electrones para dar el compuesto semihidro ascorbato ([Sampath y col., 2014](#)).

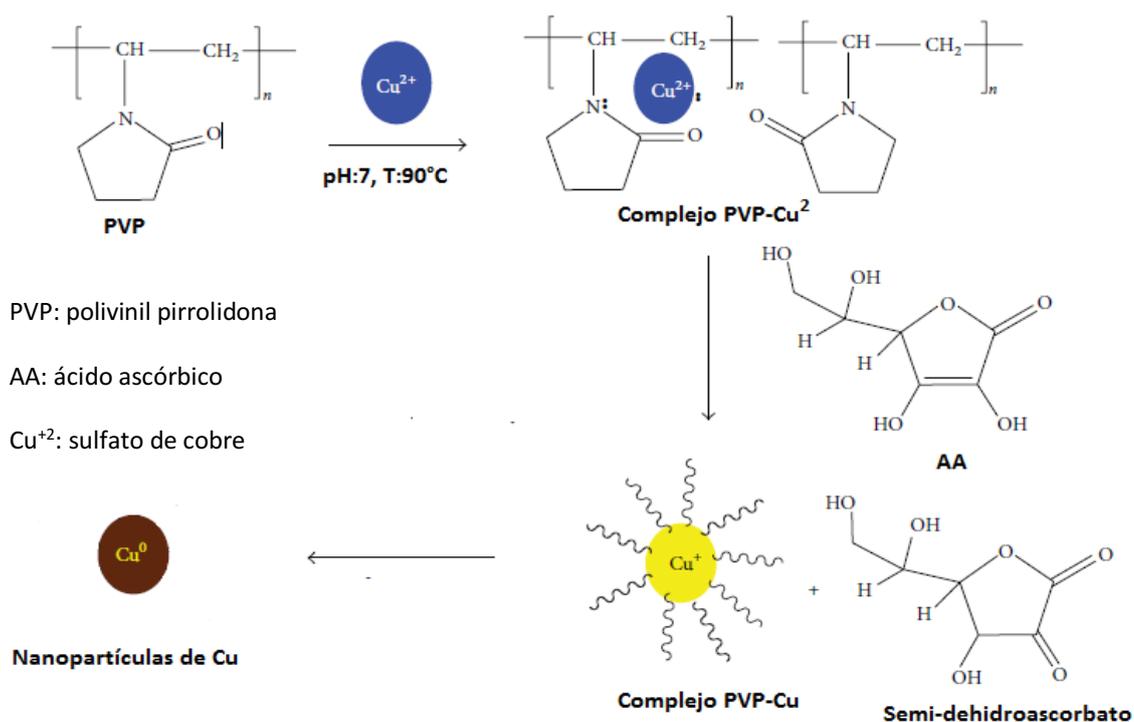


Figura 3.3. Mecanismo de formación de nanopartículas de cobre (NpCu). El CuSO₄ forma un complejo con PVP a pH 7 y 90°C. La solución se torna amarilla después de la adición de AA, lo que indica la formación de Cu (I) y después marrón rojizo, indicando la formación de nanopartículas de cobre. Adaptado de [Sampath y col. \(2014\)](#).

La reducción de sulfato de cobre a nanopartículas de cobre se monitoreó por medio de espectroscopía UV-Vis en el rango 400-700 nm ([Figura 3.4](#)).

Capítulo 3: Nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de cobre

La formación del NpCu fue confirmada por la detección del pico correspondiente a la resonancia del plasmón superficial (SPR) a 560 nm, que se atribuyeron a la transición d-d de los iones Cu^{2+} (Atkins, y col., 2009; Tokarek y col., 2013). Asimismo, según Morioka y col. (2016), este pico derivó de la SPR de las NpCu. No se observaron bandas de absorción características del óxido de cobre que aparecen alrededor de 700-800 nm.

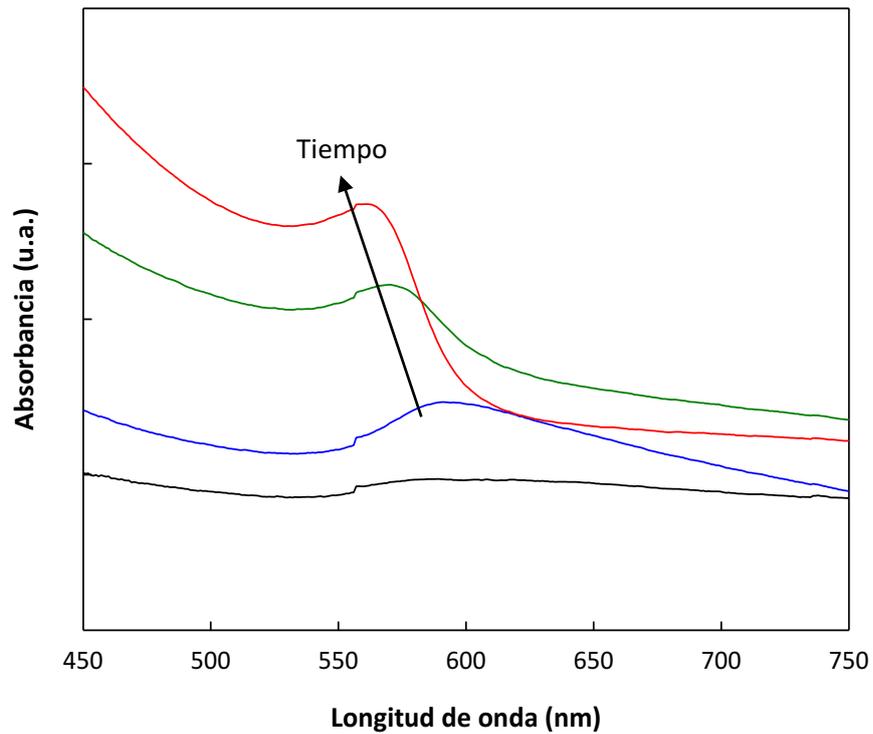


Figura 3.4. Síntesis de las nanopartículas de Cu en función del tiempo.



Figura 3.5. Fotografía de la suspensión de PVP 1% mostrando la formación de las nanopartículas de cobre

Capítulo3: Nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de cobre

Las muestras de las suspensiones se retiraron de la estufa cada 15 min, detectando la formación de las NpCu después de un calentamiento a 90°C durante 3 h por la aparición de una coloración marrón rojiza (Figura 3.5).

Caracterización de las nanopartículas por SEM y TEM

Para evaluar la composición química, tamaño y morfología de la superficie de las NpCu se usó microscopía SEM combinada con espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDS).

La morfología de las nanopartículas obtenidas puede verse en la Figura 3.6a que muestra NpCu exhibiendo tamaños heterogéneos con una forma facetada (Jayaramudu y col., 2019).

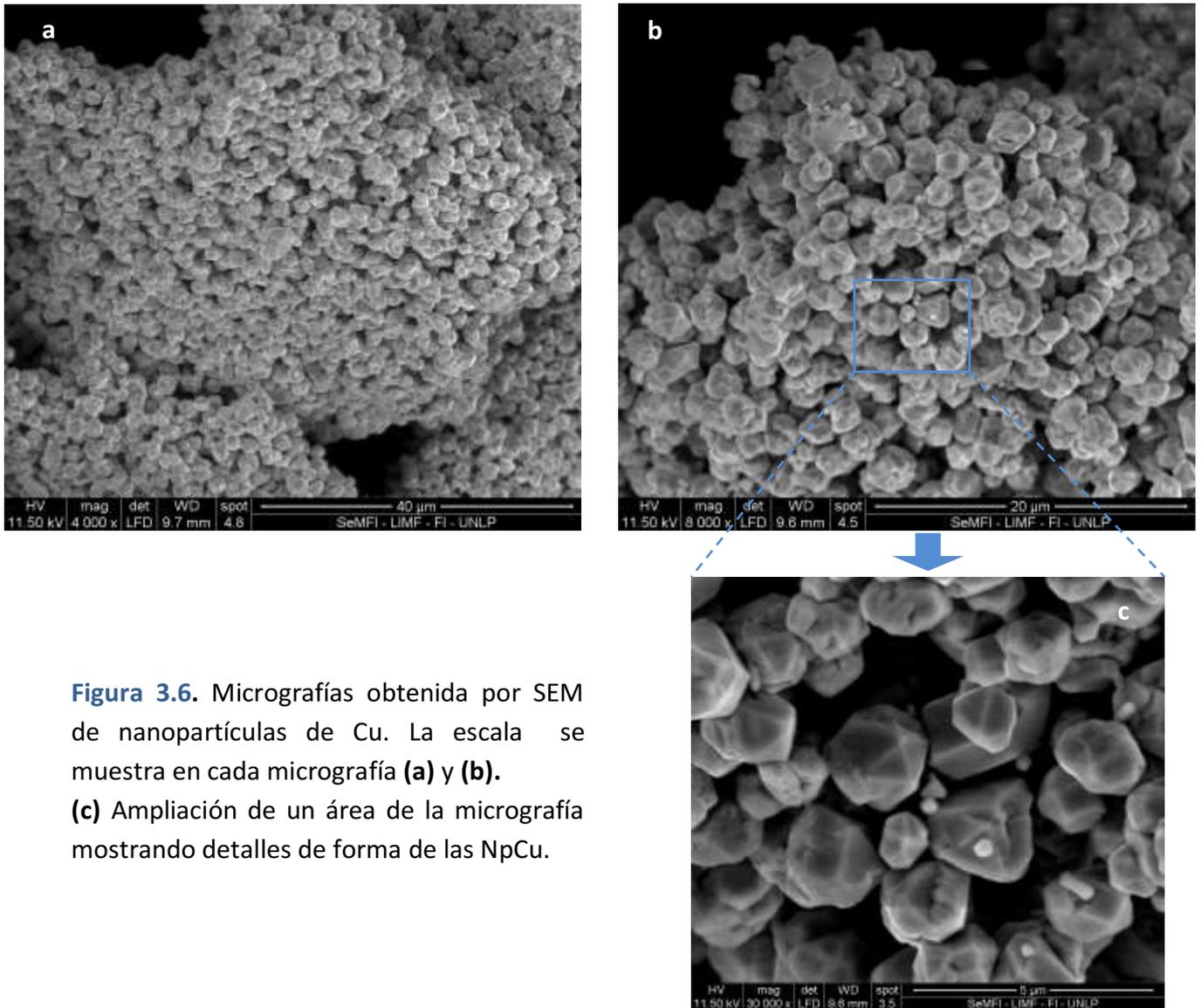


Figura 3.6. Micrografías obtenida por SEM de nanopartículas de Cu. La escala se muestra en cada micrografía (a) y (b). (c) Ampliación de un área de la micrografía mostrando detalles de forma de las NpCu.

La morfología de las nanopartículas observadas por SEM mostró NpCu cristalinas facetadas poliédricas con tamaños heterogéneos como puede observarse en la [Figura 3.6c](#).

Para partículas de pequeño tamaño, las facetas tienden a formarse en la superficie y luego componen un poliedro ([Figura 3.7](#)). Los metales generalmente tienen estructura cristalina cúbica centrada en las caras (fcc) ([Guisbiers y Abudukelimu, 2013](#))

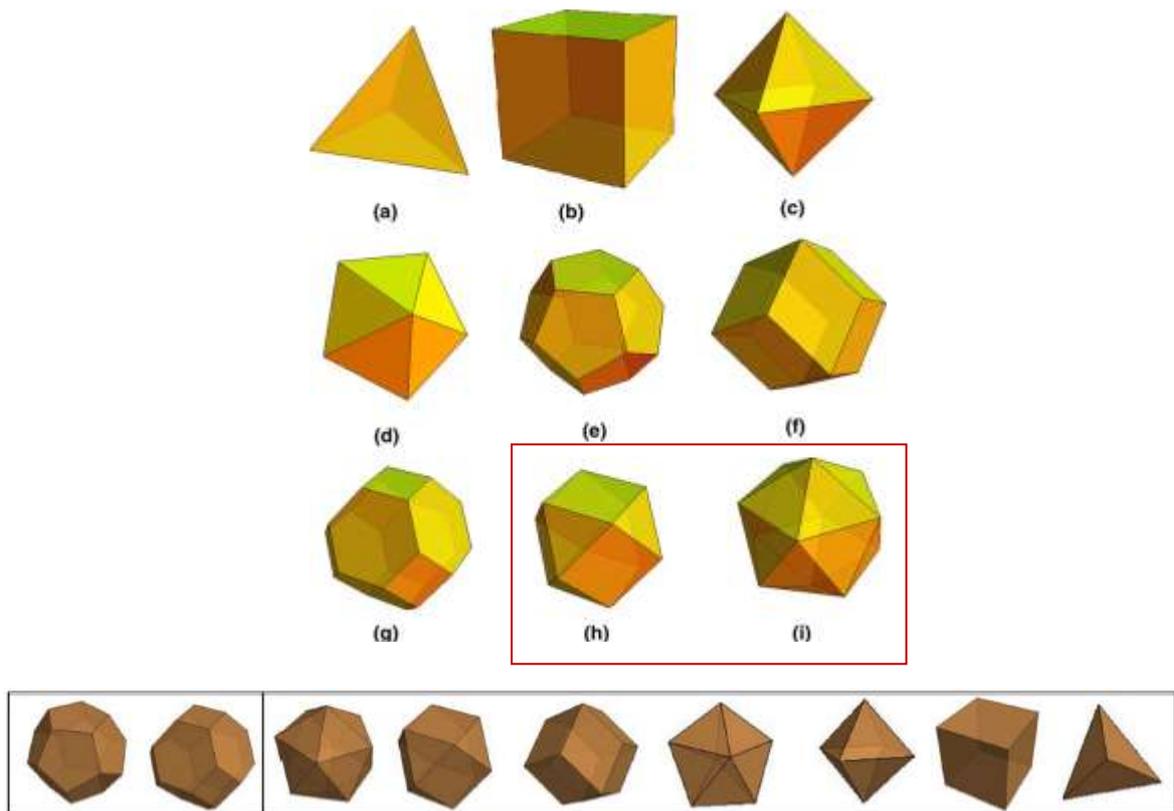
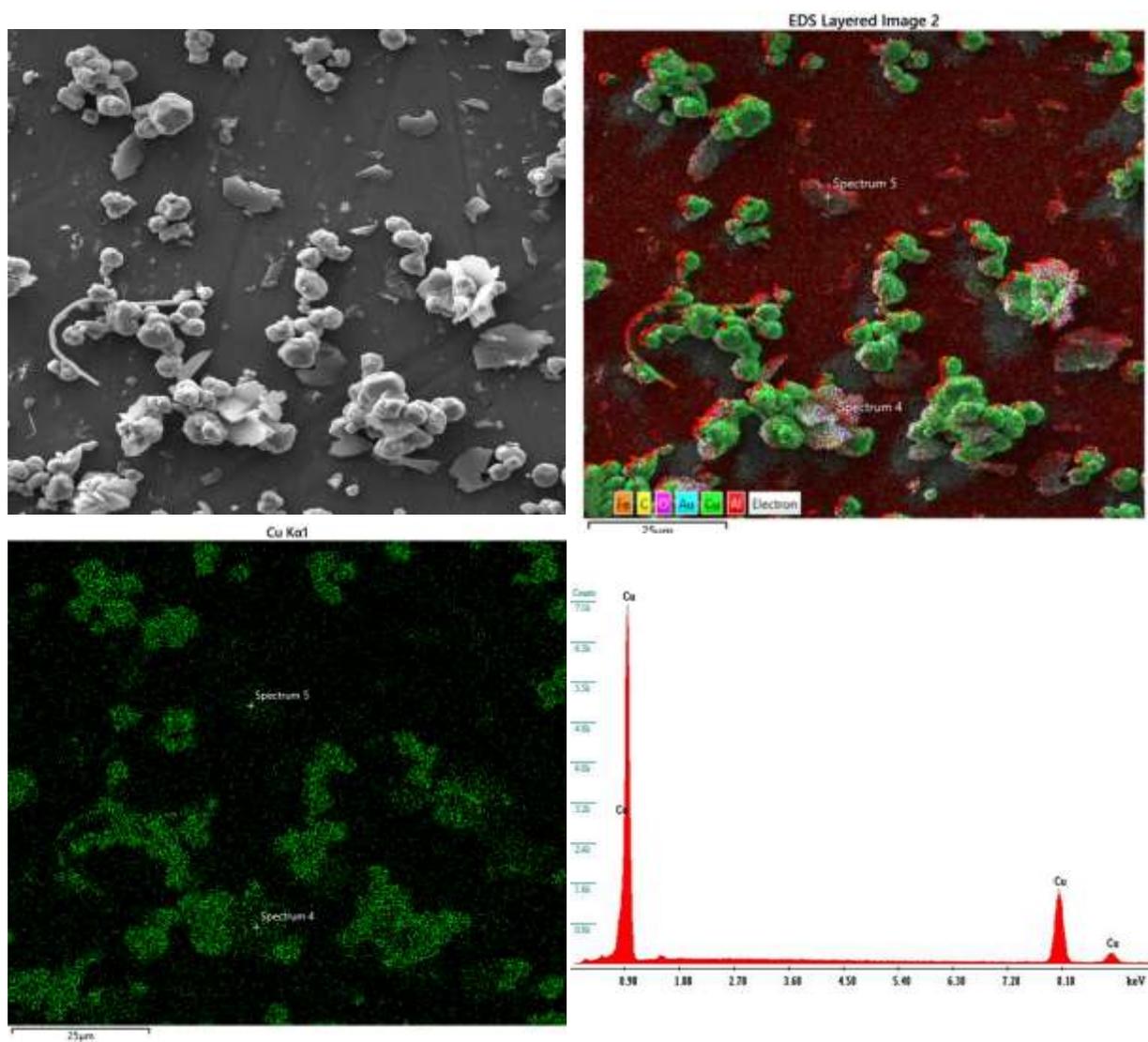


Figura 3.7. Formas de nanopartículas: a) tetraedro, b) cubo, c) octaedro, d) decaedro, e) dodecaedro, f) rómbico dodecaedro, g) octaedro truncado, h) cuboctaedro y i) icosaedro. Secuencia de formas preferidas de NpCu (izquierda a derecha). Adaptado de [Guisbiers y Abudukelimu \(2013\)](#).

La [Figura 3.8](#) y la [Tabla inserta](#) muestran el análisis de la composición de las suspensiones de PVP con nanopartículas. El espectro EDS fue útil para determinar la composición elemental de las suspensiones deshidratadas de las nanopartículas, mostrando señales a energías de enlace de 0.98, 8.09 y 8.99 keV, que confirmaron la presencia de cobre ([Karp y col., 2003](#); [Kumari y col., 2019](#)). El análisis a través de EDS

mostró una composición muy homogénea con una presencia casi insignificante de oxígeno. Jayaramudu y col. (2019) y Tokarek y col. (2013) informaron resultados similares.



Mapa del espectro total

Elemento	Línea	Peso %	Atómico %
Al	K series	59.00	66.13
Cu	K series	20.91	9.95
Au	M series	9.36	1.44
O	K series	4.96	9.38
C	K series	5.10	12.84
Fe	K series	0.25	0.14

Figura 3.8. Análisis EDS mostrando una imagen electrónica de las NpCu con su correspondiente imagen estratificada y el mapeo del Cu. Mapa del espectro total y Tabla mostrando la composición.

Capítulo3: Nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de cobre

Asimismo, la formación de NpCu fue confirmada por microscopía TEM. La medida fue mucho más pequeña a la obtenida por DLS que dió un valor promedio de 110 nm. Este fenómeno fue debido a que la determinación por DLS tuvo en cuenta el radio hidrodinámico de las nanopartículas.

La [Figura 3.9](#) muestra micrografías obtenidas por TEM de nanopartículas en una solución de PVP al 1%, con un tamaño medio de 16.2 nm obtenidas por ajuste de una curva normal, dispersas y sin formación de aglomerados. Según [Cárdenas y col. \(2009\)](#), en los nanocompuestos el Cu coloidal estaría recubierto con una fina capa de PVP, enmascarando así la influencia de las fuerzas van der Waals y evitando la aglomeración de las partículas. El PVP actúa como un agente protector y probablemente el polímero envuelve los *clusters* de cobre a través de la donación parcial del par de electrones del oxígeno de los grupos C=O a los orbitales vacantes de la superficie de los *clusters*. La distribución de tamaños de las NpCu, mostrada en el histograma de la [Figura 8d](#), exhibió la frecuencia más alta correspondiente a tamaños entre 15 y 20 nm seguida de tamaños entre 5 y 15 nm. Los resultados obtenidos fueron similares a los informados por [Cárdenas y col. \(2009\)](#) para matrices poliméricas estabilizadas con nanopartículas metálicas, que presentaron tamaños de partículas entre 5 y 10 nm.

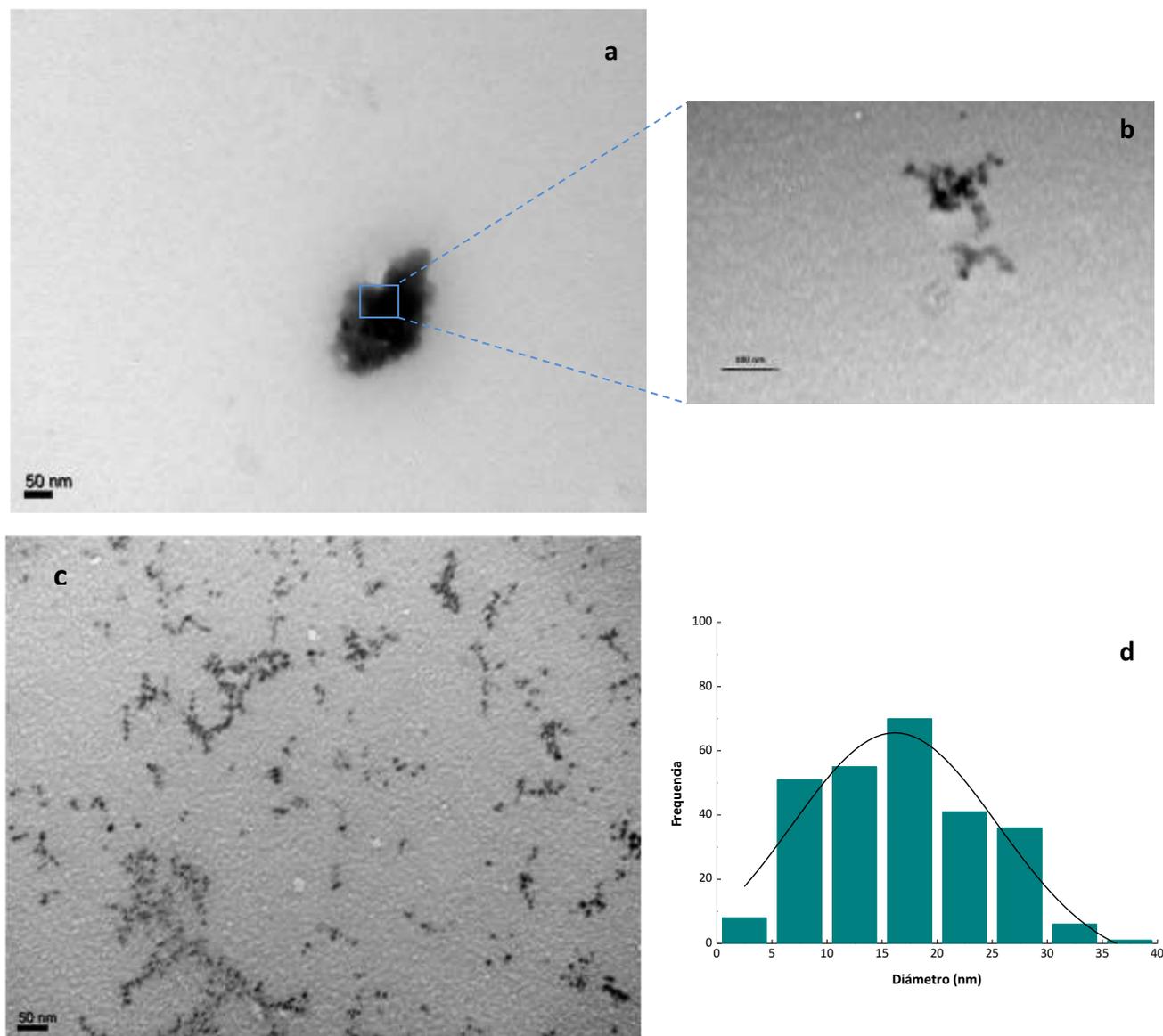


Figura 3.9. Micrografías obtenidas por TEM de nanopartículas de cobre en agua de grado Milli Q **(a)**, magnificación de una zona mostrando las NpCu **(b)**. NpCu inmersas en una solución de PVP al 1%, **(c)** e histograma mostrando la distribución de tamaño de las nanopartículas **(d)**. La escala se muestra en cada micrografía.

Difracción de RX de NpCu

Por otra parte, los difractogramas de las nanopartículas de cobre obtenidos por DRX fueron analizados con el programa X'Pert HighScore Plus al igual que en el caso de las NpAg determinando el *background* y los parámetros de pico como intensidad, ancho,

posición y forma. Luego se empleó la ecuación de Debye-Scherrer (Kaviyarasu y col., 2015; Lamarra y col., 2017).

Para el cálculo se utilizaron los picos de difracción correspondiente a los planos (111), (200) y (220), ya que estos picos estuvieron bien resueltos y no mostraron interferencias (Figura 3.9 y Tabla 3.2). El tamaño del cristalito arrojó un valor medio de 5.5 nm.

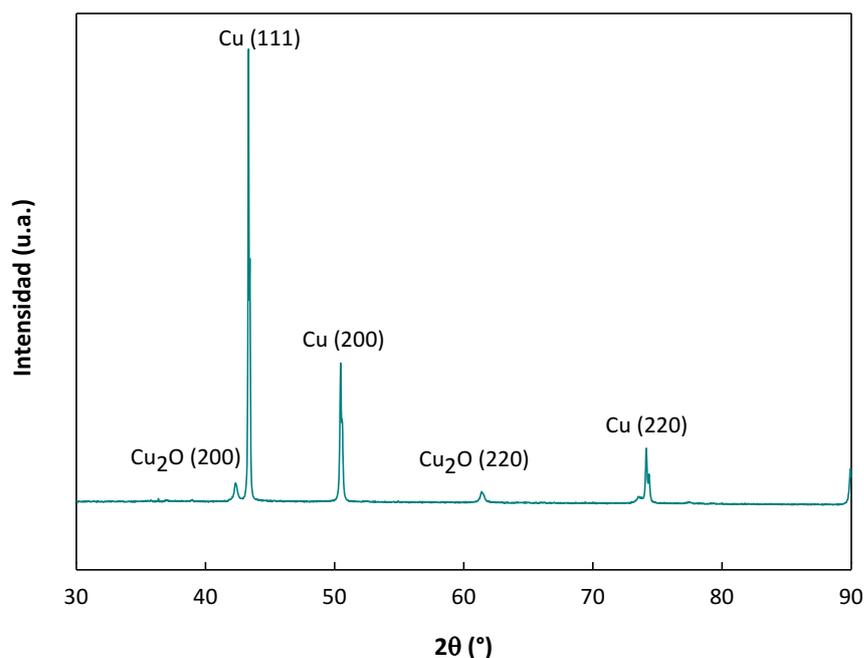


Figura 3.10. Patrón de difracción de RX de nanopartículas de cobre obtenidas usando una solución de PVP 1% y ácido ascórbico como agente reductor.

Los tres picos localizados a $2\theta = 43.4, 50.5$ y 74.2° correspondieron a los planos (111), (200) y (220), respectivamente. Estos planos pertenecen a la estructura cúbica centrada en las caras (CCC) de cobre metálico de la carta cristalográfica de referencia JCPDS No. 04-0836 (Tabla 3.2). Pequeños picos de difracción ubicados en 42.3° y 61.4° fueron asignados a los planos (200) y (220) distintivos de las nanopartículas Cu_2O (Figura 3.9). La presencia de Cu_2O indicó la oxidación parcial de nanopartículas de cobre con oxígeno disuelto en la solución durante el proceso de secado para la obtención del polvo. Según Khalid y col. (2015), las nanopartículas de cobre combinadas con el oxígeno presente en la atmósfera ambiente forman una capa de óxido en la superficie de las partículas cuando se exponen al aire.

Capítulo 3: Nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de cobre

La [Tabla 3.2](#) muestra el ángulo de difracción de rayos X obtenido experimentalmente ($2\theta_{hkl}$) y la separación interplanar d_{hkl} , así como los valores teóricos del espécimen de Cu (con $n=1$ y $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$).

Tabla 3.2. Valores teóricos y experimentales del ángulo de difracción de rayos X ($2\theta_{hkl}$) y separación interplanar d_{hkl} de las nanopartículas de Cu para índices de Miller (h k l) (con $n=1$ y $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$).

h k l	d_{hkl} (Å)	$2\theta_{hkl}$ (°)	d_{exp} (Å)	$2\theta_{exp}$ (°)	Tamaño cristalito (nm)
1 1 1	2.078	43.5	2.087	43.35	6.69
2 0 0	1.800	50.6	1.809	50.46	4.86
2 2 0	1.274	74.5	1.278	74.18	5.11

Como ya se explicó, la estructura cristalina de cobre fue cúbica centrada en las caras, con un borde de celda unitario $a = 3.60 \text{ \AA}$. La determinación de las posiciones de $2\theta_{hkl}$ de los tres primeros picos en el patrón de difracción y el d_{hkl} de separación interplanar para cada pico se calculó como se explica a continuación.

Espectro de fluorescencia de la suspensión de NpCu en quitosano

La [Figura 3.11](#) muestra el espectro de fluorescencia de emisión de las nanopartículas de cobre cuando la excitación se produjo a una longitud de onda de 380 nm. Resultados similares fueron informados por [Liu y col. \(2007\)](#).

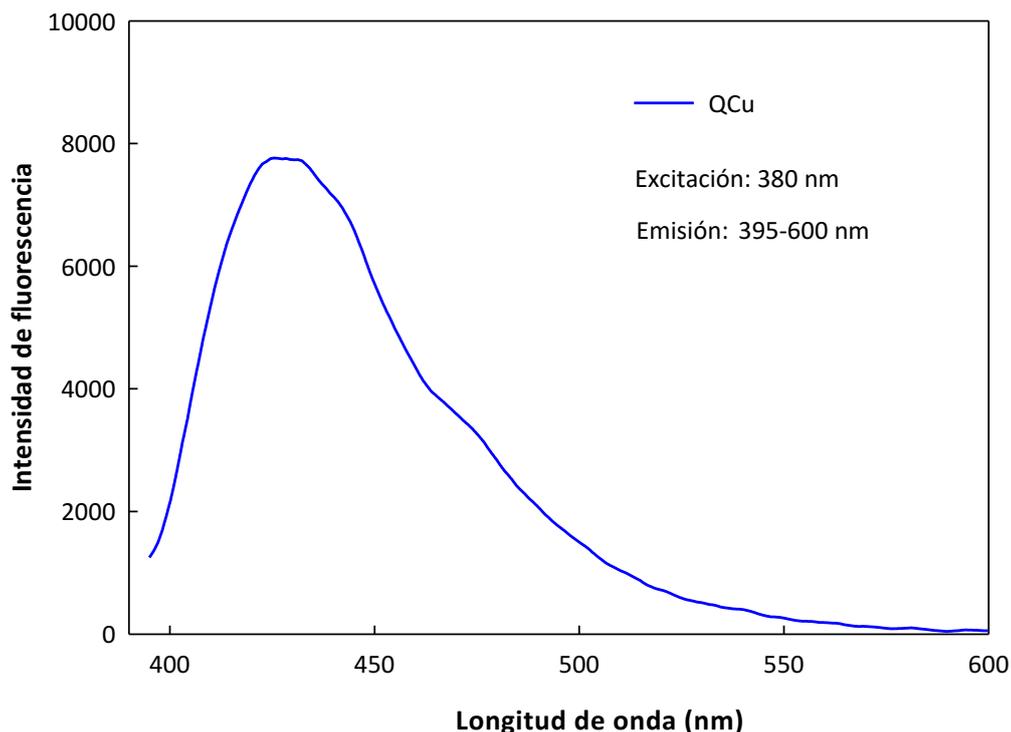


Figura 3.11. Espectro de fluorescencia de nanopartículas de cobre en quitosano obtenidas usando una solución de PVP 1% como agente reductor.

3.4.2 Caracterización de los nanocompuestos QCu

Propiedades de resistencia al agua de los nanocompuestos QCu

La resistencia al agua es un parámetro funcional esencial de las matrices de biopolímeros. Como es bien conocido la solubilidad, la humedad, la permeabilidad al vapor de agua y el ángulo de contacto se utilizan comúnmente para evaluar la resistencia al agua de las matrices (Alizadeh-Sani y col., 2018; Hosseini y col., 2016).

La [Tabla 3.3](#) muestra los valores de humedad, solubilidad, ángulo de contacto y permeabilidad al vapor de agua (WVP) de los nanocompuestos denominados QCu_x.

Los valores de solubilidad disminuyeron significativamente ($p < 0.05$) con el aumento de la concentración de NpCu en relación con la solubilidad de la película Q debido a la relación entre las dimensiones y las áreas cristalinas de los rellenos (Alizadeh-Sani y col., 2018; Chen y col., 2009). En el mismo sentido, Oleyaei y col. (2016) expresaron que la

reducción de la solubilidad de la matriz podría atribuirse a la baja solubilidad de las nanopartículas en comparación con las cadenas poliméricas.

Según Noshirvani y col. (2018), la menor solubilidad de los nanocompuestos sería consecuencia de la generación de una red tridimensional entre los *clusters* de Cu, el PVP y el Q que llevó a la formación de un nanocompuesto con más resistencia al agua. La misma tendencia se observó en las películas de kefirán con Np de Al₂O₃ y en las películas de kefirán-carboximetilcelulosa con Np de CuO (Hasheminya y col., 2019; Moradi y col., 2019). Por otra parte, se observó un aumento significativo de la humedad ($p < 0.05$) con la incorporación de NpCu en mayores concentraciones.

La determinación del WVP juega un papel predominante en la conservación de los alimentos y la vida útil de los mismos (Lizundia y col., 2017). Los valores de la WVP de los nanocompuestos con mayores proporciones de NpCu (NpCu₃ y NpCu₄) resultaron significativamente diferentes en lo que respecta a Q, QCu₁ y QCu₂ ($p < 0.05$).

Tabla 3.3. Humedad, solubilidad, ángulo de contacto y permeabilidad al vapor de agua (WVP) de las matrices de quitosano funcionalizadas con nanopartículas de cobre

Formulación	Humedad %	Solubilidad %	Hinchamiento %	WVPx10 ¹¹ (g m ⁻¹ s ⁻¹ Pa ⁻¹)
Q	18.3 (1.3) ^a	52.2 (3.1) ^c	370 (23) ^d	5.1 (0.2) ^b
QCu ₁	27.1 (1.1) ^c	8.7 (1.0) ^b	169 (13) ^b	5.3 (0.5) ^b
QCu ₂	23.5 (1.2) ^{b,c}	6.6 (0.4) ^{a,b}	103 (4) ^a	5.4 (0.3) ^b
QCu ₃	23.0 (1.8) ^{b,c}	3.4 (0.2) ^a	142 (5) ^b	2.7 (0.1) ^a
QCu ₄	21.8 (1.4) ^{a,b}	2.9 (0.2) ^a	322 (30) ^c	3.5 (0.1) ^a

(a,b,c) Diferentes letras indican diferencias significativas entre las formulaciones ($p < 0.05$).

Q: Quitosano 1%

QCu_x: nanocompuestos de quitosano 1% y nanopartículas de cobre, donde la x indica la concentración de NpCu

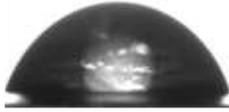
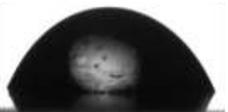
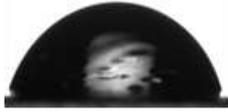
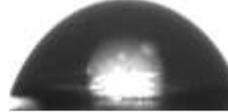
Cárdenas y col. (2009) informaron resultados similares y atribuyeron este hecho a la interacción de enlace de hidrógeno entre el quitosano y la esfera de disolución, lo que

evita la disponibilidad de grupos hidroxilo del Q para interactuar con el agua, y al incremento de la tortuosidad que dificulta la transferencia de materia afectando así la difusión y por ende la permeabilidad (Tabla 3.3).

El ángulo de contacto de los nanocompuestos no difirió significativamente ($p>0.05$) del ángulo de la película Q. Sin embargo en $r=R$ se pudo observar una separación entre la gota y la superficie de las películas nanocompuestas, revelando una característica más hidrofóbica de los nanocompuestos que no se tradujo en un aumento del ángulo como consecuencia de la naturaleza cristalina de las NpCu (Tabla 3.4). Estos hallazgos están en concordancia con los informados por Rhim y col. (2013) y Shankar y col. (2014).

La película Q individual mostró una tendencia al hinchamiento mayor que la de las matrices nanocompuestas QCu. Esto se debió al entrecruzamiento y estrechamiento entre las cadenas poliméricas, lo que condujo a una estructura rígida y evitó la penetración de las moléculas de agua. La capacidad de hinchamiento de las películas nanocompuestas se redujo debido a la formación del enlace de coordinación entre los grupos funcionales del quitosano y las NpCu (Jayaramudu y col., 2019). Además, el comportamiento de hinchamiento depende de otros factores como el contenido de relleno, la reticulación y la porosidad (Jayaramudu y col., 2017).

Tabla 3.4 Ángulo de contacto de las matrices compuestas de quitosano con agregado distintas proporciones de nanopartículas de cobre (NpCu)

Ángulo de contacto de matrices a base de quitosano con nanopartículas de Cu				
				
72.8 (1.3) ^a	68.5 (4.3) ^a	69.8 (3.4) ^a	68.2 (3.8) ^a	68.1 (1.9) ^a
Q	QCu ₁	QCu ₂	QCu ₃	QCu ₄

^a Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas ($p<0.05$)

Propiedades ópticas

Como puede observarse en la [Tabla 3.5](#), la incorporación de nanopartículas de Cu a matrices de quitosano produjo diferencias significativas en los parámetros de color a^* , b^* y L^* ($p < 0.05$) que no experimentaron mayores cambios con concentraciones crecientes de NpCu ($p > 0.05$). La misma tendencia se observó en el caso del índice de pardeamiento ([Tabla 3.5](#)). Cuando se analizó la diferencia total de color ΔE^* , también hubo un aumento con la concentración de NpCu que se acentuó a medida que se incorporaron mayores concentraciones ([Figura 3.12](#) y [Tabla 3.5](#)). Una tendencia similar se observó en los parámetros de color de los nanocompuestos QAg.

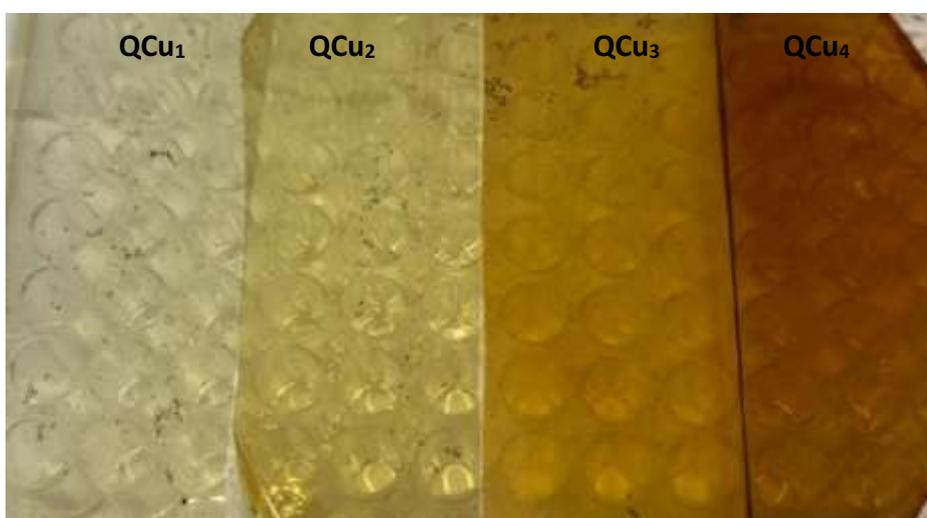


Figura 3.12. Fotografía de las matrices nanocompuestas QCu_x con $x=1,2,3,4$

Tabla 3.5. Parámetros de color a^* , b^* , diferencia de color ΔE^* e índice de pardeamiento IP de las matrices nanocompuestas formuladas a base de quitosano

Muestras	a^*	b^*	ΔE^*	IP
Q	-1.36 (0.1) ^a	11.9 (0.2) ^a	11.8 (0.6) ^a	12.3 (0.4) ^a
QCu ₁	7.4 (2.4) ^b	44.5 (3.6) ^b	55.9 (1.2) ^b	119.5 (8.8) ^b
QCu ₂	6.5 (1.3) ^b	41.9 (4.7) ^b	59.4 (2.5) ^{b,c}	130.7 (6.7) ^b
QCu ₃	5.1 (1.2) ^b	38.5 (1.9) ^b	67.1 (5.2) ^{b,c}	167.7 (10.4) ^b
QCu ₄	3.8 (0.9) ^b	35.2 (3.3) ^b	68.3 (4.6) ^c	189.5 (11.6) ^b

^a Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

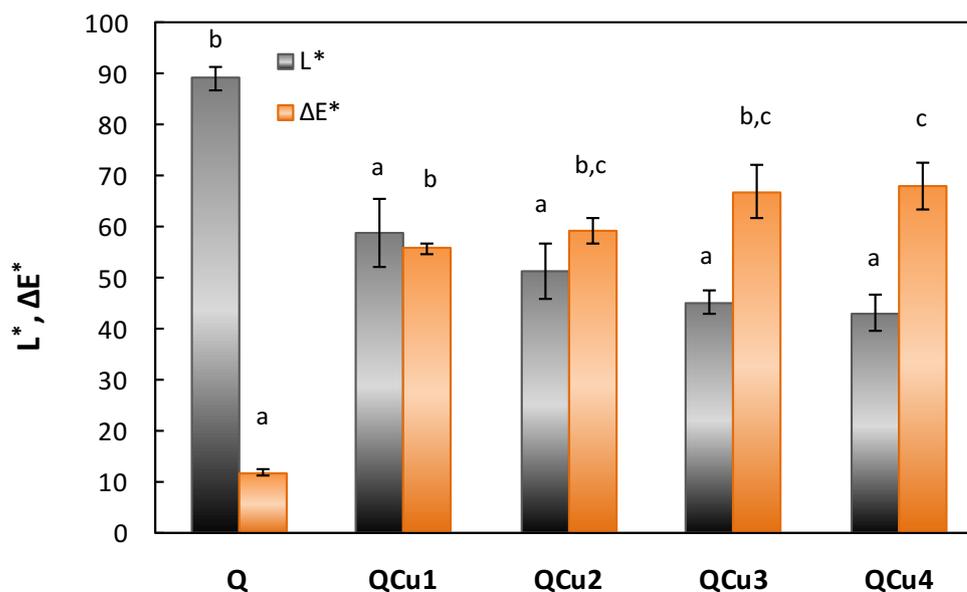


Figura 3.13. Parámetro de luminosidad L^* y diferencia de color ΔE^* de las matrices nanocompuestas QCu_x con $x=1,2,3,4$ respecto a la película control Q (L^* : color gris; ΔE^* : color naranja). $\Delta E^* = (\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{1/2}$

La adición de nanopartículas de cobre modificó las propiedades ópticas de las películas debido al efecto bloqueante de las mismas, lo cual se evidenció en un incremento en la capacidad de barrera a la radiación UV y en la opacidad de todos los materiales compuestos estudiados con respecto a las películas individuales de quitosano como se puede ver en la [Tabla 3.6](#). Asimismo, los valores de transparencia se incrementaron con la concentración de NpCu, signo de que las matrices se tornaron menos transparentes ($p < 0.05$).

Tabla 3.6. Propiedades ópticas de las matrices nanocompuestas formuladas a base de quitosano

Muestras	Transparencia $Abs_{600} \times mm^{-1}$	Opacidad $(AU \times nm^{-1})$	Barrera UV $(AU \times nm^{-1})$
Q	1.37 (0.11) ^a	36.0 (2.1) ^a	77.2 (2.7) ^a
QCu ₁	3.98 (0.04) ^c	115.9 (6.5) ^{b,c}	364 (13) ^b
QCu ₂	3.61 (0.02) ^b	118.6 (9.2) ^b	387 (14) ^b
QCu ₃	3.90 (0.10) ^c	113.5 (11.3) ^{b,c}	391 (10) ^b
QCu ₄	3.67 (0.05) ^b	123.5 (15.2) ^c	412 (22) ^b

^a Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Propiedades mecánicas

Las curvas fuerza-deformación de las películas Q mostraron un perfil mecánico característico de un material dúctil. En el caso de los nanocompuestos, la incorporación de las nanopartículas llevó a un perfil mecánico propio de un material más rígido. Solo en el caso de QCu_1 y QCu_2 , el esfuerzo superó al de la película Q. Cuanto mayor fue la proporción de NpCu, menor fue la elongación % con respecto a las películas de quitosano como resultado de la interacción entre el NpCu y la matriz, como puede verse en la [Figura 3.14](#).

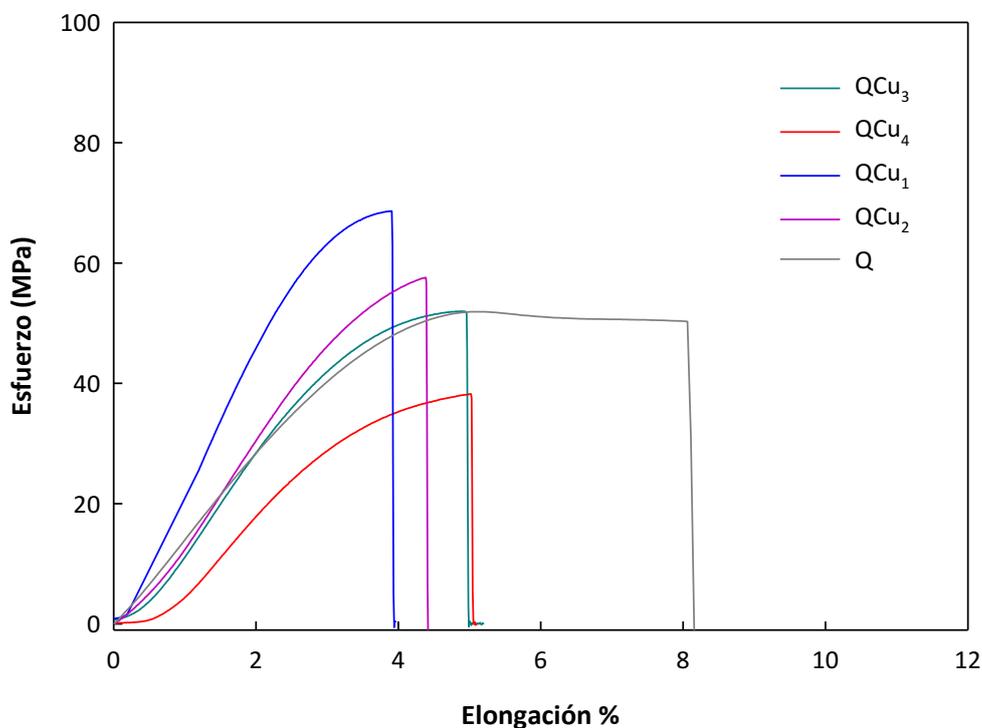


Figura 3.14. Perfiles mecánicos de películas de quitosano y nanocompuestos QCu_x con $x=1,2,3,4$.

Análisis térmico

La temperatura de transición vítrea (T_g) es una propiedad fundamental de los materiales amorfos ya que representa un cambio en la movilidad de las cadenas de polímeros (Arfat y col., 2017).

Capítulo3: Nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de cobre

En la [Figura 3.15a](#) se muestra el flujo de calor reversible del primer calentamiento de las películas Q y de los nanocompuestos. Las curvas de los nanocompuestos mostraron la primera T_g localizada a temperaturas más altas que 91 °C correspondiente a las películas Q.

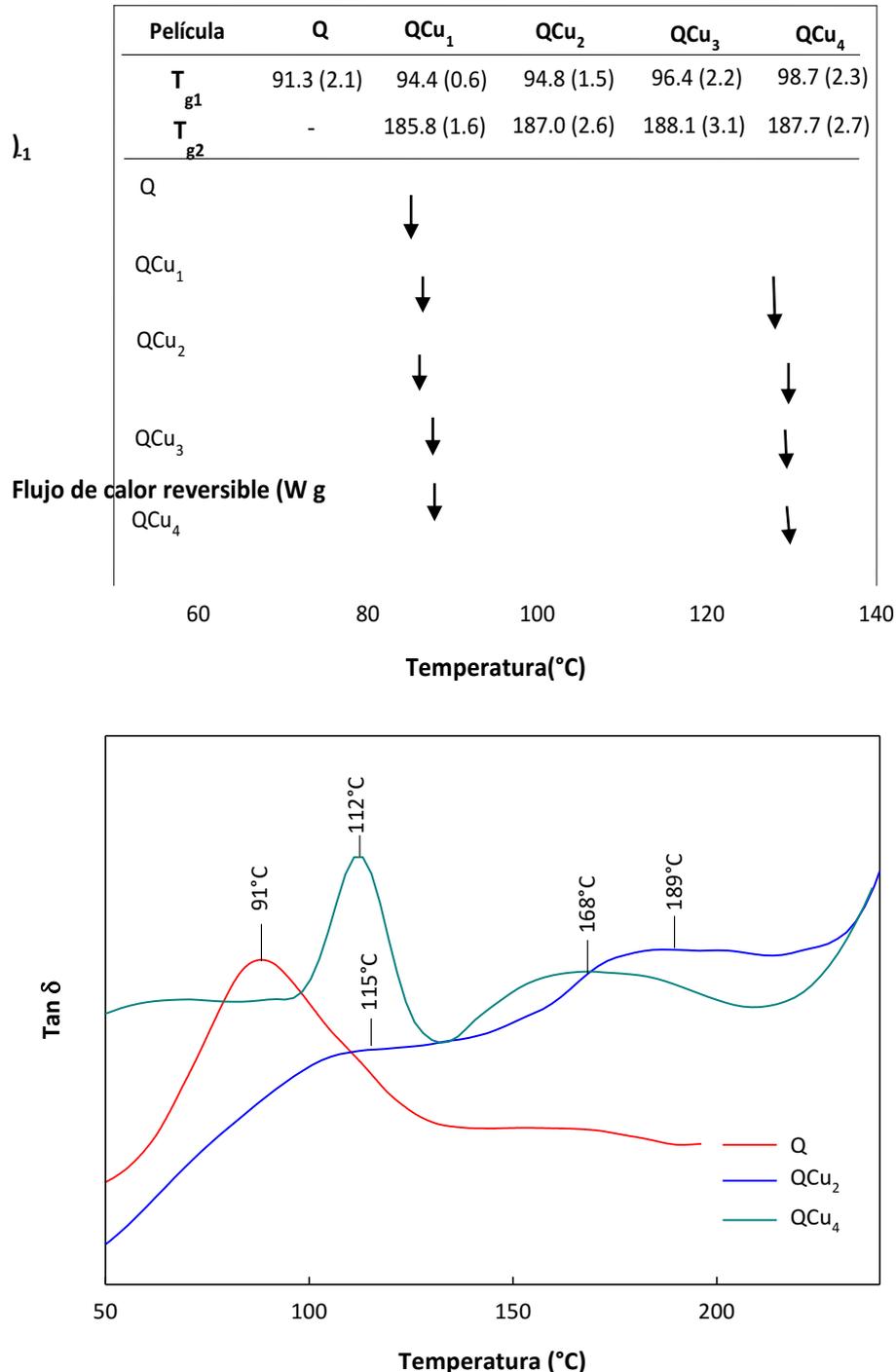


Figura 3.15. (a) Termogramas obtenidos por calorimetría diferencial de barrido modulada (MDSC) de películas a base de quitosano con diferentes concentraciones de nanopartículas NpCu. Se indica el cambio en la línea de base de la señal de flujo de calor reversible como temperatura de transición vítrea (T_g), **(b)** análisis dinámico mecánico (DMA) de películas de quitosano y nanocompuestos QCu₂₋₄ formulados con Q y NpCu.

La segunda T_g de las matrices nanocompuestas, debido a la presencia de NpCu, se observó entre 185.8 y 187.7°C, pero no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$) entre ellas. De acuerdo con Arfat y col. (2017), la T_g de los nanocompuestos aumenta con la adición de NpCu debido a la restricción de la movilidad de las cadenas del polímero. Además, la mayor rigidez podría ser consecuencia de las interacciones entre el quitosano y el PVP que estaría rodeando los *clusters* de Cu a través de los enlaces de hidrógeno (Arfat y col., 2017). Para la segunda corrida de calentamiento, la T_g cambió a temperaturas ligeramente más altas atribuibles a una mayor cantidad de agua removida.

Además, las curvas DMA de los nanocompuestos revelaron dos eventos térmicos principales a temperaturas crecientes, que coincidieron estrechamente con las temperaturas de transición vítrea de la fase enriquecida en Q y la fase enriquecida en nanopartículas (Figura 3.15b)

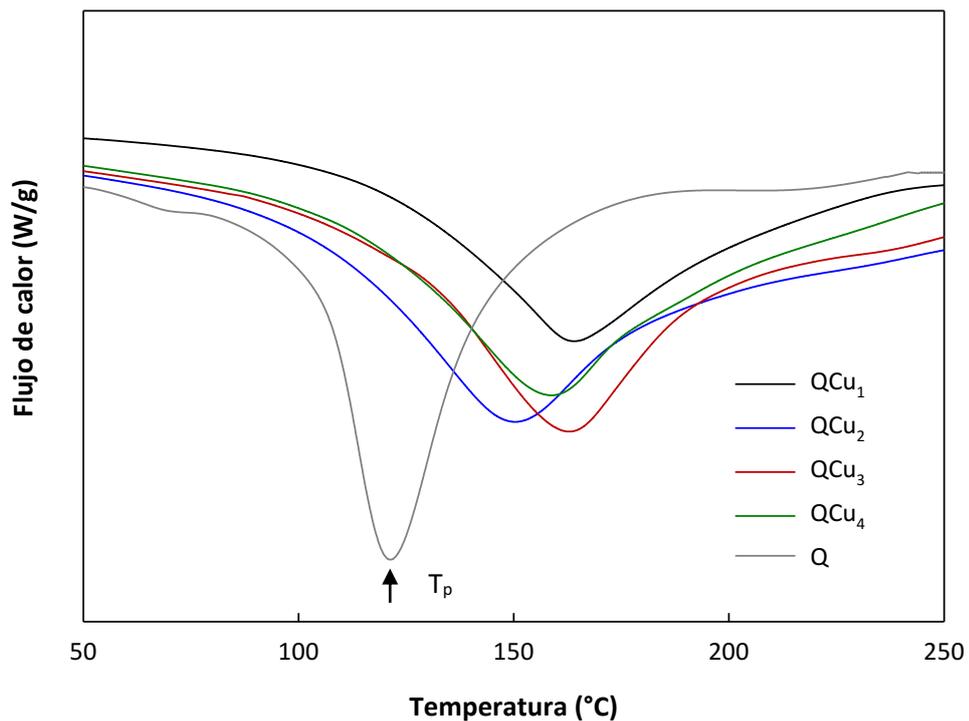


Figura 3.16. Termograma de los nanocompuestos QCu obtenidos del DSC mostrando la temperatura de pico (T_p) de las películas de quitosano y de los nanocompuestos obtenidos a partir del primer escaneo.

Capítulo 3: Nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de cobre

En la [Figura 3.16](#) se muestran los termogramas obtenidos por DSC exhibiendo las temperaturas de pico (T_p) de las películas Q y de los nanocompuestos QCu con diferentes concentraciones de Np. La T_p de quitosano, relacionada con la pérdida de agua por vaporización, fue significativamente diferente ($p < 0.05$) de los valores obtenidos para los nanocompuestos QCu, independientemente de la concentración de cobre.

Una tendencia similar siguió la entalpía correspondiente a este evento endotérmico que representa la energía necesaria para vaporizar el agua presente en la muestra. Según [Bunjes y Unruh \(2007\)](#), la polidispersabilidad condujo a un ensanchamiento del pico de temperatura ya que las diferentes fracciones funden a diferentes temperaturas.

Los termogramas obtenidos por TGA a partir de películas Q mostraron tres etapas de descomposición tal como se informó en el **Capítulo 2** ([Figura 3.17](#) y [Tabla 3.7](#)). Brevemente, los valores iniciales de pérdida de peso

registrados hasta 180°C correspondieron a la pérdida de agua. Este valor, resultó similar al contenido de humedad de las películas. La segunda etapa de pérdida de peso se explicó por la descomposición del grupo amino y $-CH_2OH$. La tercera etapa, entre 400 y 620°C, se asoció con la degradación de la glucopiranososa del quitosano.

Con la incorporación de las nanopartículas de cobre, el perfil TGA sufrió un cambio significativo y se identificaron dos etapas de descomposición. La primera etapa de pérdida de peso apareció desdibujada y prácticamente fundida con la 2ª etapa. De acuerdo con [Ramesan \(2013\)](#), el comportamiento térmico con la incorporación de nanopartículas podría atribuirse al aumento en el orden de la cadena de PVP alrededor de las nanopartículas, hipótesis que fue corroborada por los análisis realizados por TEM y ATR-FTIR.

Tabla 3.7. Etapas de las pérdidas de peso en diferentes etapas obtenidas por análisis termogravimétrico TGA

Muestra	Etapa I		Etapa II		Etapa III		Peso residual %
	Rango °C	Pérdida de peso %	Rango °C	Pérdida de peso %	Rango °C	Pérdida de peso %	
Q	20-180	15.2	180-400	40.0	400-620	43.6	1.2
QCu ₂	-	-	20-400	55.0	400-620	41.5	3.5
QCu ₄	-	-	20-400	56.1	400-620	38.8	4.1

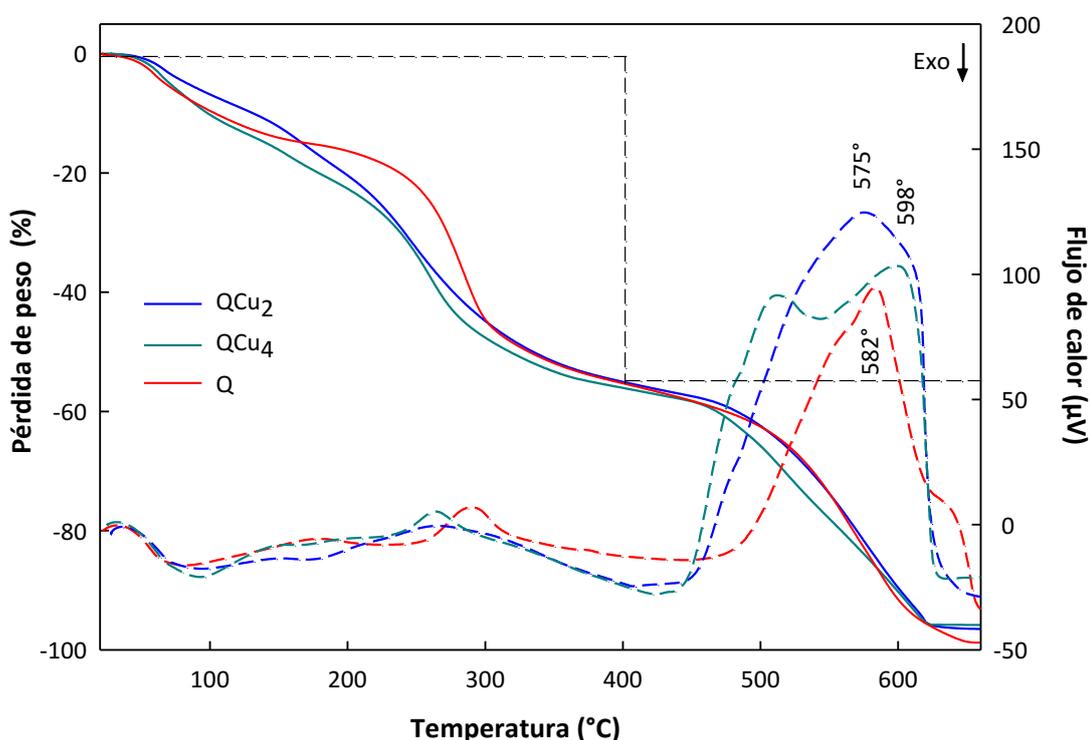


Figura 3.17. Termogramas obtenidos por TGA de muestras de Q y nanocompuestos formulados a base de Q funcionalizados con NpCu.

Análisis microestructural

Las técnicas complementarias de caracterización utilizadas para evaluar la composición química, el tamaño y la morfología de la superficie de las nanopartículas y de las matrices nanoestructuradas fueron la microscopía SEM combinada con la espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDS). El examen microestructural de los nanocompuesto QCu mediante SEM mostró un aspecto homogéneo y una estructura compacta (Figura 3.18a).

Capítulo3: Nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de cobre

Asimismo, el mapeo de QCu por EDS reveló que las nanopartículas se dispersaron homogéneamente en la matriz (Figura 3.18b). La Figura 3.18c muestra el espectro de energía dispersiva correspondiente al área A mostrando señales a 0.98, 8.09 y 8.99 keV, ya observadas en la caracterización de las nanopartículas (Sección 3.2) pero obviamente atenuadas en su intensidad en concordancia con su inclusión en la matriz de quitosano.

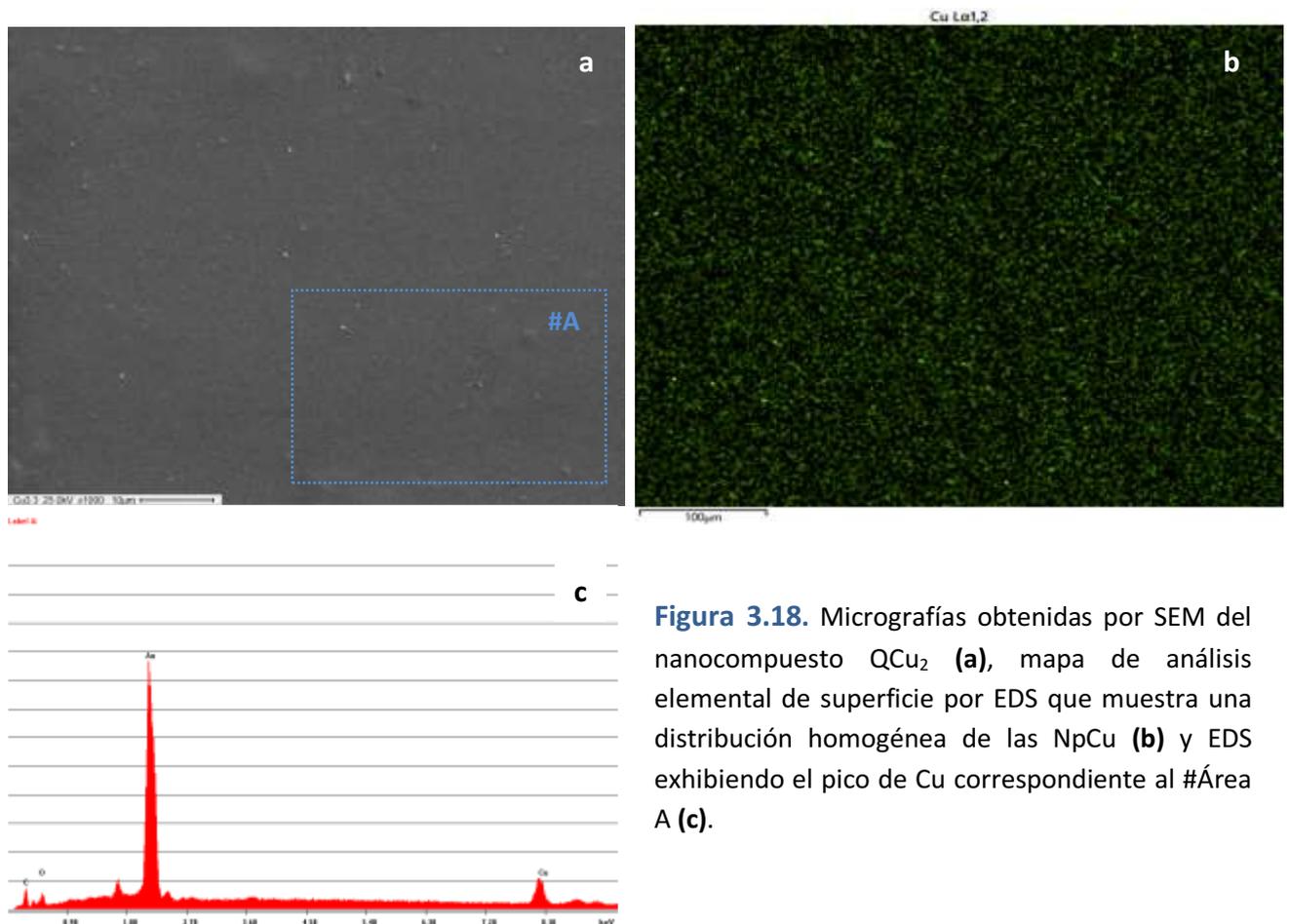


Figura 3.18. Micrografías obtenidas por SEM del nanocompuesto QCu₂ (a), mapa de análisis elemental de superficie por EDS que muestra una distribución homogénea de las NpCu (b) y EDS exhibiendo el pico de Cu correspondiente al #Área A (c).

Microscopía de fuerza atómica

La Figura 3.19 muestra las imágenes de topografía y fase obtenidas por AFM de las superficies de la película Q y de la matriz nanocompuesta QCu₂. De las imágenes de topografía se observa que Q presenta una superficie lisa y homogénea. En las imágenes de fase se observa la diferencia en el comportamiento de las fases del material. Mientras que en QCu₂ se pueden visualizar claramente las partículas con la aparición de dominios

tanto duros como blandos, en las imágenes de Q se observa una superficie más homogénea y compuesta por un material blando. Esto concuerda con las micrografías obtenidas por SEM.

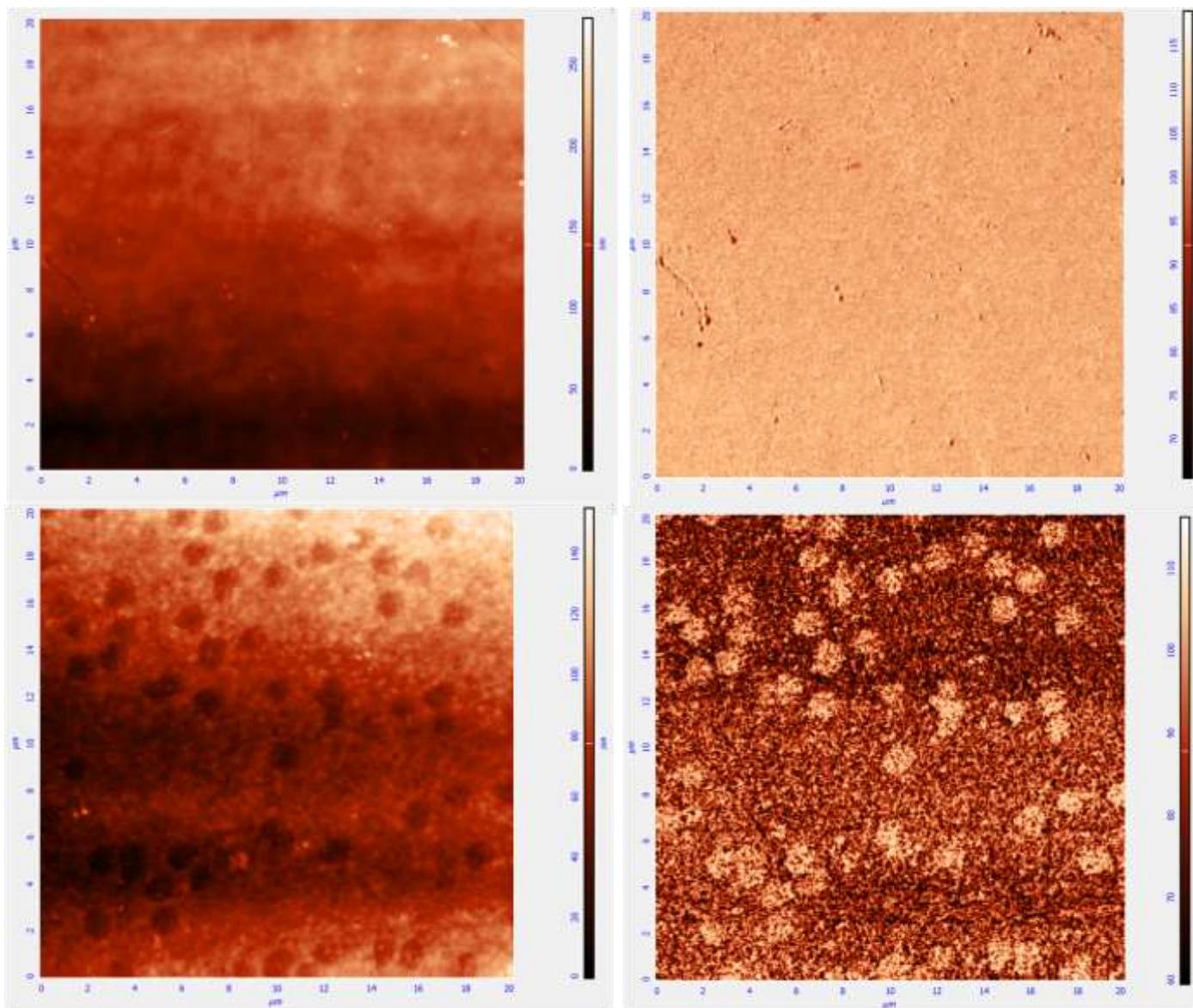


Figura 3.19. Imágenes de topografía y fase obtenidas por AFM de las películas de quitosano y de la matriz nanocompuesta QCu₂.

Análisis de los nanocompuestos QCu por DRX

Como se puede ver en la [Figura 3.20](#), la matriz de quitosano exhibió picos localizados en 2θ 7.8°, 10.9°, 17.7° y 22.4°, característicos de este polímero. La inclusión de nanopartículas de cobre causó un ensanchamiento del pico de reflexión ubicado a 22.4°. Los nanocompuestos con la mayor proporción de nanopartículas de cobre presentaron

los picos de difracción atribuidos a las NpCu como se describió en la sección **Carac**

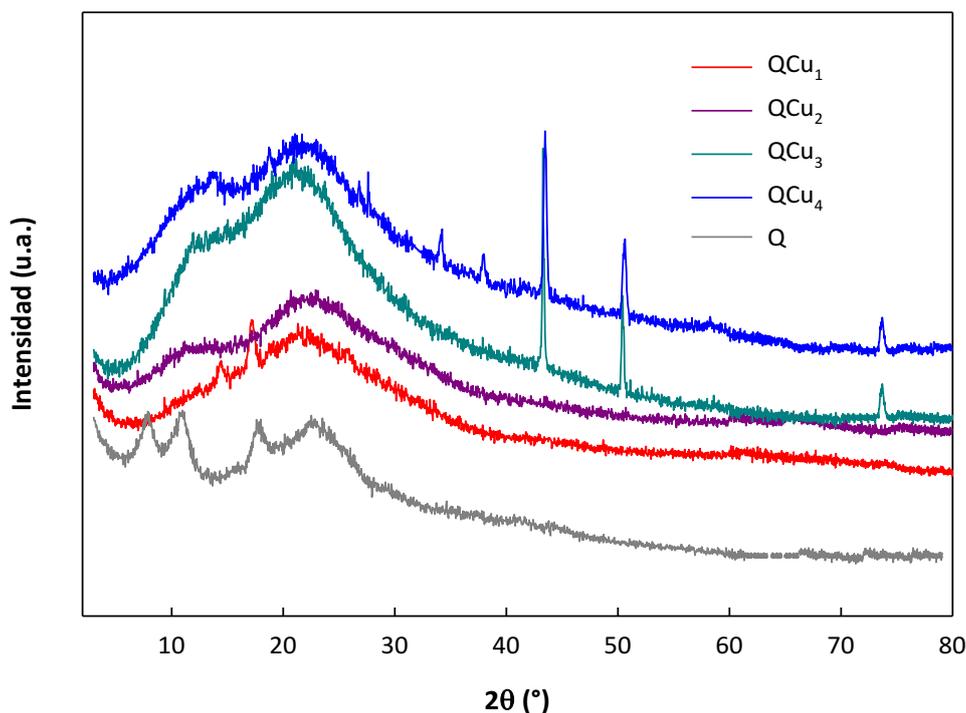


Figura 3.20. Patrones de difracción obtenidos por DRX de películas de quitosano (Q) y nanocompuestos a base de Q funcionalizados con nanopartículas de cobre (QCu).

En la **Tabla 3.8** se puede ver el grado de cristalinidad de las matrices nanocompuestas las que presentaron valores menores que la película de quitosano ($p < 0.05$) al igual que lo observado en el caso de los nanocompuestos QAg.

Tabla 3.8. Tamaño del cristalito (nm) obtenido de la ecuación de Debye-Scherrer y grado de cristalinidad (%) de los nanocompuestos QCu, con diferentes relaciones Q:NpCu

Formulación	Posición del pico (2θ)	FWHM	Tamaño del cristalito (nm)	Grado de cristalinidad (%)
Q	22.6	1.889	8.9	38.5 ^c
QCu ₁	21.1	1.574	5.4	25.5 ^b
QCu ₂	20.8	1.574	5.4	20.2 ^a
QCu ₃	20.6	1.574	5.4	21.3 ^a
QCu ₄	20.6	1.259	6.7	22.6 ^{a,b}

FWHM: ancho total a mitad de altura. El error típico es $\pm 2\%$.

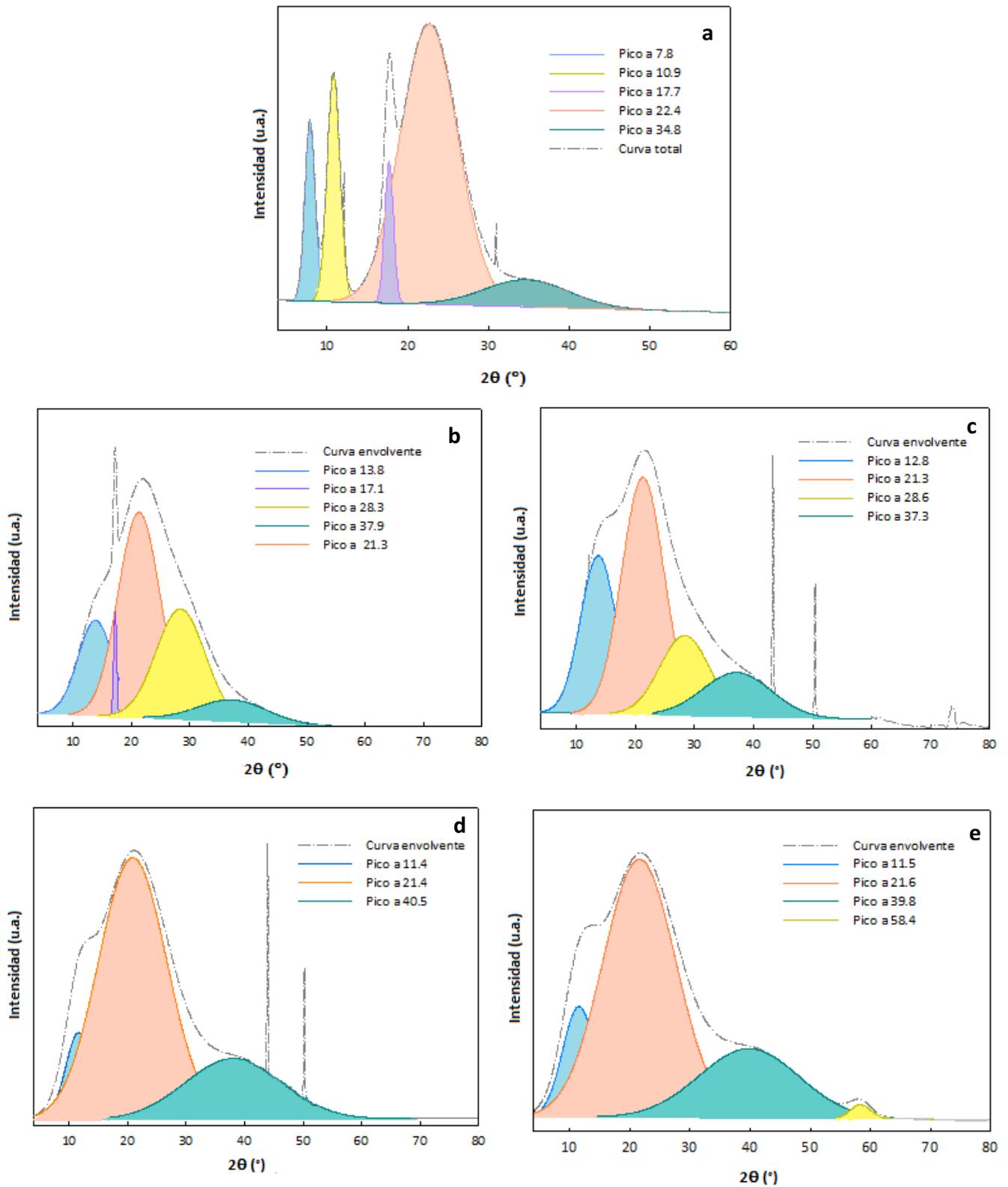


Figura 3.21. Deconvolución del patrón de difracción de rayos X mostrando las curvas de ajuste para películas de quitosano **(a)** y nanocompuestos con diferente relación Q:NpCu: **(b)** QCu_1 , **(c)** QCu_2 , **(d)** QCu_3 y **(e)** QCu_4 . Se muestran la curva envolvente total (línea gris de punto y raya) y los componentes gaussianos individuales (líneas completas de color).

Capítulo3: Nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de cobre

Observando la deconvolución del difractograma de rayos X, se puso en evidencia la desaparición del pico a $2\theta=7.8^\circ$, la formación de un hombro a expensas del pico situado a 10.9° y la aparición de un pico a $2\theta=38^\circ$ que se corrió a 40° a medida que se incrementó la proporción de NpCu en la matriz nanocompuesta. Además, el patrón de difracción se volvió más amorfo como se muestra en la [Tabla 3.8](#).

Espectroscopía de tiempo de vida media de aniquilación de positrones (PALS)

En el caso de los materiales semicristalinos o amorfos, los positrones se encontrarán con diversos entornos moleculares, como sitios de volumen libre y defectos cristalinos donde pueden aniquilarse ([Damonte y col., 2007](#)). Debido a su sensibilidad a vacancias o defectos, se ha aplicado la técnica PALS para caracterizar los nanomateriales.

Como se ha explicado previamente en ***Técnicas de caracterización***, τ_1 es el componente de vida corta y se atribuye a la autoaniquilación de p-Ps. τ_2 es el componente de vida intermedia y mide la vida útil de los positrones atrapados en defectos en la región cristalina y/o los que se aniquilan en las interfases amorfo-cristalinas sin formar Ps. τ_3 es el componente de vida más larga, que se atribuye a la aniquilación de o-Ps en agujeros de volumen libre en regiones amorfas del polímero. Los espectros obtenidos del material polimérico se ajustaron a través de estas tres vidas medias, correspondientes a la aniquilación de p-Ps (τ_1, I_1), positrones libres (τ_2, I_2), y o-Ps (τ_3, I_3).

τ_3 y τ_2 aumentaron, probablemente debido al aumento del volumen libre con la inclusión de las mayores concentraciones de NpCu ([Figura 3.22a](#)) mientras que τ_1 permaneció casi constante.

La vida media de mayor valor τ_3 , de alrededor de 1700 ps, representa aniquilaciones de o-Ps que se relacionan con los volúmenes libres. Estos volúmenes aumentaron en tamaño pero disminuyeron en cantidad. Según la curva de Tao y Eldrup, el radio de la cavidad sería del orden de $R=2.60 \text{ \AA}$. La vida media promedio del positron fue evaluada como:

$$\tau_{\text{prom}} = \sum_i I_i \tau_i$$

Capítulo3: Nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de cobre

Es un parámetro útil, casi independiente del tratamiento de datos (Damonte y col., 2007). Su valor disminuyó desde 550 a 510 ps al aumentar la concentración de nanopartículas en la matriz de quitosano (Figura 5.27c).

La fuerte interacción entre las nanopartículas y las moléculas de quitosano también restringieron el movimiento y redujeron la movilidad de la cadena de quitosano, lo que condujo a una reducción en el tamaño del volumen libre en la vecindad de las nanopartículas y a la mejora de la estabilidad térmica del material. Como resultado, la vida útil promedio disminuyó con el aumento de la proporción de NpCu. Resultados similares fueron informados por Wang y col. (2007) trabajando con una resina epoxi cargada con arcilla.

Los resultados obtenidos apoyan las observaciones realizadas a través de SEM. La mejora de las propiedades de tracción se puede obtener optimizando la interacción en la interfase entre polímero y nanorellenos (El-Gamal y Elsayed, 2020). Estos estudios han demostrado que las propiedades de tracción de los nanocompuestos de polímeros se pueden modificar cargando la cantidad máxima de un nanorelleno sin que se produzca su agregación. Esto se puede lograr con un relleno del sistema polimérico con fuerte interacciones interfaciales que supere la interacción entre las partículas del nanorelleno permitiendo la dispersión del mismo en una matriz de polímero. En general, las propiedades de tracción de una matriz polimérica son inversamente proporcionales a su fracción de volumen libre principalmente porque la carga aplicada se concentra en los defectos (agujero de volumen libre) lo que dificulta la distribución de la carga entre las moléculas de polímero conduciendo a la falla del material (Mallakpour y Madani, 2015). Por lo tanto, teóricamente una matriz de polímero con menor fracción de volumen libre exhibiría mejores propiedades a la tracción.

Capítulo 3: Nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de cobre

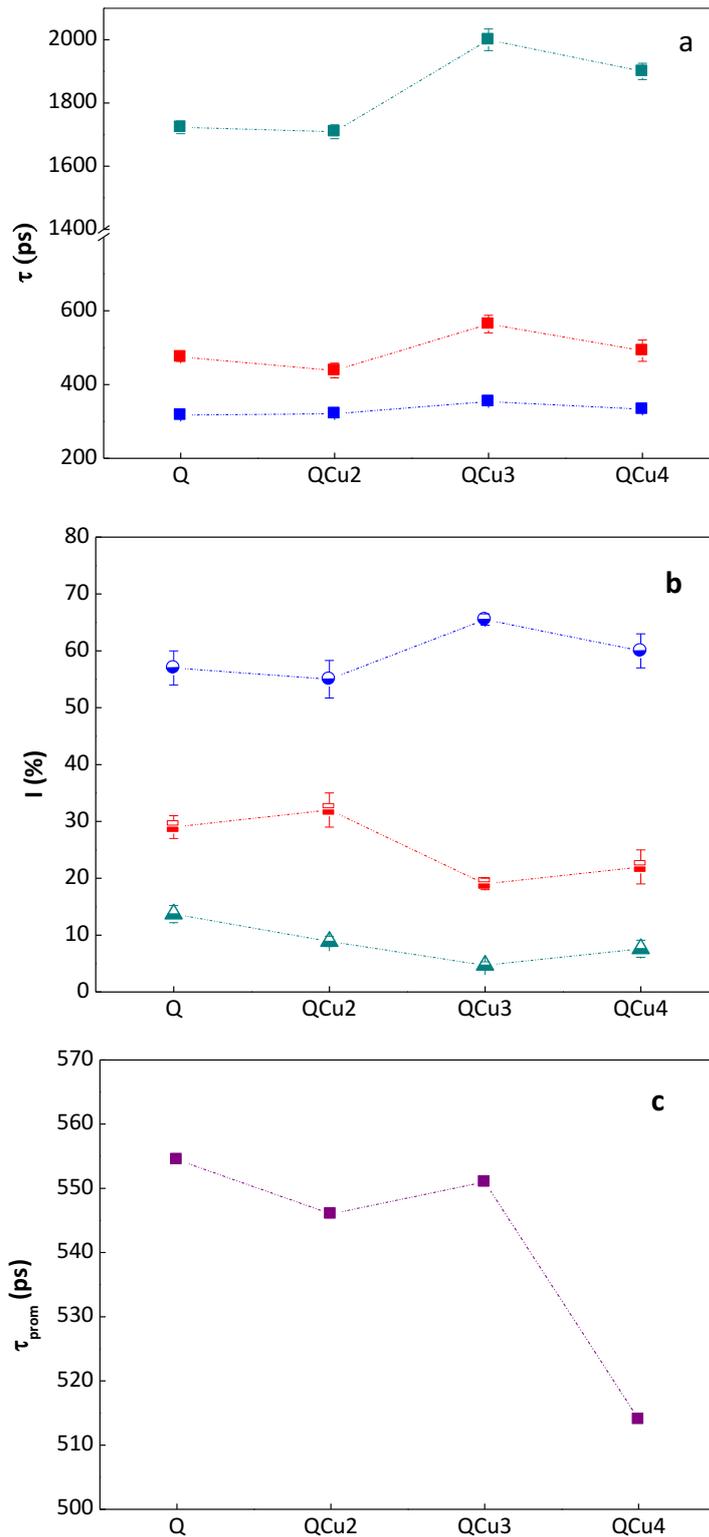


Figura 3.22. Parámetros PALS en función de la concentración de nanopartículas NpCu \bullet τ_1 , \blacksquare τ_2 , \blacktriangle τ_3 , \circ I_1 , \square I_2 , \triangle I_3 . Las líneas punteadas que unen los puntos permiten visualizar la tendencia ya que los puntos intermedios no fueron estudiados.

Espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier de reflexión total atenuada (ATR-FTIR)

Las interacciones entre el Q y el NpCu sintetizado causaron cambios significativos en la intensidad de la señal y la posición de los picos en relación con los obtenidos para las películas Q. La [Figura 3.22](#) muestra los espectros de Q, así como los correspondientes a los nanocompuestos funcionalizados con diferentes concentraciones de NpCu.

Como ya se describió en el **Capítulo 2**, los espectros ATR-FTIR de Q presentaron bandas de absorción características a 3352, 2921 y 2878 cm^{-1} , 1631 y 1384 cm^{-1} que representan la presencia de los grupos -OH, -CH₂ y -CH₃ (grupo alifático), -C = O y estiramiento C-O del grupo alcohólico primario (-CH₂-OH, posible sitio de entrecruzamiento), respectivamente ([Marsano y col., 2004](#)). La presencia de picos significativos a 1632 cm^{-1} (debido al grupo CH₃-C=O que representa la presencia del grupo acetilo) ([Figura 3.22a](#)) y 3352 cm^{-1} (que denota la presencia del grupo -NH₂), confirmó la parcial desacetilación del Q ([Figura 3.22b](#)).

Por otra parte, la intensidad del pico a 1660 cm^{-1} debido al enlace C=O de PVP es muy evidente. La miscibilidad entre el Q y el PVP y las interacciones por enlaces de hidrógeno causaron un desplazamiento de la banda a 1631 cm^{-1} a una frecuencia más alta (1660 cm^{-1}). El quitosano es un donante de hidrógeno que forma enlaces de hidrógeno con el grupo carbonilo del PVP. Los anillos de pirrolidona en PVP contienen una fracción carbonilo que acepta protones, mientras que el Q presenta hidroxilos y aminos como grupos laterales.

La formación de enlaces de hidrógeno entre ambas macromoléculas compite con las interacciones entre moléculas del mismo polímero ([Marsano y col., 2004](#)). En los espectros de los nanocompuestos, las intensidades de las bandas en la región de 1600-800 cm^{-1} sufrieron una reducción significativa. Se observó la aparición de un pico a 1299 cm^{-1} y la desaparición de la señal situada a 1255 cm^{-1} ([Figura 3.22a](#)) debido a las interacciones NpCu-Q.

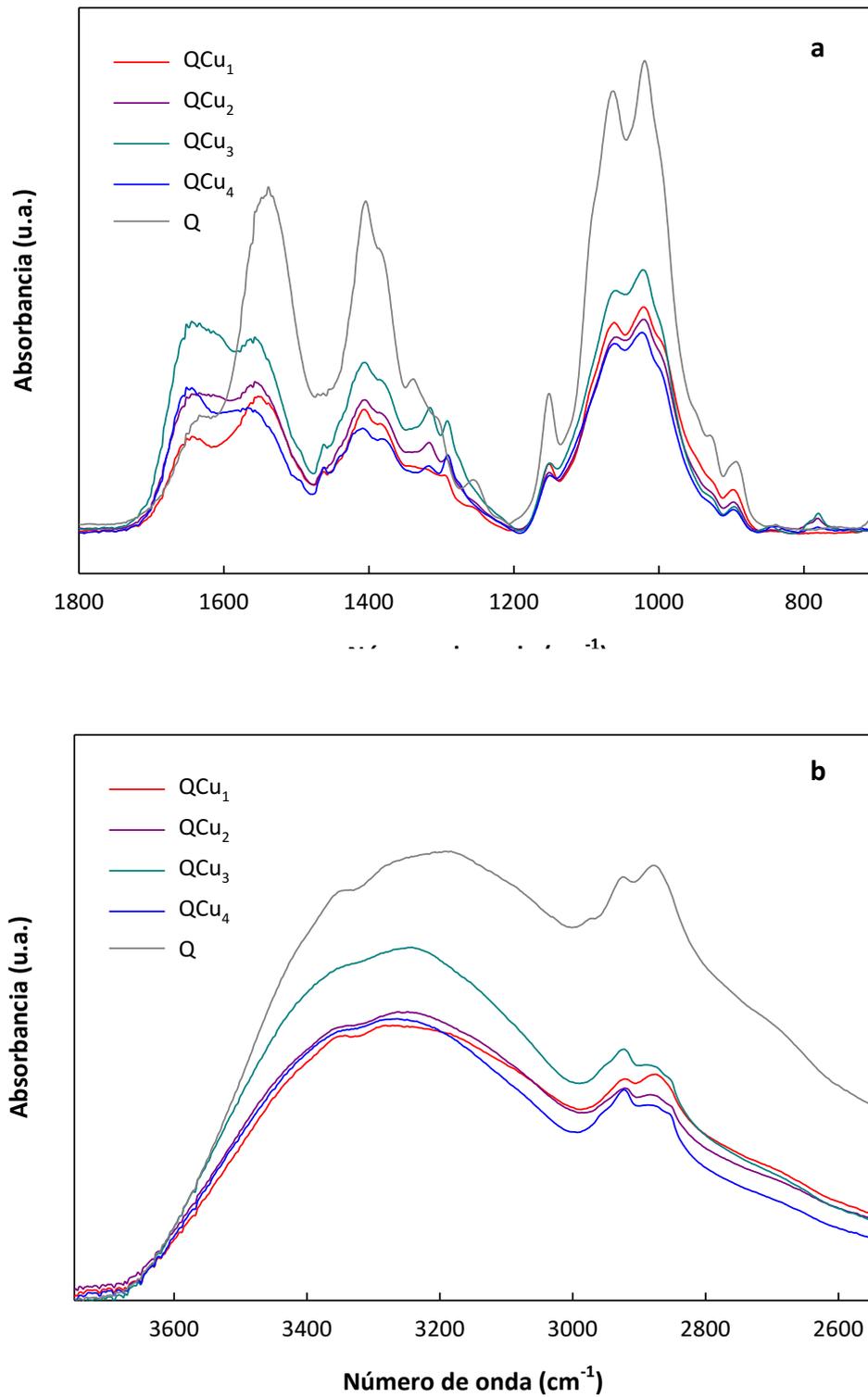


Figura 3.22. Espectros ATR-FTIR de quitosano y nanocompuestos mostrando diferentes regiones de número de onda: a) 1800-800 cm^{-1} y b) 3600-2600 cm^{-1} .

Análisis PCA y PLS

El PCA es un método matemático multivariante bilineal utilizado en quimiometría para el análisis de los espectros FTIR que permite la transformación de los datos originales en una combinación lineal de variables no correlacionadas denominadas componentes principales (PC). Los primeros PC son los que representan la mayor varianza de datos asociados con la información más relevante.

En la [Figura 3.23](#) se exhiben los gráficos biplot de PCA donde se observa que la adición de diferentes proporciones de nanopartículas causó una separación de las muestras en grupos o *clusters* bien definidos. El análisis se llevó a cabo considerando los resultados obtenidos mediante ATR-FTIR en la región espectral 1800-1400 cm^{-1} . Al inspeccionar las contribuciones, el biplot reveló que el primer componente explicaba la mayor parte de la variabilidad (85 %) y el segundo el 14 %. El Q control se ubicó sobre los valores más altos de PC1 (positivos) mientras que los nanocompuestos se localizaron más cerca del centro.

Los datos experimentales mostraron varianzas residuales similares entre sí/ sí mismos, apoyando el ajuste significativo del modelo.

Por otra parte, el análisis PLS se realizó con el fin de correlacionar la concentración de nanopartículas (CNp) con las absorbancias (λ) correspondientes a picos que sufrieron cambios significativos debido a las interacciones entre los componentes del sistema. En la [Figura 3.24](#) se muestra la relación de la absorbancia de la banda ubicada a 1650 cm^{-1} con la concentración CNp que condujo a un ajuste satisfactorio, con un $R^2 > 0.85$.

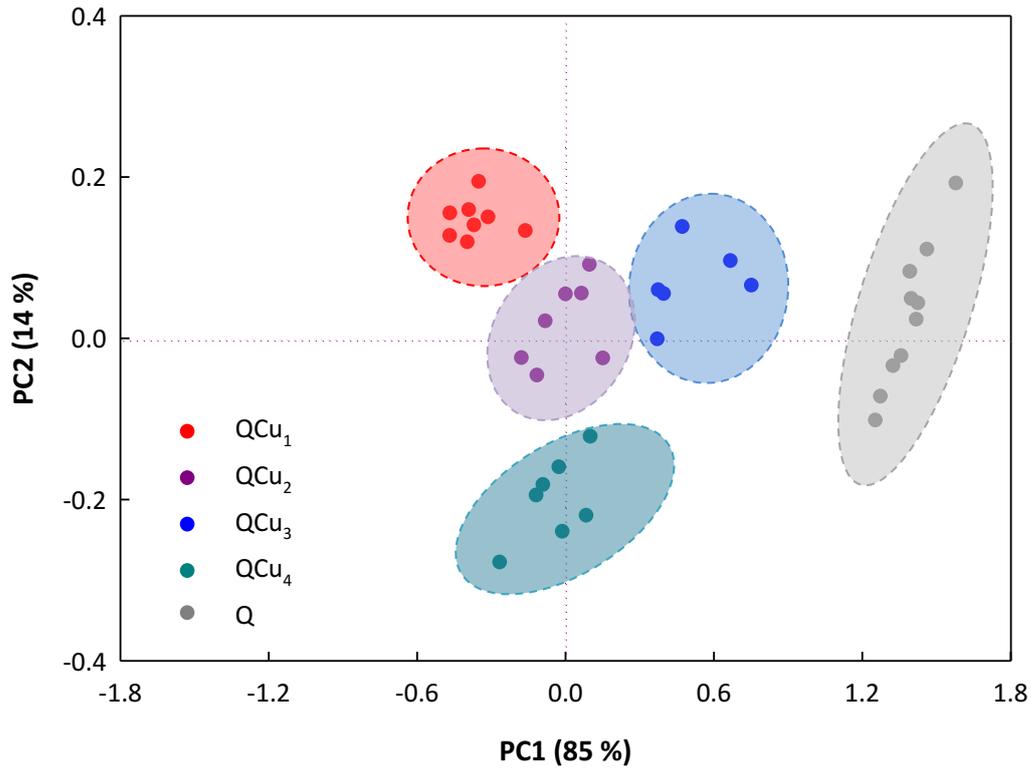


Figura 3.23. Análisis de componentes principales (PCA) en matrices de nanocompuestos con diferentes relaciones Q:NpCu donde se incluyó a las películas de quitosano como control.

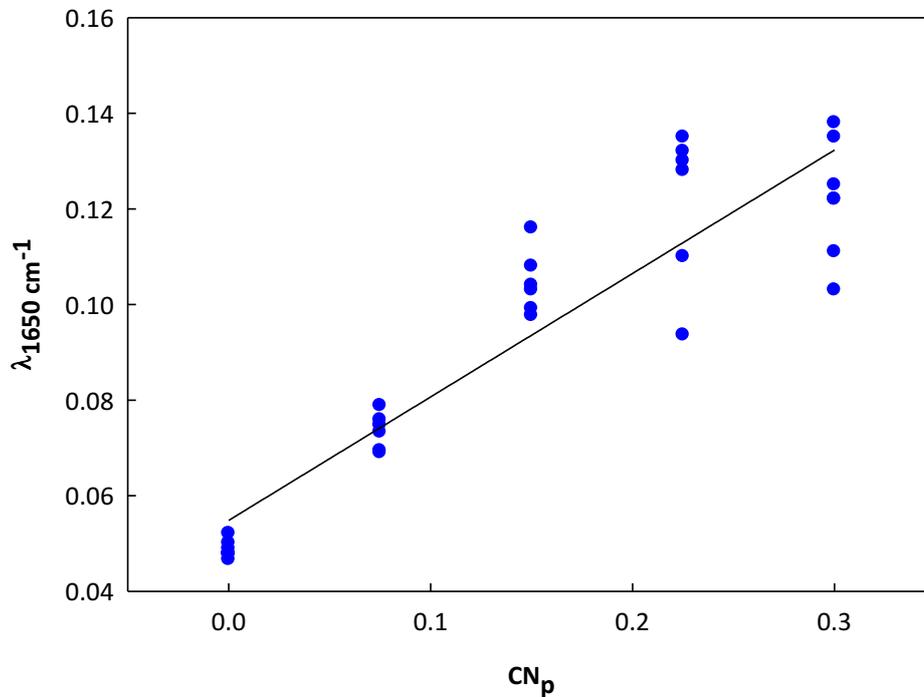


Figura 3.24. Correlación entre la absorbancia correspondiente a 1650 cm⁻¹ y la concentración de nanopartículas de cobre (CN_p) obtenida mediante el modelo PLS.

3.6 CONCLUSIONES

Se realizó una síntesis *verde* de bajo costo de nanopartículas de cobre en una solución de polivinilpirrolidona y ácido ascórbico sin uso de agentes reductores químicos tóxicos. Los tamaños de las nanopartículas de cobre fueron estimados por la técnica de DRX y TEM.

En las matrices nanocompuestas, las NpCu mostraron una distribución homogénea según se visualizó mediante SEM y AFM. A partir de los patrones de difracción de RX se determinó la reducción en el grado de cristalinidad de los nanocompuestos con respecto a la matriz de quitosano.

Las nanopartículas de cobre actuaron como agente entrecruzante provocando un aumento en la rigidez de la matriz como se pudo observar en las propiedades mecánicas.

El análisis térmico permitió observar el corrimiento de la primera T_g hacia mayores temperaturas y la aparición de una segunda T_g en los nanocompuestos. Las diversas técnicas usadas para caracterizar los compuestos confirmaron la existencia de dos fases, una más rica en NpCu y otra en el biopolímero.

3.7 REFERENCIAS

- Ahmed, J., Trinh, P., Mugweru, A.M., & Ganguli, A.K. (2011). Self-assembly of copper nanoparticles (cubes, rods and spherical nanostructures): Significant role of morphology on hydrogen and oxygen evolution efficiencies. *Solid State Sciences*, 13(5), 855–861. <https://doi.org/10.1016/j.solidstatesciences.2011.03.005>
- Alizadeh-Sani, M., Khezerlou, A., & Ehsani, A. (2018). Fabrication and characterization of the bionanocomposite film based on whey protein biopolymer loaded with TiO₂ nanoparticles, cellulose nanofibers and rosemary essential oil. *Industrial Crops and Products*, 124, 300–315. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.001>
- Arena, A., Scandurra, G., & Ciofi, C. (2017). Copper oxide chitosan nanocomposite: Characterization and application in non-enzymatic hydrogen peroxide sensing. *Sensors*, 17(10), 2198. <https://doi.org/10.3390/s17102198>
- Arfat, Y. A., Ahmed, J., & Jacob, H. (2017). Preparation and characterization of agar-based nanocomposite films reinforced with bimetallic (Ag-Cu) alloy nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 155, 382–390. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.08.097>
- Athanassiou, E. K., Grass, R. N., & Stark, W. J. (2006). Large-scale production of carbon-coated copper nanoparticles for sensor applications. *Nanotechnology*, 17(6), 1668–1673. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/17/6/022>
- Atkins, P., Overton, T., Rourke, J., & Armstrong, F. (2009). *Inorganic Chemistry* (Oxford University Press, Ed.; 5th ed.). W. H. Freeman.
- Borkow, G., Zatcoff, R. C., & Gabbay, J. (2009). Reducing the risk of skin pathologies in diabetics by using copper impregnated socks. *Medical Hypotheses*, 73(6), 883–886. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2009.02.050>
- Bunjes, H., & Unruh, T. (2007). Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(6), 379–402. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.04.013>
- Cárdenas, G., Díaz V., J., Meléndrez, M. F., Cruzat C. C., & García Cancino, A. (2009). Colloidal Cu nanoparticles/ chitosan composite film obtained by microwave heating for food package applications. *Polymer Bulletin*, 62(4), 511–524. <https://doi.org/10.1007/s00289-008-0031-x>
- Chen, L., Zhang, D., Chen, J., Zhou, H., & Wan, H. (2006). The use of CTAB to control the size of copper nanoparticles and the concentration of alkylthiols on their surfaces. *Materials Science and Engineering: A*, 415(1–2), 156–161. <https://doi.org/10.1016/j.msea.2005.09.060>

Capítulo3: Nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de cobre

- Chen, P., Song, L., Liu, Y., & Fang, Y. e. (2007). Synthesis of silver nanoparticles by γ -ray irradiation in acetic water solution containing chitosan. *Radiation Physics and Chemistry*, 76(7), 1165–1168. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2006.11.012>
- Chen, Y., Liu, C., Chang, P. R., Cao, X., & Anderson, D. P. (2009). Bionanocomposites based on pea starch and cellulose nanowhiskers hydrolyzed from pea hull fibre: Effect of hydrolysis time. *Carbohydrate Polymers*, 76(4), 607–615. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.11.030>
- Crooks, R. M., Zhao, M., Sun, L., Chechik, V., & Yeung, L. K. (2001). Dendrimer-encapsulated metal nanoparticles: Synthesis, characterization, and applications to Catalysis. *Accounts of Chemical Research*, 34(3), 181–190. <https://doi.org/10.1021/ar000110a>
- Damonte, L. C., Taylor, M. A., Desimoni, J., & Runco, J. (2007). PALS study on the defect structure of yttria-stabilized zirconia. *Radiation Physics and Chemistry*, 76(2), 248–251. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2006.03.046>
- Díaz-Visurraga, J., García, A., & Cárdenas, G. (2010). Lethal effect of chitosan-Ag (I) films on *Staphylococcus aureus* as evaluated by electron microscopy. *Journal of Applied Microbiology*, 108(2), 633–646. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04447.x>
- El-Gamal, S., & Elsayed, M. (2020). Positron annihilation and electrical studies on the influence of loading magnesia nanoribbonson PVA-PVP blend. *Polymer Testing*, 89, 106681. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2020.106681>
- Giuffrida, S., Costanzo, L. L., Ventimiglia, G., & Bongiorno, C. (2008). Photochemical synthesis of copper nanoparticles incorporated in poly(vinyl pyrrolidone). *Journal of Nanoparticle Research*, 10(7), 1183–1192. <https://doi.org/10.1007/s11051-007-9343-2>
- Guisbiers, G., & Abudukelimu, G. (2013). Influence of nanomorphology on the melting and catalytic properties of convex polyhedral nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, 15(2), 1431. <https://doi.org/10.1007/s11051-013-1431-x>
- Guo, Z., Liang, X., Pereira, T., Scaffaro, R., & Hahn, T.H. (2007). CuO nanoparticle filled vinyl-esterresin nanocomposites: Fabrication, characterization and property analysis. *Composites Science and Technology*, 67(10), 2036–2044. <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2006.11.017>
- Haas, I., Shanmugam, S., & Gedanken, A. (2006). Pulsed sonoelectrochemical synthesis of size-controlled copper nanoparticles stabilized by poly (N-vinylpyrrolidone). *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(34), 16947-16952. <https://doi.org/10.1021/jp064216k>
- Hasheminya, S. M., Mokarram, R. R., Ghanbarzadeh, B., Hamishekar, H., Kafil, H. S., & Dehghannya, J. (2019). Influence of simultaneous application of copper oxide nanoparticles

Capítulo3: Nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de cobre

- and SaturejaKhuzestanica essential oil on properties of kefiran–carboxymethylcellulose films. *Polymer Testing*, 73, 377–388. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2018.12.002>
- Hosseini, S. F., Rezaei, M., Zandi, M., & Farahmandghavi, F. (2016). Development of bioactive fish gelatin/chitosan nanoparticles composite films with antimicrobial lproperties. *Food Chemistry*, 194, 1266–1274. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.004>
- Huleihel, M., Pavlov, V., & Erukhimovitch, V. (2009). The use of FTIR microscopy for the evaluation of anti-bacterial agents activity. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 96(1), 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2009.03.009>
- Jayaramudu, T., Varaprasad, K., Pyarasani, R. D., Reddy, K. K., Kumar, K. D., Akbari-Fakhrabadi, A., Mangalaraja, R. V., & Amalraj, J. (2019). Chitosan capped copper oxide/copper nanoparticles encapsulated microbial resistant nanocomposite films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 128, 499–508. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.145>
- Karp, J. M., Dalton, P. D., & Shoichet, M. S. (2003). Scaffolds for tissue engineering. *MRSBulletin*, 28(4), 301–306. <https://doi.org/10.1557/mrs2003.85>
- Kaviyarasu, K., Manikandan, E., Kennedy, J., & Maaza, M. (2015). A comparative study on the morphological features of highly ordered MgO: AgO nanocube arrays prepared via a hydrothermal method. *RSC Advances*, 5(100), 82421–82428. <https://doi.org/10.1039/C5RA15132E>
- Khalid, H., Shamaila, S., Zafar, N., & Shahzadi, S. (2015). Synthesis of copper nanoparticles by chemical reduction method. *Science International (Lahore)*, 27(4), 3085-3088.
- Kim, Y. H., Lee, D. K., Jo, B. G., Jeong, J. H., & Kang, Y. S. (2006). Synthesis of oleate capped Cu nanoparticles by thermal decomposition. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 284–285, 364–368. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2005.10.067>
- Kumari, S., Singh, B. N., & Srivastava, P. (2019). Effect of copper nanoparticles on physico-chemical properties of chitosan and gelatin-based scaffold developed for skin tissue engineering application. *3 Biotech*, 9(3), 0. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1624-9>
- Lamarra, J., Giannuzzi, L., Rivero, S., & Pinotti, A. (2017). Assembly of chitosan supportmatrix with gallic acid-functionalized nanoparticles. *Materials Science and Engineering C*, 79, 848–859. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.104>
- Liu, C., Yang, X., Yuan, H., Zhou, Z., & Xiao, D. (2007). Preparation of silver nanoparticle and its application to the determination of ct-DNA. *Sensors*, 7(5), 708–718. <https://doi.org/10.3390/s7050708>

Capítulo3: Nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de cobre

- Lizundia, E., Vilas, J. L., Sangroniz, A., & Etxeberria, A. (2017). Light and gas barrier properties of PLLA/metallic nanoparticles composite films. *European Polymer Journal*, *91*, 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.03.043>
- Mallakpour, S., & Madani, M. (2015). Effect of functionalized TiO₂ on mechanical, thermal and swelling properties of chitosan-based nanocomposite films. *Polymer – Plastics Technology and Engineering*, *54*(10), 1035–1042. <https://doi.org/10.1080/03602559.2014.974194>
- Manikandan, A., & Sathiyabama, M. (2015). Green synthesis of copper-chitosan nanoparticles and study of its antibacterial activity. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, *06*(01), 1–5. <https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000251>
- Marsano, E., Vicini, S., Skopińska, J., Wisniewski, M., & Sionkowska, A. (2004). Chitosan and poly(vinyl pyrrolidone): Compatibility and miscibility of blends. *Macromolecular Symposia*, *169*(1), 251–260. <https://doi.org/10.1002/masy.200451426>
- Momeni, S. S., Nasrollahzadeh, M., & Rustaiyan, A. (2016). Green synthesis of the Cu/ZnO nanoparticles mediated by Euphorbia prolifera leaf extract and investigation of their catalytic activity. *Journal of Colloid and Interface Science*, *472*, 173–179. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.03.042>
- Moradi, Z., Esmaili, M., & Almasi, H. (2019). Development and characterization of kefiran - Al₂O₃ nanocomposite films: Morphological, physical and mechanical properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, *122*, 603–609. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.193>
- Morioka, T., Takesue, M., Hayashi, H., Watanabe, M., & Smith, R. L. (2016). Antioxidation properties and surface interactions of polyvinylpyrrolidone-capped zerovalent copper nanoparticles synthesized in supercritical water. *ACS Applied Materials and Interfaces*, *8*(3), 1627–1634. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b07566>
- Muramatsu, H., Matsumoto, K., Minekawa, S., Yagi, Y., & Sasai, S. (2001). Ortho-positronium annihilation parameters in polyvinyl alcohol films with various degrees of polymerization, saponification and crystallinity. *Radiochimica Acta*, *89*(2), 119–123. <https://doi.org/10.1524/ract.2001.89.2.119>
- Muzzarelli, R. A. A. (2011). Potential of chitin/chitosan-bearing materials for uranium recovery: An interdisciplinary review. *Carbohydrate Polymers*, *84*(1), 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.12.025>

Capítulo3: Nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de cobre

- Nasrollahzadeh, M., Atarod, M., & Sajadi, S. M. (2017). Biosynthesis, characterization and catalytic activity of Cu/RGO/Fe₃O₄ for direct cyanation of aldehydes with K₄[Fe(CN)₆]. *Journal of Colloid and Interface Science*, *486*, 153–162. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.09.053>
- Nasrollahzadeh, M., Maham, M., Rostami-Vartooni, A., Bagherzadeh, M., & Sajadi, S. M. (2015). Barberry fruit extract assisted in situ green synthesis of Cu nanoparticles supported on a reduced graphene oxide-Fe₃O₄ nanocomposite as a magnetically separable and reusable catalyst for the O-arylation of phenols with arylhalides under ligand-free cond. *RSC Advances*, *5*(79), 64769–64780. <https://doi.org/10.1039/c5ra10037b>
- Noshirvani, N., Hong, W., Ghanbarzadeh, B., Fasihi, H., & Montazami, R. (2018). Study of cellulose nanocrystal doped starch-polyvinyl alcohol bionanocomposite films. *International Journal of Biological Macromolecules*, *107*, 2065–2074. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.083>
- Oleyaei, S.A., Zahedi, Y., Ghanbarzadeh, B., & Moayedi, A.A. (2016). Modification of physicochemical and thermal properties of starch films by incorporation of TiO₂ nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, *89*, 256–264. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.078>
- Pazos-Ortiz, E., Roque-Ruiz, J. H., Hinojos-Márquez, E. A., López-Esparza, J., Donohué-Cornejo, A., Cuevas-González, J. C., Espinosa-Cristóbal, L. F., & Reyes-López, S. Y. (2017). Dose-dependent antimicrobial activity of silver nanoparticles on polycaprolactone fibers against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Journal of Nanomaterials*, *2017*. <https://doi.org/10.1155/2017/4752314>
- Ponce, A. A., & Klabunde, K.J. (2005). Chemical and catalytic activity of copper nanoparticles prepared via metal vapor synthesis. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, *225*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2004.08.019>
- Rafique, M., Sadaf, I., Rafique, M.S., & Tahir, M.B. (2017). A review on green synthesis of silver nanoparticles and their applications. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, *45*(7)(November 2016), 1272–1291. <https://doi.org/10.1080/21691401.2016.1241792>
- Ramesan, M.T. (2013). Synthesis, characterization, and conductivity studies of polypyrrole/copper sulfide nanocomposites. *Journal of Applied Polymer Science*, *128*(3), 1540–1546. <https://doi.org/10.1002/app.38304>
- Rhim, J. W., & Wang, L. F. (2013). Mechanical and water barrier properties of agar/κ-carrageenan/konjac glucomannan ternary blend biohydrogel films. *Carbohydrate Polymers*, *96*(1), 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.083>

Capítulo3: Nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de cobre

- Rivero, S., Damonte, L., García, M. A., & Pinotti, A. (2016). An insight into the role of glycerol in chitosan films. *Food Biophysics*, *11*(2), 117–127. <https://doi.org/10.1007/s11483-015-9421-4>
- Sampath, M., Vijayan, R., Tamilarasu, E., Tamilselvan, A., & Sengottuvelan, B. (2014). Green synthesis of novel Jasmine Bud-shaped copper nanoparticles. *Journal of Nanotechnology*, *2014*, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2014/626523>
- Shankar, S., Teng, X., & Rhim, J.-W. (2014). Properties and characterization of agar/CuNP bionanocomposite films prepared with different copper salts and reducing agents. *Carbohydrate Polymers*, *114*, 484–492. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.08.036>
- Tokarek, K., Hueso, J. L., Kuśtrowski, P., Stochel, G., & Kyzioł, A. (2013). Green synthesis of chitosan-stabilized copper nanoparticles. *European Journal of Inorganic Chemistry*, *28*, 4940–4947. <https://doi.org/10.1002/ejic.201300594>
- Wang, N., Ding, E., & Cheng, R. (2007). Thermal degradation behaviors of spherical cellulose nanocrystals with sulfate groups. *Polymer*, *48*(12), 3486–3493. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2007.03.062>
- Wang, Y., Chen, P., & Liu, M. (2006). Synthesis of well-defined copper nanocubes by a one-pot solution process. *Nanotechnology*, *17*(24), 6000–6006. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/17/24/016>
- Yu, W., Xie, H., Chen, L., Li, Y., & Zhang, C. (2009). Synthesis and characterization of monodispersed copper colloids in polar solvents. *Nanoscale Research Letters*, *4*(5), 465–470. <https://doi.org/10.1007/s11671-009-9264-3>
- Zain, N. M., Stapley, A. G. F., & Shama, G. (2014). Green synthesis of silver and copper nanoparticles using ascorbic acid and chitosan for antimicrobial applications. *Carbohydrate Polymers*, *112*, 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.05.081>
- Ziegler, K. J., Doty, R. C., Johnston, K. P., & Korgel, B. A. (2001). Synthesis of organic monolayer-stabilized copper nanocrystals in supercritical water. *Journal of the American Chemical Society*, *123*(32), 7797–7803. <https://doi.org/10.1021/ja010824w>



Capítulo 4

Matrices de quitosano-PVA funcionalizadas con Np

4.1 INTRODUCCIÓN

Recientemente, se ha prestado más atención a los polímeros naturales con un enfoque en el desarrollo sostenible y la preservación ambiental, como se ha mencionado en capítulos anteriores (Rodríguez-González y col., 2012). Siguiendo esta tendencia, se ha intentado reemplazar los polímeros derivados del petróleo con polímeros biodegradables (Goffin y col., 2011). En este contexto, los biopolímeros se consideran potenciales reemplazos para materiales plásticos; sin embargo, algunas de sus propiedades deben mejorarse para posicionarlos como materiales competitivos con los derivados fósiles, especialmente en sus propiedades mecánicas, térmicas y de barrera (Kanmani y Rhim, 2014).

El uso de polímeros naturales tiene varias ventajas que incluyen la no toxicidad, la biodegradabilidad, la amplia disponibilidad y la biocompatibilidad, especialmente en comparación con sus contrapartes sintéticas (El Miri y col., 2015).

El quitosano se encuentra entre los polímeros naturales más importantes debido a su diverso espectro de aplicaciones que van desde productos farmacéuticos hasta ciencia de los materiales (Jayakumar y col., 2010; Dash y col., 2011; Rogovina y col., 2011; Vasconcellos y col., 2011; El Achaby y col., 2014). Es potencialmente miscible con algunos polímeros sintéticos principalmente debido a la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares entre los grupos hidroxilo de los polímeros sintéticos y los grupos hidroxilo y amino del Q (Bonilla y col., 2014). Sin embargo, algunos obstáculos impiden su uso extensivo, particularmente su flexibilidad y tenacidad relativamente bajas, alto grado de hinchamiento en agua, características de barrera al vapor de agua relativamente pobres (Butler y col., 1996; El Miri y col., 2015). La mezcla de polímeros es uno de los métodos más efectivos para crear nuevos materiales con las propiedades deseadas (Sionkowska, 2011). Las matrices producidas a partir de la mezcla polimérica exhiben propiedades modificadas en comparación con las matrices hechas de un componente individual (Sionkowska, 2011; El Miri y col., 2015). Como los polímeros sintéticos se obtienen fácilmente y tienen un bajo costo de producción, la mezcla de polímeros naturales y sintéticos puede mejorar la relación costo-rendimiento de las matrices resultantes (Bahrami y col., 2003; Jia y col., 2007; Chhatri y col., 2011; Pandele y col., 2014).

Capítulo 4: Matrices de quitosano-poli(vinil alcohol) funcionalizadas con nanopartículas

En un esfuerzo por superar estos desafíos científicos y tecnológicos, se han realizado varios intentos para mejorar las propiedades mecánicas y funcionales del quitosano (Marín-Silva y col., 2019) mediante mezclas con polivinil pirrolidona (PVP), alcohol polivinílico (PVA), poli (óxido de etileno), policaprolactona y poliacrilamida (Sionkowska, 2011; El Achaby y col., 2014).

Por otra parte, el alto costo de este biopolímero hace que aún no esté ampliamente disponible para aplicaciones industriales como material activo. Una alternativa es mezclar el quitosano con otro polímero soluble en agua, como el alcohol polivinílico (PVA). Debido a su alta resistencia al alcohol, grasa y disolventes, alta estabilidad química, excelentes propiedades de barrera y oxígeno, las películas de PVA se utilizan ampliamente para envasar y administrar medicamentos (Hajji y col., 2017).

El PVA es un polímero sintético adecuado para mezclar con biopolímeros y mejorar las características funcionales debido a sus propiedades físicas, que surgen de la presencia de grupos OH y la formación de enlaces de hidrógeno (Bonilla y col., 2014; Ghaderi y col., 2019). Además, es fácilmente soluble en agua, biodegradable y tiene una excelente resistencia química y buenas propiedades mecánicas. Debido a su capacidad para la formación de matrices, el PVA se usa como ingrediente en aplicaciones alimentarias y farmacéuticas, bajo la forma de recubrimientos y películas (Ghaderi y col., 2019; Giteru y col., 2019).

Como es bien conocido, el quitosano posee grupos hidroxilo y amino que son potencialmente miscibles con PVA debido a la formación de enlaces de hidrógeno (Jia y col., 2007; Wang y col., 2011; Santos y col., 2014). La combinación de estos polímeros permite la formación de mezclas de PVA-Q que puede conducir a la preparación de una nueva matriz biocompatible y homogénea para el desarrollo de nanocompuestos.

Por otra parte, la tecnología de nanocompuestos que utiliza nanopartículas ya se ha demostrado como una forma efectiva de producir nuevos materiales con propiedades específicas y altas prestaciones (Paul y Robeson, 2008; Chivrac y col., 2009; El Miri y col., 2015).

Dado que tanto las Nps metálicas, como Q y PVA tienen muchas ventajas, estos tres componentes se usan ampliamente en la preparación de materiales de empaque,

Capítulo 4: Matrices de quitosano-poli(vinil alcohol) funcionalizadas con nanopartículas

generando así datos de referencia sobre nuevos materiales compuestos; sin embargo, según la revisión conceptual de Ghaderi y col. (2019), no hay demasiados estudios sobre combinaciones de los tres materiales.

Actualmente, un método novedoso para mejorar las propiedades de las matrices biopoliméricas es el uso de nanopartículas, que pueden cumplir no solo la función de refuerzo sino que también podrían actuar como ingrediente activo. En los últimos años, el concepto de agentes activos para matrices ha recibido mucha atención. Estos ingredientes activos en las matrices pueden extender la vida útil de los productos alimenticios, al exhibir actividades antimicrobianas y / o antioxidantes (Cacciotti y col., 2018; Sothornvit, 2019). Se ha informado sobre el efecto conservador de las matrices con nanofibras para todo el espectro de productos alimenticios (Luo y col., 2015; Pinto y col., 2015; Youssef y col., 2015; Donglu y col., 2016; Echeverría y col., 2018; Lotfi y col., 2018; Wu y col., 2018; Xu y col., 2018; Mathew y col., 2019). El desarrollo de la nanotecnología ha llevado al diseño de materiales de matrices nanocompuestas en los que las nanorellenos desempeñan un papel activo.

4.1.1 Tipos de biopolímeros y nanopartículas

Nuevas tendencias y perspectivas en nanotecnología han facilitado el camino para usar nanopartículas como agentes activos en diferentes áreas. Esta solución se aplica a la producción de materiales biodegradables, que se basa en biopolímeros y nanopartículas. Este tipo de material nanocompuesto es capaz de reemplazar materiales de envases sintéticos, ya que tiene muchas ventajas, propiedades mecánicas y de textura óptimas, hidrofobicidad baja, propiedades antimicrobianas y susceptibilidad a la biodegradación, entre otras.

Los materiales híbridos, que son materiales hechos de materiales orgánicos e inorgánicos, atraen cada vez más atención en diversos campos de investigación. En comparación con los materiales convencionales, los materiales híbridos orgánico-inorgánicos tienen características derivadas de la parte inorgánica (rigidez, estabilidad dimensional y estabilidad térmica), así como las propiedades de los materiales orgánicos (tenacidad y la facilidad, homogeneidad con la que se puede mezclar) (Nicole y col., 2014; Wu y col., 2017; Jamróz y col., 2019).

4.1.2 Efectos de los nanomateriales sobre las propiedades funcionales de las películas basadas en polímeros

La Figura 4.1 muestra el esquema mostrando la formulación de nanomateriales dentro de la matriz polimérica junto con sus propiedades funcionales.

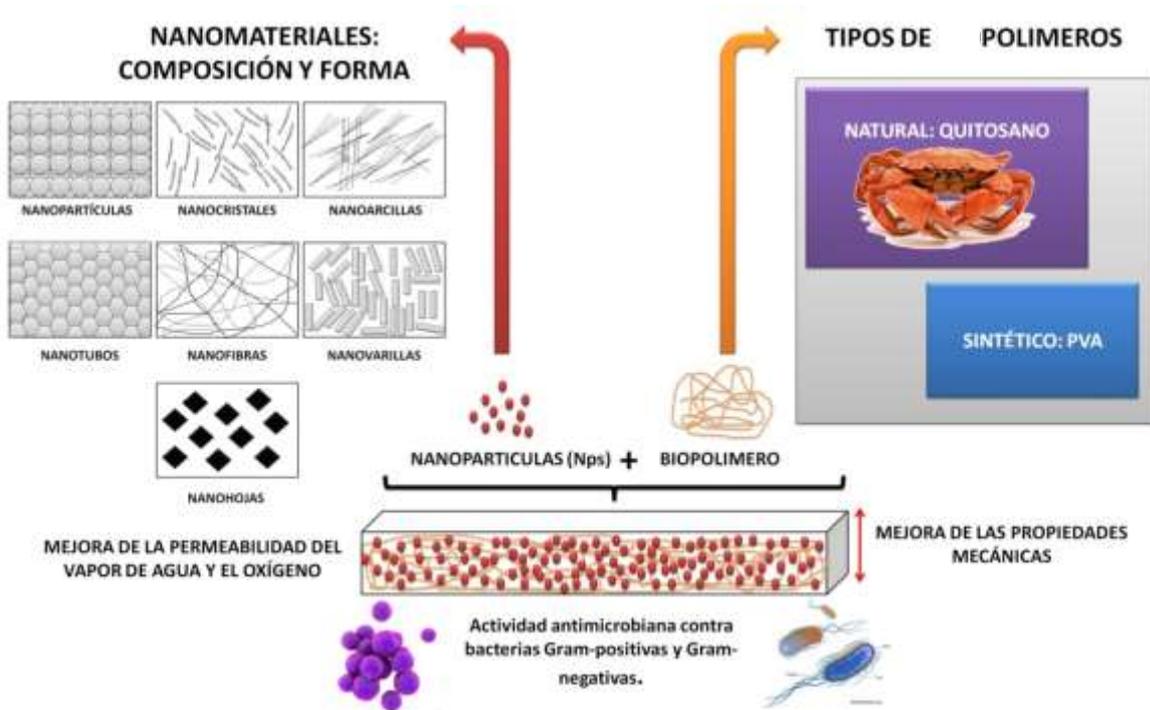


Figura 4.1. Esquema genérico de obtención de películas nanocompuestas. Adaptado de El Miri y col. (2015).

Se obtuvieron nanopartículas metálicas de plata (NpAg) y cobre (NpCu) mediante síntesis *verde*. Se utilizaron varias técnicas para caracterizar los materiales en diferentes etapas de obtención, descritas y analizadas en los **Capítulos 2 y 3**. Luego, las nanopartículas obtenidas se dispersaron en una mezcla de polímeros Q-PVA para fabricar matrices nanocompuestas QNp-PVA a través de la técnica de moldeo y secado. Las propiedades estructurales, térmicas y mecánicas de las matrices nanocompuestas preparadas fueron evaluadas y discutidas en este **Capítulo**.

4.2 OBJETIVOS

4.2.1 Objetivo general

Mejorar las propiedades de los nanocompuestos mediante formulaciones que combinen las suspensiones de quitosano cargadas con nanopartículas con una solución de PVA en distintas proporciones

4.2.2 Objetivos específicos

- Evaluar las propiedades de las matrices compuestas cargadas con nanopartículas de Ag o Cu: resistencia al agua, ópticas, mecánicas
- Analizar las interacciones entre los componentes de los nanocompuestos mediante ATR-FTIR
- Evaluar las matrices nanocompuestas QNp-PVA como materiales biocompatibles

4.3 MATERIALES Y MÉTODOS

4.3.1 Materiales

Para la obtención de las matrices se utilizó quitosano al 1% (p/v), alcohol polivinílico (PVA) Elvanol T-25 proporcionado por DuPont (USA) con un grado de hidrólisis del 86-89 % y un peso molecular de 50 a 55 kDa. La solución de PVA se preparó con una concentración del 1% (p/v) por solubilización en agua milli-Q a una temperatura de 95°C bajo agitación magnética durante 5 horas.

4.3.2 Preparación de las películas

La metodología para la preparación de las suspensiones de quitosano con nanopartículas de plata o cobre se describió previamente en los **Capítulos 2 y 3**, respectivamente. A fin de mejorar las propiedades de las matrices, las suspensiones a base de Q cargadas con nanopartículas se mezclaron con alcohol polivinílico (PVA) al 1% (p/v) en distintas proporciones QNp:PVA 90:10, 70:30 y 50:50 (p/p) donde 90, 70 y 50 representan las proporciones de la suspensión a base de Q y 10, 30 y 50 se corresponden con las proporciones de PVA, respectivamente. Una vez realizadas las mezclas, las mismas se agitaron hasta lograr una perfecta homogeneización y posteriormente se sonicaron para evitar potenciales aglomeraciones. Las mezclas filmogénicas se extendieron en placas para su secado en estufa de convección forzada a 37°C hasta peso constante.

Las matrices nanocompuestas se acondicionaron a 20°C y 65% HR durante aproximadamente 10 días antes de realizar los ensayos correspondientes.

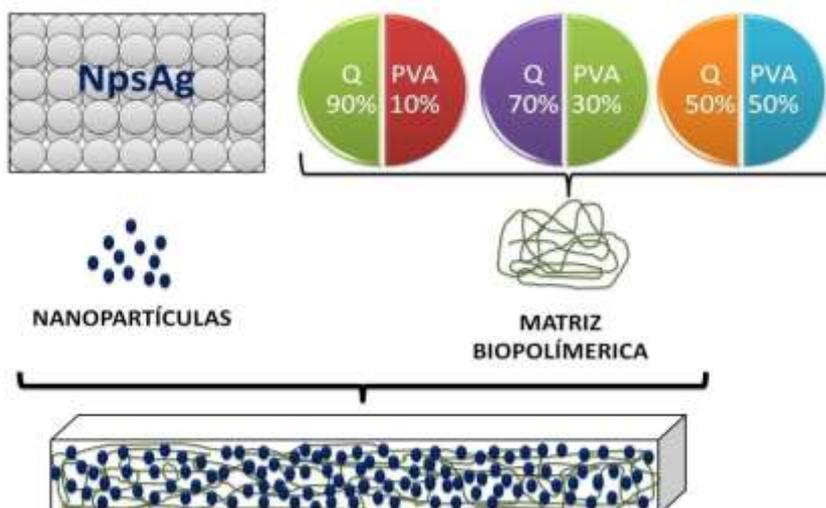


Figura 4.2 Esquema de obtención de las matrices nanocompuestas QAg-PVA con diferentes concentraciones de nanopartículas de plata (NpAg).

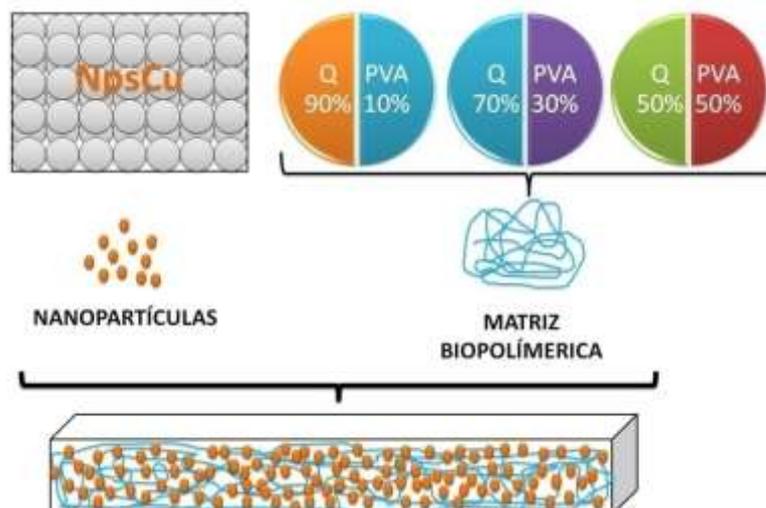


Figura 4.3 Esquema de obtención de las matrices nanocompuestas QCu-PVA con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre (NpCu).

4.3.3 Propiedades fisicoquímicas de las matrices nanocompuestas QNp-PVA con agregado de nanopartículas metálicas (Ag/Cu)

Las técnicas para la caracterización de las matrices obtenidas QNp-PVA se detallaron en el **Capítulo 2**. El siguiente diagrama muestra un resumen de las técnicas utilizadas para la caracterización de las matrices.

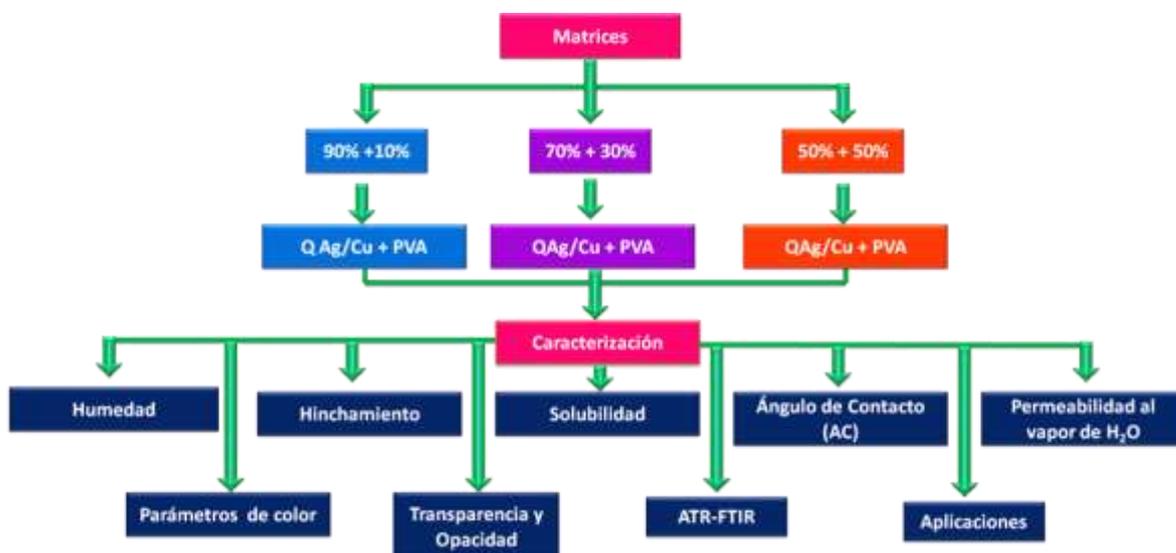


Figura 4.4. Caracterización de las matrices nanocompuestas formuladas con diferentes proporciones de quitosano funcionalizado con nanopartículas de Ag o Cu y PVA (90:10, 70:30 y 50:50).

En la **Tabla 4.1** se muestra la nomenclatura de las matrices nanocompuestas QAg_x-PVA y QCu_x-PVA cargadas con nanopartículas, donde x=1,2,3,4, así como la proporción entre la suspensión de quitosano cargada con nanopartículas y la solución de PVA.

Las películas y matrices nanocompuestas se obtuvieron por moldeo y secado en estufa de convección forzada a 37°C. Luego se acondicionaron en una cámara controlada a 20°C y 65% de humedad relativa (HR) previo a la realización de los ensayos de caracterización.

Tabla 4.1. Nomenclatura de las matrices nanocompuestas QAg_x-PVA y QCu_x-PVA cargadas con nanopartículas

Nomenclatura		Muestra	Q:PVA (p/p)
Q	Q	Q	100:0
PVA	PVA	PVA	0: 100
9QAg ₁ -1PVA	9QCu ₁ -1PVA	QNp ₁ +PVA	90:10
9QAg ₂ -1PVA	9QCu ₂ -1PVA	QNp ₂ +PVA	
9QAg ₃ -1PVA	9QCu ₃ -1PVA	QNp ₃ +PVA	
9QAg ₃ -1PVA	9QCu ₃ -1PVA	QNp ₄ +PVA	
7QAg ₁ -3PVA	7QCu ₁ -3PVA	QNp ₁ +PVA	70:30
7QAg ₂ -3PVA	7QCu ₂ -3PVA	QNp ₂ +PVA	
7QAg ₃ -3PVA	7QCu ₃ -3PVA	QNp ₃ +PVA	
7QAg ₄ -3PVA	7QCu ₄ -3PVA	QNp ₄ +PVA	
5QAg ₁ -5PVA	5QCu ₁ -5PVA	QNp ₁ +PVA	50:50
5QAg ₂ -5PVA	5QCu ₂ -5PVA	QNp ₂ +PVA	
5QAg ₃ -5PVA	5QCu ₃ -5PVA	QNp ₃ +PVA	
5QAg ₄ -5PVA	5QCu ₄ -5PVA	QNp ₄ +PVA	

Q: quitosano, PVA: alcohol polivinílico, Np: nanopartículas de Cu o Ag

4.4 RESULTADOS y DISCUSIÓN

4.4.1 Susceptibilidad al agua de los nanocompuestos

La solubilidad controlada de las matrices biodegradables ofrece beneficios potenciales para su uso como material de envasado. El contenido de humedad es un parámetro relacionado con el volumen total ocupado por las moléculas de agua en la red de la matriz, mientras que la solubilidad está relacionada con la hidrofilia del material (Jiang y col., 2010). Debido a la naturaleza hidrofílica del quitosano y el PVA, cuando estas películas se exponen a condiciones de humedad relativa alta, las moléculas de agua son absorbidas por las cadenas poliméricas, ejerciendo un efecto plastificante y resultando en cambios en las propiedades mecánicas y de barrera (Aguirre-Loredo y col., 2016; Haghghi y col., 2020).

Tabla 4.2. Efecto de la incorporación de alcohol polivinílico (PVA) sobre el grado de hinchamiento, contenido de humedad y solubilidad de matrices nanocompuestas de Ag o Cu (QAg-PVA/ QCu-PVA). Los valores mostrados corresponden al promedio de las formulaciones QAg_x-PVA y QCu_x-PVA con x=1,2

Muestra	Hinchamiento (%)	Solubilidad (%)	Humedad (%)
Q	370 (23) ^d	52.2 (3.1) ^e	18.1 (1.3) ^c
PVA	1286 (35) ^e	n.d	33.1 (1.3) ^d
5QAg-5PVA	178 (2) ^{b,c}	3.7 (0.2) ^a	14.8 (0.3) ^{a,b,c}
7QAg-3PVA	346 (3) ^d	0.7 (0.03) ^a	16.5 (0.3) ^{b,c}
9QAg-1PVA	222 (5) ^c	0.6 (0.05) ^a	16.5 (0.4) ^{b,c}
5QCu-5PVA	124 (2) ^a	8.3 (0.4) ^b	16.6 (2.2) ^{b,c}
7QCu-3PVA	133 (4) ^{a,b}	14.0 (0.4) ^c	13.9 (0.8) ^{a,b}
9QCu-1PVA	145 (3) ^{a,b}	22.6 (0.2) ^d	12.4 (0.4) ^a

^aDiferentes letras indican diferencias significativas (p<0.05) entre muestras.

La capacidad de hinchamiento de las matrices nanocompuestas juega un papel importante en la actividad antibacteriana, la capacidad de curación de heridas y las aplicaciones biomédicas (Hajji y col., 2017). Dado el carácter hidrofílico del quitosano y del PVA, las matrices compuestas cargadas con nanopartículas metálicas (Ag y/o Cu) absorberán agua en un ambiente húmedo. Todas las matrices compuestas mostraron menor grado de hinchamiento comparadas con las películas Q y PVA independientemente

Capítulo 4: Matrices de quitosano-poli(vinil alcohol) funcionalizadas con nanopartículas

de la concentración de nanopartículas metálicas (Ag y/o Cu) (Tabla 4.2). El PVA es un polímero más hidrofílico que el quitosano debido a su gran número de grupos hidroxilo como se puso de manifiesto a través del grado de hinchamiento de la matriz PVA control (1286%). Datos reportados por Hajji y col. (2017) explicaron que las propiedades de hinchamiento están muy influenciadas por el contenido de PVA en las matrices. De hecho, el valor de hinchamiento más bajo se observó en la formulaciones 50:50 con NpAg, probablemente relacionado con la reticulación de la amina e hidroxilo causado por la formación de una estructura rígida entre las cadenas de los polímeros que llevaron a una reducción significativa en su capacidad de absorción de agua (Costa-Júnior y col., 2009). El quitosano contribuyó a reducir la afinidad por el agua de la matriz debido a su menor contenido de grupos hidrofílicos por unidad molecular, comparado con el PVA; también se produjeron enlaces de hidrógeno intramoleculares e intermoleculares entre las cadenas de PVA debido a las altas fuerzas hidrofílicas. Por tanto, el hinchamiento de la matriz nanocompuesta se podría asignar principalmente al porcentaje de PVA utilizado en la mezcla con la solución de quitosano (Costa y Mansur, 2008; Hajji y col., 2016).

Por otra parte, Hajji y col. (2016) reportaron que la absorción de agua crece de manera constante hasta alcanzar una meseta, dependiendo del contenido de nanopartículas metálicas. Una posible razón que explica la disminución del hinchamiento con la concentración de nanopartículas en las matrices de nanocompuestos fue la unión entre las Nps, los grupos hidroxilo y amino en las cadenas de Q-PVA resultando en el entrecruzamiento de la matriz que restringiría la capacidad de penetración del agua. Similares resultados fueron informados por Hajji y col. (2017). La adición de Np redujo la incorporación de agua debido a que algunos de los grupos $-OH$ del PVA podrían interactuar con las nanopartículas y no estarían disponibles para interactuar con moléculas de agua.

George y col. (2012) estudiaron nanocompuestos de PVA, nanocristales de celulosa (BCNC) y NpAg. La adición de BCNC resultó en una menor incorporación de agua, posiblemente debido a la interacción entre BCNC y las NpAg con los sitios hidrofílicos de PVA. Tipos similares de interacciones fueron reportados previamente con gelatina y nano compuestos HPMC. Otra posibilidad es que la incorporación de BCNC podría reducir el volumen libre de la red de polímeros, que restringiría la movilidad molecular de las cadenas de PVA.

Capítulo 4: Matrices de quitosano-poli(vinil alcohol) funcionalizadas con nanopartículas

Cabe resaltar que no se han encontrado informes sobre matrices de Q-PVA con agregados de NpCu pero las matrices conteniendo las dos Nps metálicas mostraron que no existieron diferencias en las propiedades de humectabilidad (Hajji y col., 2016).

La mezcla de quitosano con polímeros sintéticos (alcohol polivinílico - PVA, polivinil pirrolidona - PVP, ácido poliláctico - PLA) se ha estudiado por los efectos positivos sobre las características físicas, mecánicas y biológicas de las matrices compuestas. El éxito de los polímeros sintéticos como materiales biodegradables depende de su diversa gama de propiedades mecánicas, resistencia química y bajos costos de producción en comparación con los polímeros naturales (Bourakadi y col., 2019; Haghghi y col., 2020).

4.4.2 Propiedades de barrera (WVP)

El vapor de agua es uno de los principales permeantes estudiados en aplicaciones biomédicas y de envasado de alimentos, ya que puede transferirse desde el ambiente interior o exterior a través de la pared del polímero, lo que resulta en cambios en la calidad del producto y en la vida útil (Kanatt y col., 2012). Como se puede ver en las Figuras 4.5 y 4.6, la permeabilidad WVP de las películas de quitosano puro presentó un valor similar al notificado por Rivero y col. (2009) y el de las películas puras de PVA resultó comparable al obtenido por Lamarra y col. (2020). Dependiendo de las interacciones entre los componentes poliméricos, la mezcla de quitosano con polímeros sintéticos puede mejorar las propiedades de barrera al agua de las matrices (Haghghi y col., 2020).

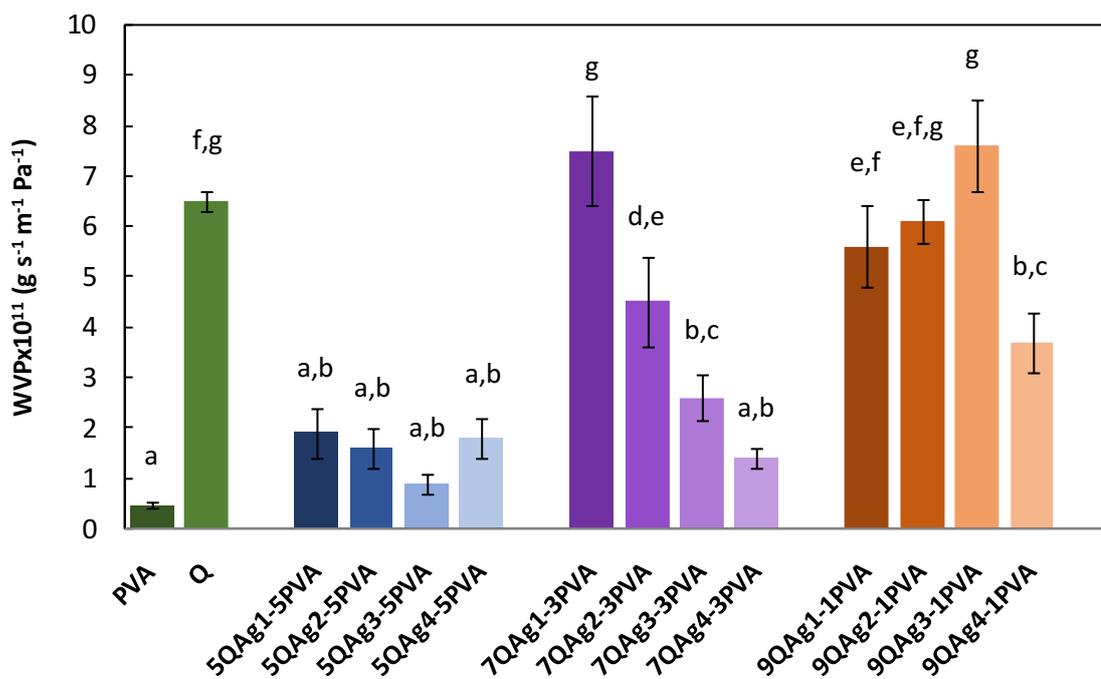


Figura 4.5. Permeabilidad al vapor de agua de las películas individuales PVA y Q y de los nanocompuestos formulados con distintas proporciones de QAg_x:PVA (50:50, 70:30y 90:10), con x=1,2,3,4.

La **Figura 4.5** muestra la WVP de las películas individuales Q y PVA y de los nanocompuestos QAg_x-PVA. Los valores de WVP más bajos se observaron con la proporción 50:50 independientemente de la concentración de NpAg ($p < 0.05$). De acuerdo a **Bonilla y col. (2014)**, la formación de un número razonablemente alto de enlaces OH-NH₂ entre los dos polímeros en las películas con esta relación puede contribuir a limitar la tasa de transferencia de moléculas de agua y por lo tanto el WVP.

Con el aumento de la proporción de QAg (70:30 y 90:10) la WVP se incrementó presentando los valores más altos en el caso de la serie 90:10. Dentro de las formulaciones 7QAg-3PVA, el incremento en la concentración de NpAg llevó a una disminución de los valores de WVP.

Estos resultados podrían deberse a la formación de una matriz más abierta donde las cadenas de polímeros están menos densamente empaquetadas facilitando la transferencia de moléculas de agua a través de la red (**Bonilla y col., 2014**).

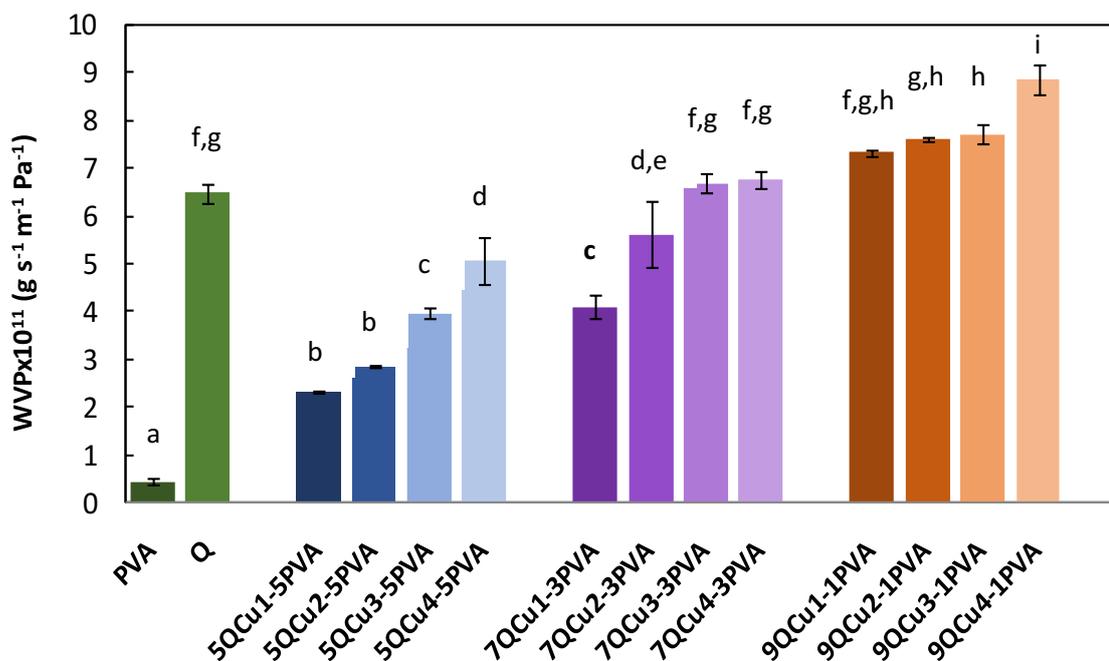


Figura 4.6. Permeabilidad al vapor de agua de las películas individuales PVA y Q y de los nanocompuestos formulados con distintas proporciones de QCu_x-PVA (50:50, 70:30y 90:10), con x=1,2,3,4.

En el caso de las matrices Q-PVA con agregados de nanopartículas de NpCu (Figura 4.6), el comportamiento fue diferente al de los nanocompuestos QAg-PVA y siguió la misma tendencia para las tres series (50:50, 70:30 y 90:10) con un aumento de la permeabilidad a medida que se incrementó la concentración de NpCu. Las matrices 5QCu-5PVA con las menores concentraciones de NpCu presentaron los valores más bajos de WVP que fueron significativamente diferentes de los de la película PVA individual ($p < 0.05$).

4.4.3 Medidas del ángulo de contacto

Los valores del ángulo de contacto con el agua son buenos indicadores del grado de hidrofiliidad de las matrices, siendo más altos cuando la hidrofilia es menor, por lo que el estado final de la gota de agua sobre la superficie de la matriz puede tomarse como una indicación de la humectabilidad de la superficie (Guerrero y col., 2011). Las Tablas 4.3 y 4.4 muestran el ángulo de contacto estático de las matrices desarrolladas. En el caso de los nanocompuestos formulados con la mezcla QNp y PVA habría dos efectos contrapuestos. El aumento en la proporción de PVA llevaría a una disminución del ángulo de contacto debido a su hidrofiliidad y el aumento de la concentración de nanopartículas produciría

Capítulo 4: Matrices de quitosano-poli(vinil alcohol) funcionalizadas con nanopartículas

un efecto contrario debido a su carácter hidrófobo. A su vez se observó que los AC fueron mayores para las matrices con NpAg que con NpCu probablemente debido a las diferentes interacciones establecidas entre las nanopartículas y la matriz.

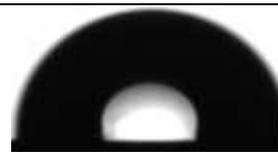
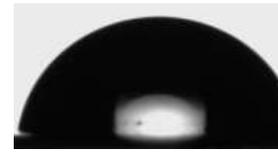
El ángulo de contacto del Q puro fue 88.1 ± 1.9 , lo que concuerda con los datos de bibliografía. En general, los ángulos de contacto de las matrices nanocompuestas fueron menores que 90° , indicando el carácter hidrofílico de las superficies de las películas obtenidas (El-Hefian y col., 2011). Las matrices funcionalizadas con NpAg presentaron valores superiores de ángulo de contacto que las cargadas con NpCu.

Tabla 4.3. Ángulo de contacto de las matrices nanocompuestas con distintas relaciones QAg:PVA funcionalizadas con nanopartículas de plata (NpAg)

Ángulo de contacto de matrices QAg _x -PVA, relación 90:10			
			
84.0 (2.0) ^a QAg ₁ -PVA	87.7 (1.9) ^{a,b} QAg ₂ -PVA	90.6 (2.3) ^{a,b} QAg ₃ -PVA	92.1 (2.0) ^b QAg ₄ -PVA
*Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre muestras.			
Ángulo de contacto de matrices QAg _x -PVA, relación 70:30			
			
84.1 (3.7) ^a QAg ₁ -PVA	88.0 (2.3) ^{a,b} QAg ₂ -PVA	92.8 (2.0) ^b QAg ₃ -PVA	86.6 (1.5) ^{a,b} QAg ₄ -PVA
*Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre muestras.			
Ángulo de contacto de matrices QAg _x -PVA, relación 50:50			
			
89.0 (3.2) ^a QAg ₁ -PVA	87.7 (2.2) ^a QAg ₂ -PVA	90.8 (3.1) ^a QAg ₃ -PVA	87.4 (4.1) ^a QAg ₄ -PVA

*Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre muestras.

Tabla 4.4. Ángulo de contacto de las matrices nanocompuestas con distintas relaciones QCu:PVA funcionalizadas con nanopartículas de cobre (NpCu)

Ángulo de contacto de matrices QCu _x -PVA, relación 90:10			
			
80.2 (4.9) ^a QCu ₁ -PVA	79.6 (6.9) ^a QCu ₂ -PVA	75.2 (5.6) ^a QCu ₃ -PVA	73.4 (4.6) ^a QCu ₄ -PVA
*Diferentes letras indican diferencias significativas (p<0.05) entre muestras.			
Ángulo de contacto de matrices QCu _x -PVA, relación 70:30			
			
85.1 (4.9) ^a QCu ₁ -PVA	78.0 (4.1) ^a QCu ₂ -PVA	84.9 (3.8) ^a QCu ₃ -PVA	79.6 (3.7) ^a QCu ₄ -PVA
*Diferentes letras indican diferencias significativas (p<0,05) entre muestras.			
Ángulo de contacto de matrices QCu _x -PVA, relación 50:50			
			
76.4 (2.9) ^a QCu ₁ -PVA	79.6 (5.0) ^{a,b} QCu ₂ -PVA	88.6 (4.6) ^{a,b} QCu ₃ -PVA	91.1 (4.8) ^b QCu ₄ -PVA
^a Diferentes letras indican diferencias significativas (p<0.05) entre muestras			

4.4.4 Propiedades ópticas

Los espectros de absorción UV-Visible de las matrices de Q, PVA, Q-PVA con agregados nanopartículas metálicas se muestran en la [Tabla 4.5](#).

Una de las características deseadas del material de envasado es la protección de los alimentos de los efectos de la luz, especialmente a la radiación ultravioleta ([Kanatt y col., 2012](#)), que presentó los valores más altos en el caso de las matrices con NpCu. Mientras tanto, las matrices con NpAg exhibieron los mayores valores de opacidad y transparencia.

Capítulo 4: Matrices de quitosano-poli(vinil alcohol) funcionalizadas con nanopartículas

La transmisión de luz en las matrices mezcla de QAg-PVA en el rango de longitud de onda de 200 a 700 nm se muestra en la [Figura 4.5](#). La banda a 218 nm en el espectro UV se asigna a $n-\pi^*$. Otro hombro se observó alrededor de 273-280 nm y puede ser atribuido a $\pi-\pi^*$ debido a enlaces insaturados C=C ([Abdelrazek y col., 2010](#)). El aumento en el hombro con el aumento en el contenido de quitosano podría ser atribuido a la interacción entre el quitosano y el PVA. Los bajos niveles de transmisión en el rango UV pueden tornar a las matrices basadas en QNp-PVA en excelentes barreras para prevenir la oxidación de lípidos inducida por la luz ultravioleta cuando se aplica en envases de alimentos ([Bonilla y col., 2014](#)).

Tabla 4.5. Propiedades ópticas de las matrices nanocompuestas formuladas a base de quitosano y PVA con incorporación de Np. Los valores mostrados corresponden al promedio de las formulaciones QAg₁₋₂-PVA y QCu₁₋₂-PVA

Muestras	Transparencia Abs ₆₀₀ xmm ⁻¹	Opacidad (AUxnm ⁻¹)	Barrera UV (AUx nm ⁻¹)
Q	1.8 (0.11) ^{a,b}	36.0 (2.1) ^a	77.2 (2.7) ^a
PVA	1.3 (0.02) ^a	21.1 (1.1) ^a	156 (9) ^b
5QCu-5PVA	2.9 (0.4) ^{a,b}	56.9 (5.5) ^b	430 (11) ^d
7QCu-3PVA	2.7 (0.3) ^{a,b}	82.9 (7.2) ^c	425 (11) ^d
9QCu-1PVA	3.5 (0.6) ^b	100.1 (8.3) ^c	445 (10) ^d
5QAg-5PVA	6.8 (0.8) ^c	155.8 (3.5) ^d	375 (9) ^c
7QAg-3PVA	5.8 (0.6) ^c	127.6 (6.6) ^e	383 (11) ^c
9QAg-1PVA	10.4 (0.9) ^d	224.1 (7.1) ^f	433 (13) ^d

^aDiferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre muestras

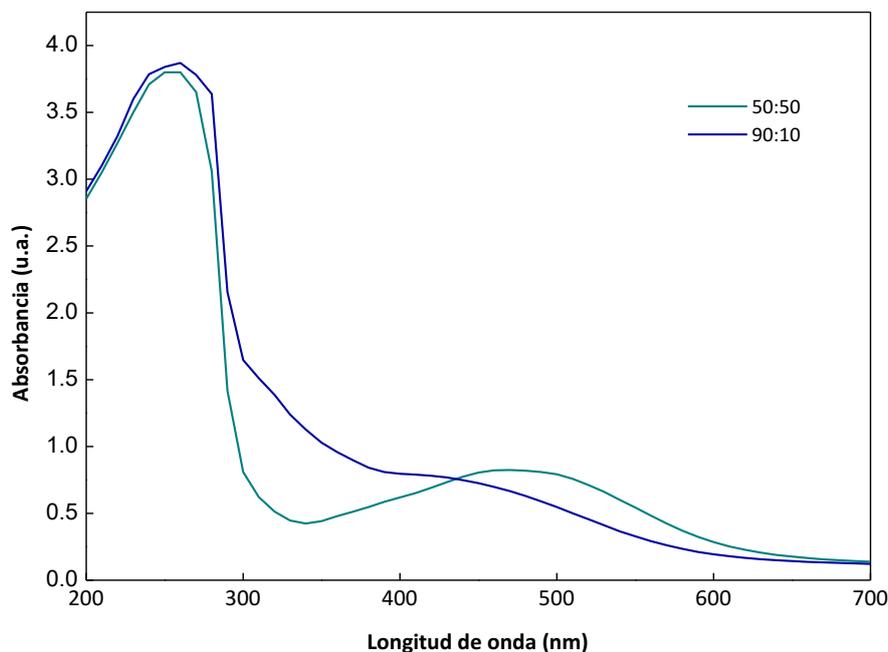


Figura 4.7. Espectro de absorción UV-Vis del nanocompuesto QAg₂-PVA.

Los valores de índice de pardeamiento (IP) siguieron la misma tendencia independientemente del tipo de nanopartículas (Ag o Cu), presentando los valores más bajos cuanto mayor fue el contenido de PVA (Tabla 4.6).

En ambos casos, L^* disminuyó como resultado de la inclusión de Np. La mezcla con PVA tornó el cambio menos abrupto de lo que se pudo inferir que los nanocompuestos fueron más claros y con mayor luminosidad en presencia de PVA (Figuras 4.8 y 4.9).

Asimismo, el cambio de color total ΔE^* siguió en ambos casos la misma tendencia y no presentó diferencias significativas con la proporción creciente de PVA ($p > 0.05$), demostrando la prevalencia de las nanopartículas en el color de los nanocompuestos (Tabla 4.6, Figuras 4.8 y 4.9).

Tabla 4.6. Parámetros de color a^* , b^* , diferencia de color ΔE^* e índice de pardeamiento IP de las matrices nanocompuestas formuladas a base de quitosano y PVA. Los valores mostrados corresponden al promedio de las formulaciones QAg_x-PVA y QCu_x-PVA con x=1,2

Muestras	a^*	b^*	ΔE^*	IP
Q	-1.36 (0.1) ^a	11.9 (0.2) ^b	11.8 (0.6) ^a	12.3 (0.4) ^a
PVA	-0.09 (0.01) ^a	2.3 (0.3) ^a	1.2 (0.02) ^a	2.2 (0.08) ^a
9QAg-1PVA	17.7 (3.1) ^b	34.3 (2.7) ^c	71.9 (5.2) ^b	185.9 (10.1) ^c
7QAg-3PVA	14.6 (2.5) ^b	36.4 (3.1) ^c	65.8 (7.3) ^b	155.9 (11.5) ^b
5QAg-5PVA	10.6 (3.8) ^b	34.4 (3.9) ^c	62.5 (6.7) ^b	137.8 (9.9) ^b
9QCu-1PVA	18.6 (0.5) ^a	42.6 (2.2) ^{c,d}	59.4 (2.5) ^b	80.1 (6.8) ^b
7QCu-3PVA	6.7 (0.1) ^b	45.5 (3.1) ^d	67.1 (5.2) ^b	71.1 (9.4) ^b
5QCu-5PVA	2.9 (0.1) ^b	36.4 (2.7) ^c	68.3 (4.6) ^b	60.9 (5.5) ^b

^aDiferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre muestras

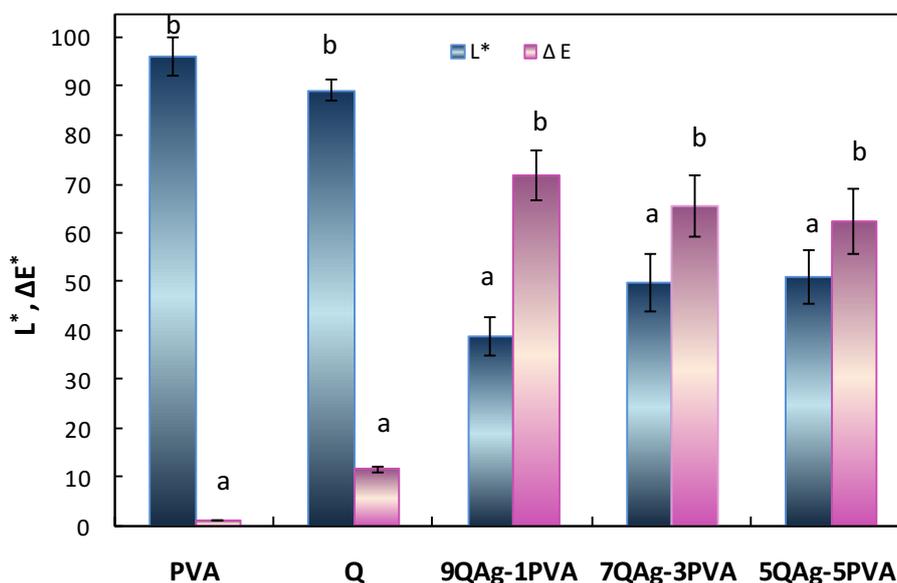


Figura 4.8. Parámetro de luminosidad L^* y diferencia de color ΔE^* de las matrices nanocompuestas QAg-PVA respecto a la película Q y PVA (L^* : color azul; ΔE^* : color rosa). Los valores mostrados corresponden al promedio de las formulaciones QAg_x-PVA con x=1,2

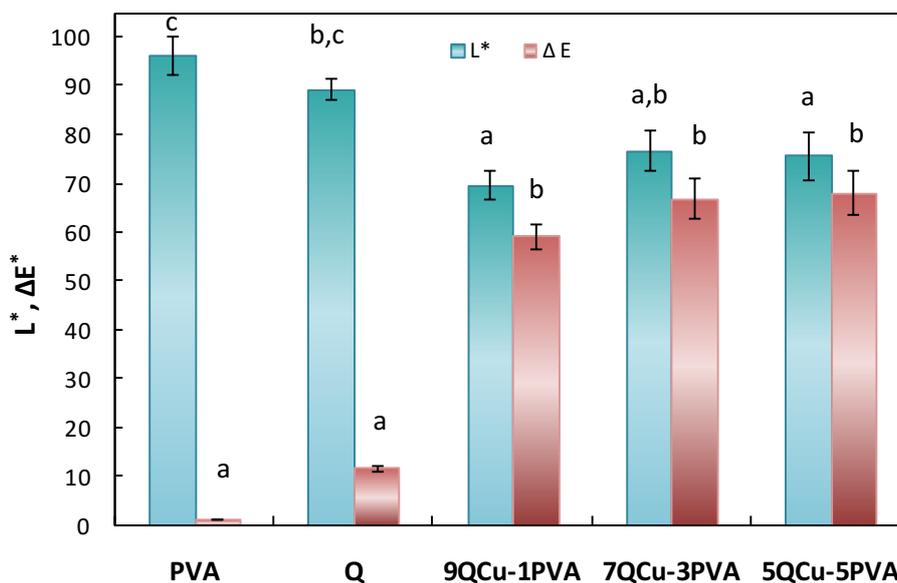


Figura 4.9. Parámetro de luminosidad L^* y diferencia de color ΔE^* de las matrices nanocompuestas QCu-PVA respecto a la película Q y PVA (L^* : color celeste; ΔE^* : color rojizo). Los valores mostrados corresponden al promedio de las formulaciones QCu_x-PVA con x=1,2

4.4.5 Propiedades mecánicas

Considerando las propiedades mecánicas (Tabla 4.7), Jain y col. (2017) obtuvieron resultados similares trabajando con quitosano y PVA.

Las matrices formuladas con mezclas de ambos polímeros mostraron mayores valores de elongación y menores valores de esfuerzo cuanto mayor fue la proporción de PVA (Tabla 4.7).

En los casos de los nanocompuestos, las matrices cargadas con NpAg presentaron esfuerzos significativamente mayores que las cargadas con NpCu ($p < 0.05$). Por el contrario, las matrices QCu-PVA exhibieron menor esfuerzo y mayor elongación. En ambos casos las nanopartículas interactuaron con los polímeros formando matrices entrecruzadas. La presencia de PVA en la mezcla permitió obtener matrices más flexibles.

Tabla 4.7. Valores de esfuerzo (MPa) y elongación % para las matrices nanocompuestas a base de quitosano y PVA funcionalizadas con Np. Los valores mostrados corresponden al promedio de las formulaciones QAg_x-PVA y QCu_x-PVA con x=1,2

Formulación	Esfuerzo (MPa)	Elongación (%)
PVA	25.3 ^a	134.4 (7.2) ^d
Q	51.6 ^{b,c,d}	9.8 (2.7) ^{a,b}
5Q-5PVA	36.3 ^{b,c}	69.0 (7.5) ^{b,c}
7Q-3PVA	44.4 ^b	45.6 (4.7) ^c
9Q-1PVA	56.7 ^b	24.4 (3.4) ^{a,b,c}
5QAg-5PVA	54.8 ^d	18.7 (2.2) ^{a,b}
7QAg-3PVA	55.5 ^{b,c,d}	13.4 (0.9) ^{a,b}
9QAg-1PVA	62.7 ^{c,d}	9.5 (1.5) ^{a,b}
5QCu-5PVA	45.4 ^b	21.1 (4.5) ^{a,b}
7QCu-3PVA	46.9 ^b	14.1 (2.4) ^{a,b}
9QCu-1PVA	50.8 ^{b,c}	6.5 (0.9) ^a

^aDiferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las muestras

En la [Figura 4.10](#) se muestran los perfiles mecánicos de las mezclas control Q-PVA y de los nanocompuestas con NpAg, nanocompuestas con NpCu correspondientes a las formulaciones QAg₁-PVA y QCu₁-PVA.

Las matrices 9Q-1PVA presentaron los mayores valores de esfuerzo ([Figura 4.10a](#)) mientras que las películas 5Q-5PVA exhibieron los mayores valores de elongación de acuerdo con la mayor proporción de PVA en la formulación.

En el caso de los nanocompuestos ([Figura 4.10b y c](#)), los valores de elongación no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) independientemente de la naturaleza de las nanopartículas cuando se compararon muestras formuladas con la misma proporción de polímeros. Sin embargo el esfuerzo resultó significativamente superior para las matrices QAg₁-PVA ($p < 0.05$).

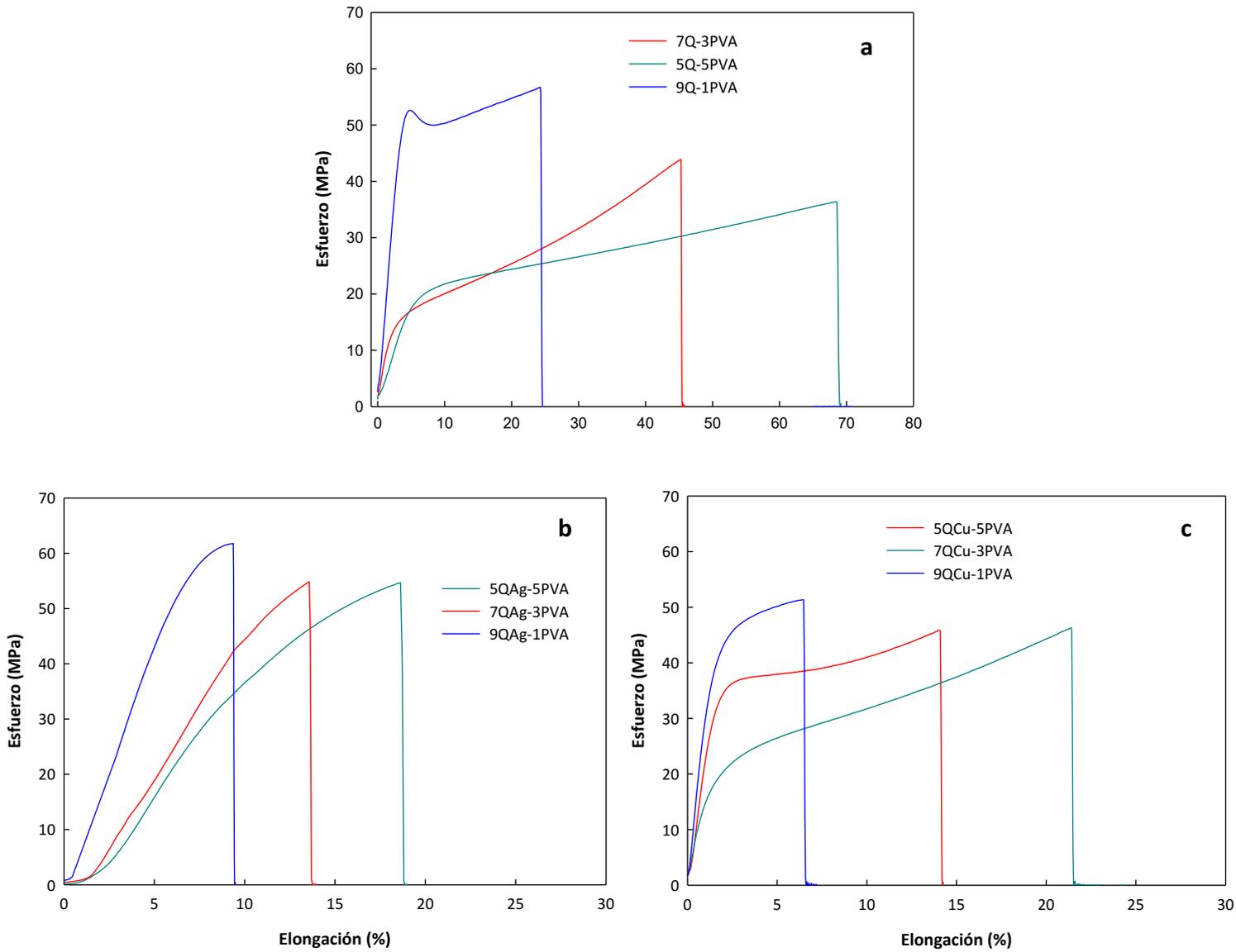


Figura 4.10. Perfiles mecánico de las matrices compuestas de quitosano y PVA (a), nanocompuestas con NpAg (b), nanocompuestas con NpCu (c). Los valores mostrados corresponden a las formulaciones QAg₁-PVA y QCu₁-PVA.

4.4.6 Análisis ATR-FTIR de Q, PVA y las matrices nanocompuestas Q-PVA

En la Figura 4.11 se muestran los espectros ATR-FTIR de las películas individuales Q y PVA.

Para el PVA control, la banda a 3258 cm^{-1} se asigna al estiramiento de la vibración del grupo hidroxilo (Abdelrazek y col., 2010; Costa-Júnior y col., 2009) y el pico a 1420 cm^{-1} corresponde a la vibración de flexión del $-\text{OH}$ (Abdelrazek y col., 2010; Naveen Kumar y col., 2010). La banda correspondiente a al estiramiento asimétrico de la vibración del grupo metileno (CH_2) ocurre a 2937 cm^{-1} (Abdelrazek y col., 2010; Costa-Júnior y col., 2009).

Las bandas de vibración de estiramiento de $\text{C}=\text{O}$ y $\text{C}=\text{C}$ se identificaron a 1657 y 1565 cm^{-1} . Otros picos se encontraron a 1416 cm^{-1} (flexiones $\text{O}-\text{H}$, $\text{C}-\text{H}$), 1334 cm^{-1} debido al estiramiento de la unión $\text{C}-\text{N}$, un hombro 1141 cm^{-1} (estiramiento de CO (secuencia cristalina de PVA)), 1077 cm^{-1} (estiramiento de $\text{C}=\text{O}$ y flexión de OH (secuencia amorfa de PVA)), 920 cm^{-1} (balanceo de CH_2), 831 cm^{-1} (estiramiento de $\text{C}-\text{C}$) (Asran y col., 2010; Liu y col., 2010).

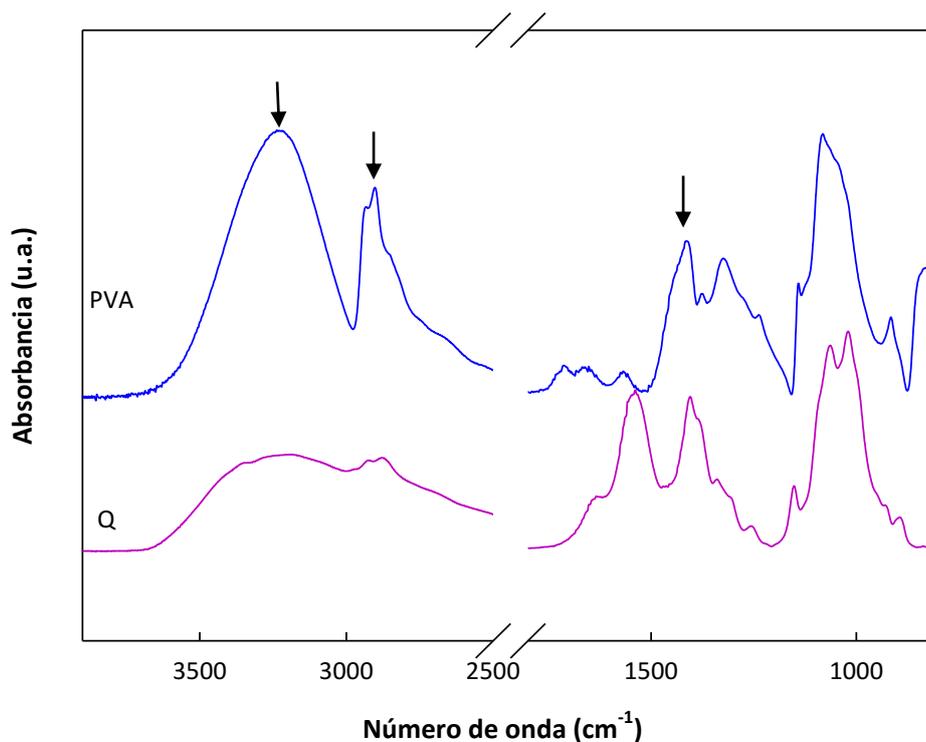


Figura 4.11. Espectros ATR-FTIR de las películas individuales de quitosano (Q) y PVA

Capítulo 4: Matrices de quitosano-poli(vinil alcohol) funcionalizadas con nanopartículas

El pico a 1077 cm^{-1} corresponde al estiramiento de los grupos C-O (Buraidah & Arof, 2011; Kumar y col., 2010), y el ubicado a 1745 cm^{-1} al estiramiento de los grupos acetilo C = O presentes en el esqueleto del PVA (Abdelrazek y col., 2010; Buraidah y Arof, 2011).

Para el quitosano puro, las bandas características principales se asignan a estructuras de sacáridos en 890 , 1020 y 1150 cm^{-1} y bandas características de aminoácidos fuertes a 3430 , 1660 y 1560 cm^{-1} asignadas a las bandas de - estiramiento de OH, amida I y amida II, respectivamente (Abdelrazek y col., 2010; Buraidah y Arof, 2011; Costa-Júnior y col., 2009; Hajji y col., 2016; Kumar y col., 2010). Según Naveen Kumar y col. (2010), el pico a 1250 cm^{-1} corresponde al grupo amino.

La Figura 4.12a y b exhibe los espectros de QAg-PVA y QCu-PVA como representativo de las matrices nanocompuestas con proporciones 90:10, 70:30 y 50:50. Las matrices QNp-PVA con relación 90:10 presentaron bandas que son propias de la película Q individual. Los nanocompuestos con relación 50:50 exhibieron un espectro con bandas características de la película PVA individual mientras las matrices con relación 70:30 mostraron un comportamiento intermedio entre los componentes del sistema.

Para los espectros de las mezclas QNp-PVA, a medida que aumentó el contenido de Q, se observó una disminución de la intensidad de la banda alrededor de 3350 cm^{-1} . Esto puede atribuirse a un grupo hidroxilo (-OH) que estira la vibración del PVA con una amina secundaria (-NH) del quitosano (Abdelrazek y col., 2010; Costa-Júnior y col., 2009; Naveen Kumar y col., 2010). En comparación con los espectros de la película Q control, el pico a 1250 cm^{-1} disminuyó. La banda a 1077 cm^{-1} que indica la presencia de un grupo hidroxilo (-OH) con asociación polimérica y una amina secundaria (-NH) (Abdelrazek y col., 2010) fue disminuyendo con el aumento de la proporción de PVA.

Dado que las moléculas tanto de Q como de PVA son capaces de formar enlaces de hidrógeno, se observa que entre los diferentes grupos moleculares podrían existir algunas interacciones específicas, ya que las moléculas de Q y PVA tienen la capacidad de formar enlaces de hidrógeno.

Los cambios en la posición de los picos de los espectros de las mezclas de Q y PVA se debieron a la buena miscibilidad y a las interacciones químicas entre los grupos amino e hidroxilo del quitosano y los grupos hidroxilo del PVA (Hajji y col., 2016).

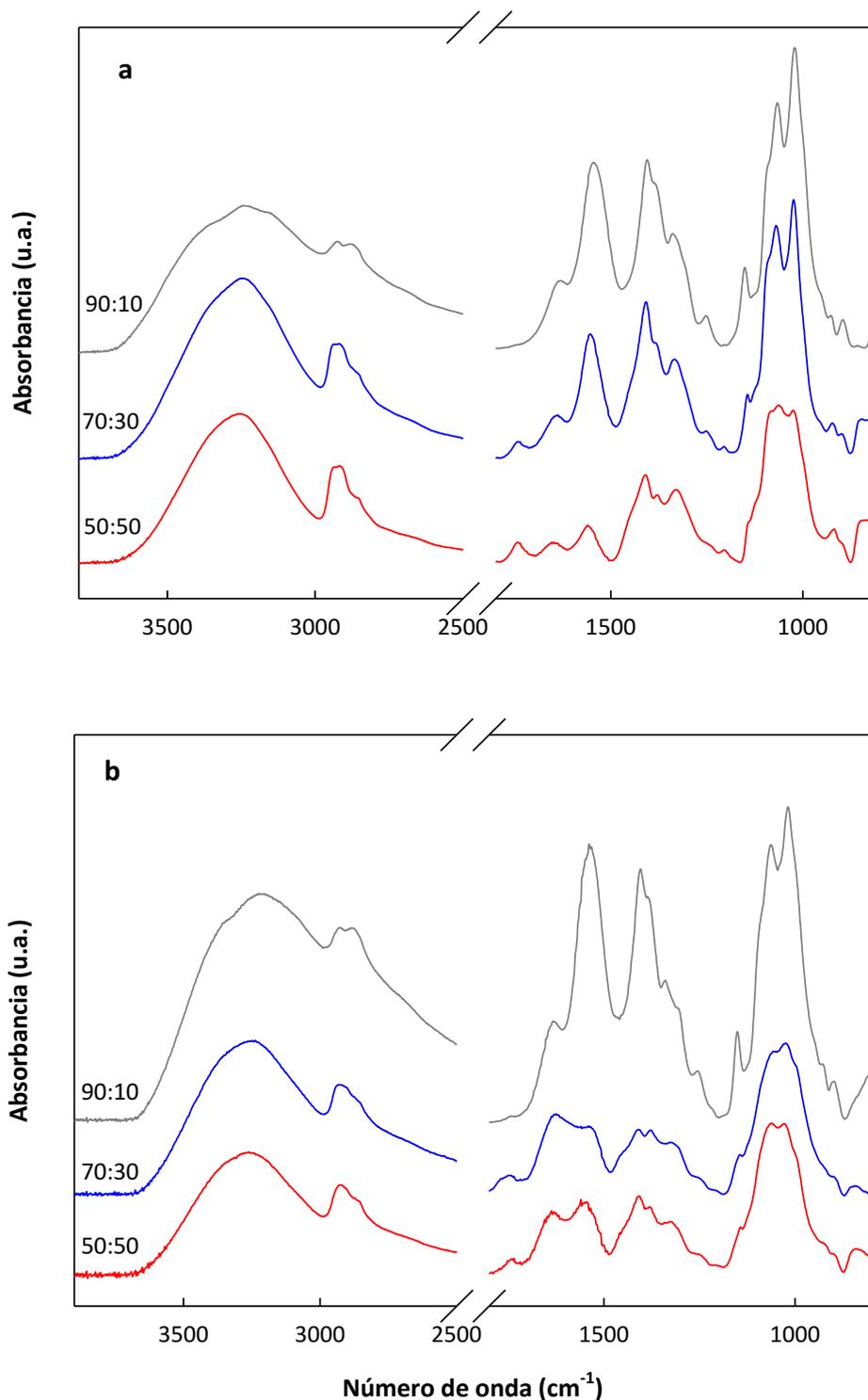


Figura 4.12. Espectros ATR-FTIR de los nanocompuestos formulados con mezclas de suspensiones de quitosano cargados con nanopartículas (QNp) con PVA. Nanopartículas de Ag **(a)** y nanopartículas de Cu **(b)**. Los valores mostrados corresponden a las formulaciones QAg₁-PVA y QCu₁-PVA.

4.5 APLICACIÓN I

4.5.1 Análisis cualitativo *ex vivo* de la penetración de NpAg en piel

Con *tape stripping* (TS) se obtienen perfiles de *stratum corneum* (SC) humano y se pueden detectar diferentes componentes del tejido. El desarrollo de métodos menos o no invasivos deben ser más cómodo para el paciente pero bajo la condición de que sean confiables. Es una técnica especialmente adecuada ante la necesidad de tomar muestras de piel repetitivas antes y después de un tratamiento (Clausen y col., 2016). La introducción del método de cinta adhesiva produjo una expansión significativa en las herramientas experimentales en el tema de la investigación de la piel, tanto en las condiciones como las enfermedades. Sin embargo, el procedimiento básico de decapado con cinta se debería complementar con exámenes más amplios para confirmar los análisis.

Debido a la simplicidad del método TS y su posible combinación con otras técnicas más avanzadas, se puede utilizar en varios campos de biología epidérmica. Como principal ventaja del TS, la capacidad de estimar el estado general del *stratum corneum* y su re-análisis es posible después de la aplicación de los productos para el cuidado de la piel (Escobar-Chávez y col., 2008).

El ST también se puede utilizar antes de las mediciones directas *in vivo* de los componentes de la piel, lípidos y agua con la espectroscopia infrarroja de onda corta (SWIR) Raman (Ezerskaia y col., 2018), espectroscopía ATR-FTIR (Bommannan y col, 1990) o la microscopía confocal de reflectancia (RCM) (Peppelman y col., 2015). Por otro lado, el estado de la piel después de retirar la cinta adhesiva también puede utilizarse como modelo de la lesión en la investigación de cicatrización de heridas (el estudio de la cinética del crecimiento epidérmico) (Surber y col., 2001).

Las nanopartículas (NPs) como las nanopartículas magnéticas (MNPs), las cuentas magnéticas (MB) y los puntos cuánticos (QDs) han ganado mucho interés, especialmente en medicina. Esto se debe a sus propiedades únicas, por ejemplo, su afinidad significativa por las células cancerosas (Sobiepanek y Kobiela, 2019). Se han realizado algunas investigaciones para estudiar el perfil de penetración de las QDs a partir de una fórmula adecuada aplicada tópicamente. Debido a sus propiedades fluorescentes, la acumulación de QD podría detectarse en las muestras recogidas de corneocitos a través del método TS

en el microscopio confocal. Los resultados muestran que la concentración de QD disminuyó progresivamente con la profundidad investigada (15 muestras de cinta). Así, los QDs fueron capaces de penetrar a través del SC, pero no a la epidermis viva como se reveló a través de la biopsia de punzón y la energía dispersa espectros de rayos X (EDX) para determinar la composición elemental de las partículas que se supone que son QD (Jeong y col., 2010).

4.5.2 Objetivos

- Determinar si las nanopartículas de plata incorporadas en la película nanocompuesta son capaces de migrar hacia la piel después de un contacto íntimo entre QAg-PVA y el sustrato
- Evaluar cualitativamente el perfil de NpAg a medida que las capas de piel extraídas por *tape stripping* se ubican más profundamente en el *stratum corneum*

4.5.3 Materiales y métodos

El material a base de quitosano y PVA con nanopartículas de plata, 5QAg₂-5PVA, fue aplicado como un apósito sobre la piel del antebrazo parte interior durante 5 h. Luego se retiró el apósito y el mismo lugar se procedió al proceso de *tape stripping*, consistente en remover capas del estrato córneo con cinta adhesiva. Esta cinta adhesiva se montó sobre la cinta de carbono sobre un taco metálico y se procedió a su metalizado para realizar la observación por SEM (Figura 4.13). El ensayo se realizó por duplicado.

Una capa de piel removida por medio de la cinta adhesiva en una región adyacente a la del apósito se tomó como control. Asimismo se observó por microscopía SEM el apósito 5QAg₂-5PVA después de permanecer en contacto con la piel durante 5 h.

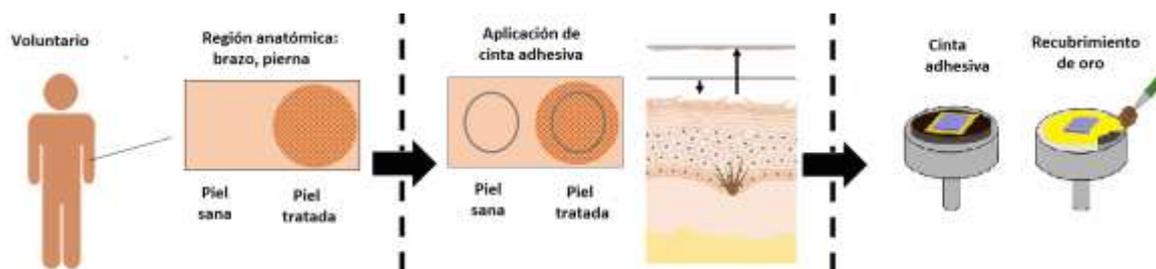


Figura 4.13. Procedimiento *ex vivo* para la obtención de la muestra de piel mediante *tape stripping*. Adaptado de Rodríguez y col. (2018) y Sobiepanek y Kobiela, (2019).

4.5.4 Resultados

La vía de penetración folicular ha sido reportada como una ruta ideal para que las Np penetren a través de la piel, ya que los poros foliculares actúan como un excelente lugar de almacenamiento y ofrecen la ruta más corta para entrar en los niveles de piel viables. Estas Np depositados no se pueden eliminar por descamación natural, contacto textil o lavado corporal; sin embargo, algunas Np se pueden eliminar por crecimiento del cabello o producción de sebo. Estudios anteriores demostraron que las Nps metálicos (7-20nm) y los Nps de poliestireno (20-200nm) pueden penetrar la piel a través de la vía folicular. Honeywell-Nguyen y Bouwstra (2005) demostraron la permeabilidad a partículas elásticas (100-150nm) y no elásticas a través de la vía folicular en capas epidérmicas y SC, respectivamente.

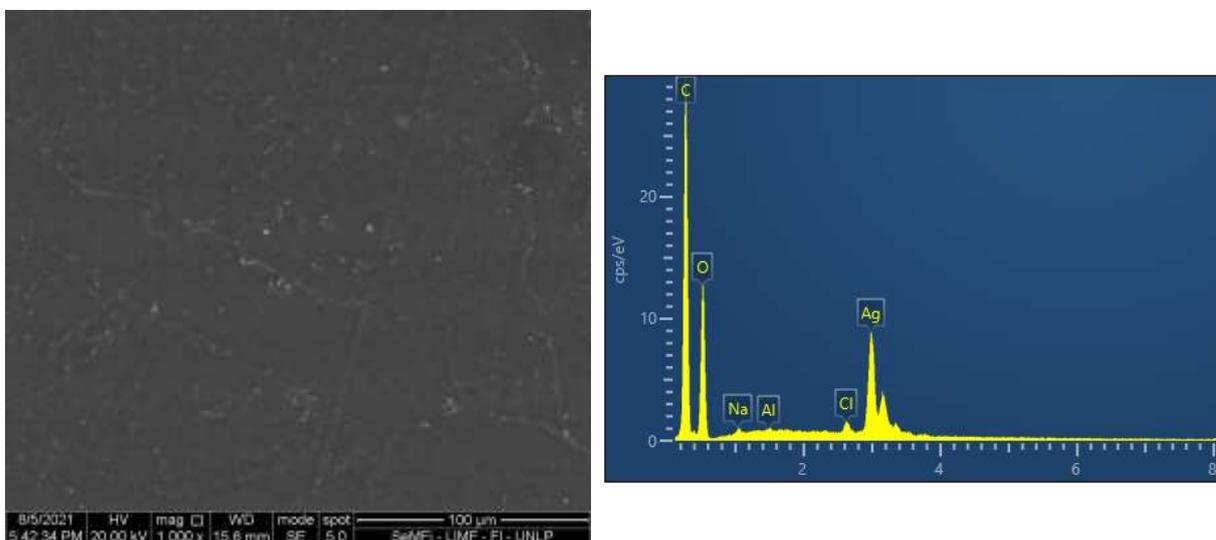
En la Figura 4.14 se muestra la micrografía de la película nanocompuesta 5QAg₂-5PVA usada como apósito después de 5 h de contacto con la piel del antebrazo. El análisis cualitativo por medio de EDS dio cuenta de la presencia de Np Ag con la señal ubicada a 2.5 keV.

La Figura 4.15 exhibe la micrografía de la cinta adhesiva control tomada de la zona del antebrazo adyacente a la ubicación del apósito. Como es lógico, en la micrografía obtenida por EDS y en la Tabla no se observa la presencia de plata.

Las micrografías (Figuras 4.16, 4.17 y 4.18 y las Tablas de composición de las cintas adhesivas correspondientes a la 1, 2 y 3° capa de piel del stratum corneum mostraron cantidades decrecientes de Ag a medida que aumentó la profundidad de la capa analizada. La difusión de las nanopartículas de Ag se produjo desde el apósito hacia la piel después de

5 h de contacto pero parecería poco probable que se detectaran en la capa 20 que es la cantidad de capas correspondiente al espesor del SC. Esto debería confirmarse por medio de otros estudios como microscopía confocal o ATR-FTIR.

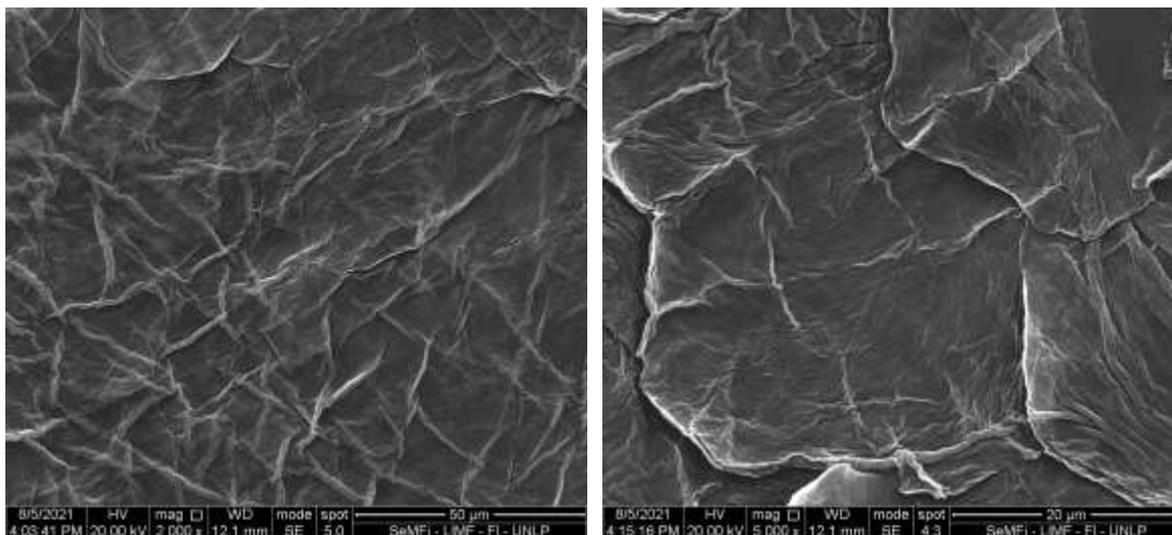
Nanocompuesto QAg₂-PVA en contacto con piel



Espectro			
Elemento	Tipo de Línea	Peso %	Atómico %
C	K series	44.83	58.24
O	K series	40.24	39.24
Ag	L series	14.06	2.03
Al	K series	0.13	0.07
Na	K series	0.38	0.25
Cl	K series	0.36	0.16
Total		100.00	100.00

Figura 4.14. Micrografía de la película conteniendo NpAg después de 5 h de contacto con la piel. La escala se muestra en la micrografía. Análisis elemental de la superficie por EDS.

Capa de piel control



Espectro

Elemento	Tipo de línea	Peso %	Atómico %
C	K series	64.93	83.67
Au	M series	19.02	1.49
Cu	K series	0.66	0.16
S	K series	0.45	0.22
O	K series	14.94	14.45
N	K series	0.00	0.00
Total		100.00	100.00

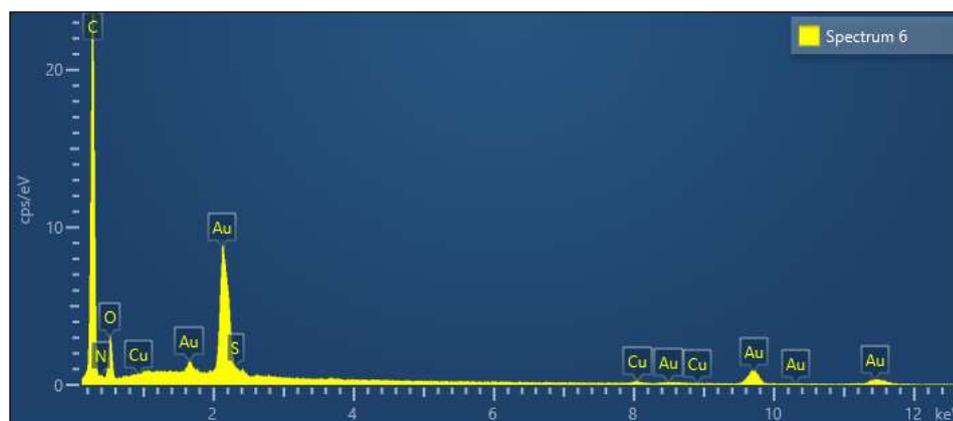
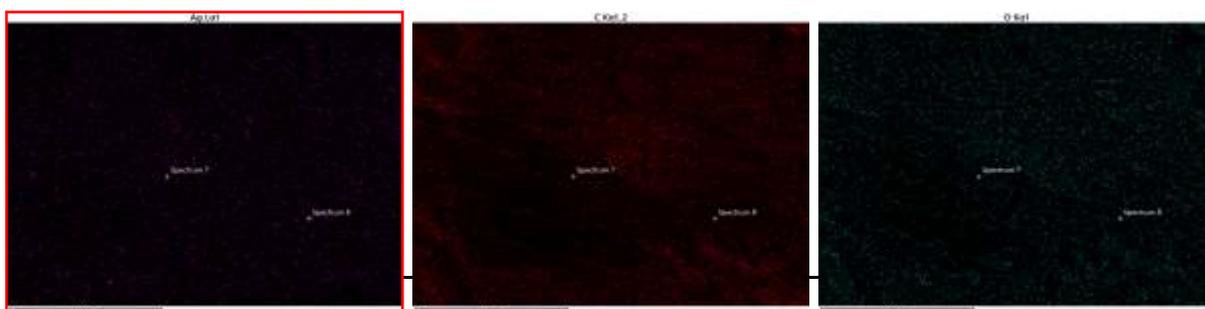
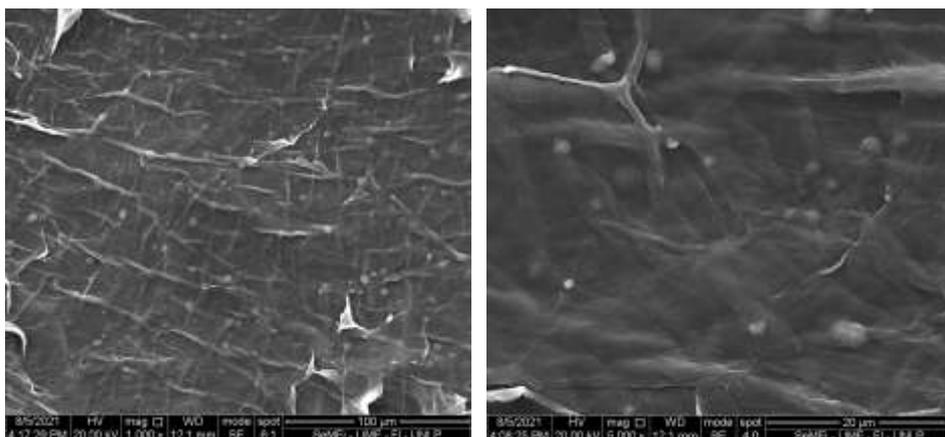


Figura 4.15. Micrografías obtenidas por SEM de piel control sin contacto con el nanocompuesto 5QAg₂-5PVA. La escala se muestra en cada micrografía. El espectro EDS y la Tabla correspondiente demuestran la ausencia de Ag.

1° capa de piel en contacto con QAg₂-PVA



Elemento	Tipo de línea	Peso %	Atómico %
C	K series	31.04	72.41
Ag	L series	20.99	5.45
Cl	K series	5.69	4.50
Au	M series	33.28	4.73
O	K series	6.56	11.49
Cu	K series	0.91	0.40
Zn	K series	0.74	0.32
S	K series	0.79	0.69

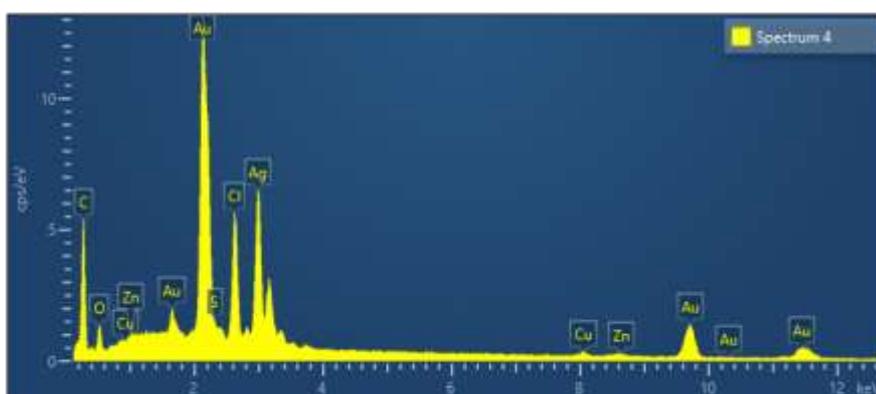
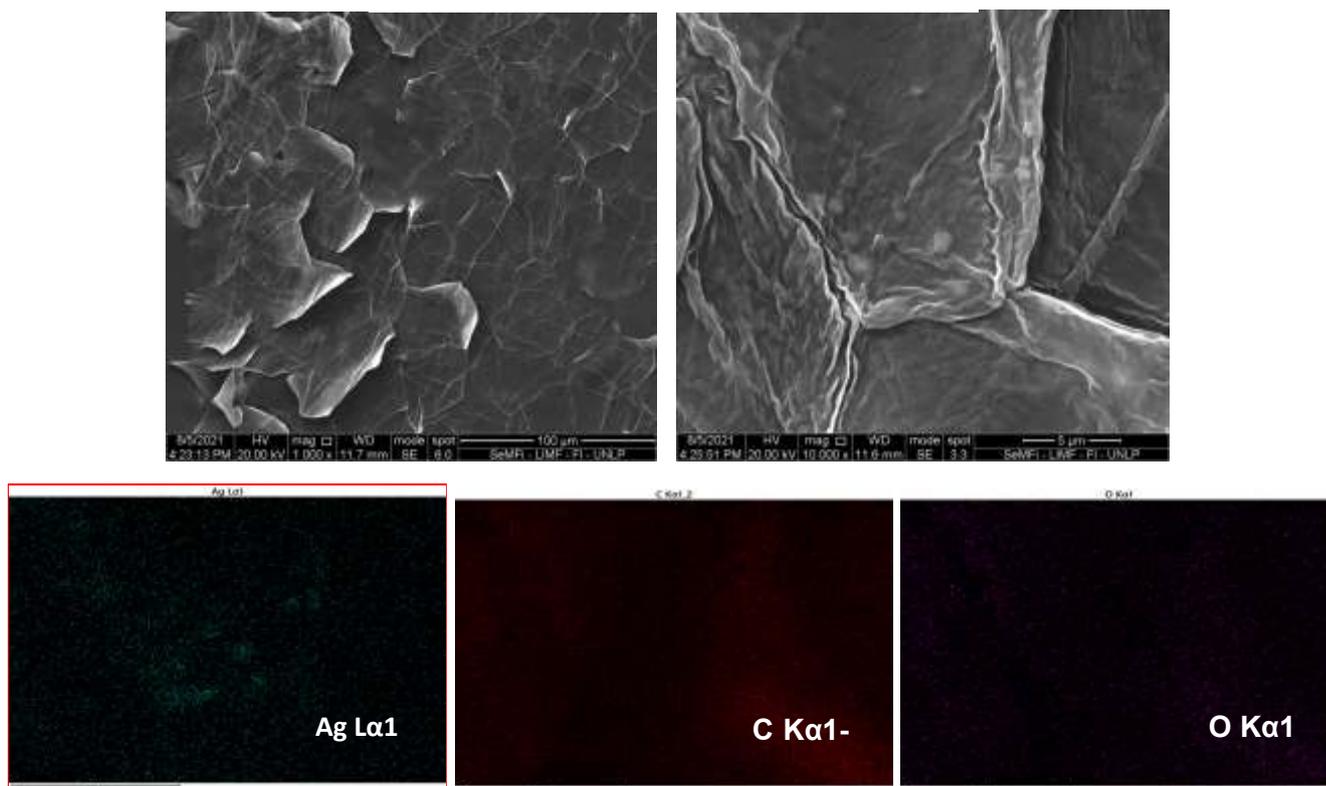


Figura 4.16. Micrografías de la 1° capa de piel después de 5 h de contacto con el apósito 5QAg₂-5PVA. El aumento se muestra en cada micrografía. Análisis elemental de la superficie por EDS.

2° capa de piel en contacto con QAg₂-PVA



Espectro

Elemento	Tipo de línea	Pesot %	Atómico %
C	K series	43.83	65.33
Ag	L series	9.55	1.58
Au	M series	18.52	1.68
O	K series	8.61	9.63
Cu	K series	0.57	0.16
Cl	K series	2.70	1.36
Na	K series	0.34	0.27
S	K series	0.62	0.35

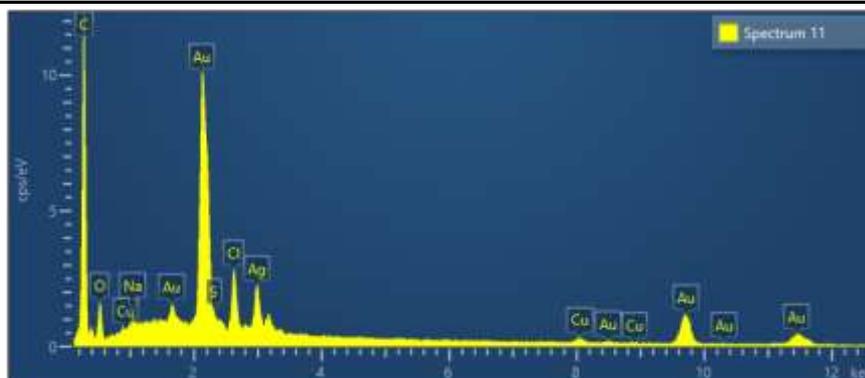
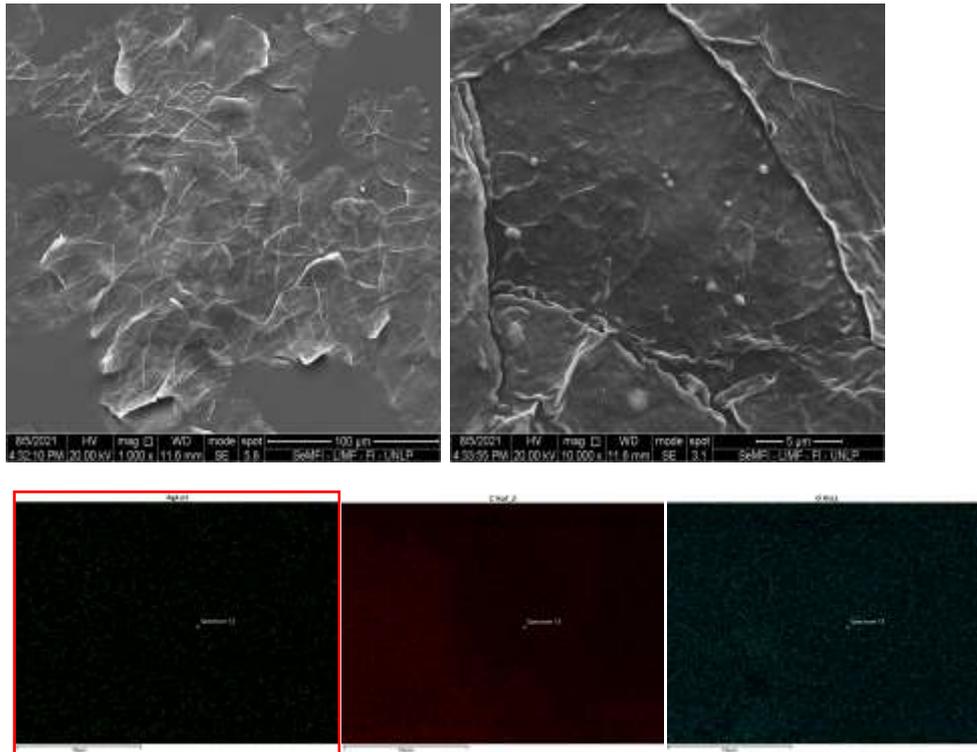


Figura 4.17. Micrografías de la 2° capa de piel después de 5 h de contacto con el apósito 5QAg₂-5PVA. El aumento se muestra en cada micrografía. Análisis elemental de la superficie por EDS.

3° capa de piel en contacto con QAg₂-PVA



Espectro

Elemento	Tipo de línea	Peso %	Atómico %
C	K series	55.03	83.33
Ag	L series	6.38	1.08
Cl	K series	0.75	0.39
Au	M series	25.88	2.39
O	K series	11.04	1.56
Cu	K series	0.92	0.26

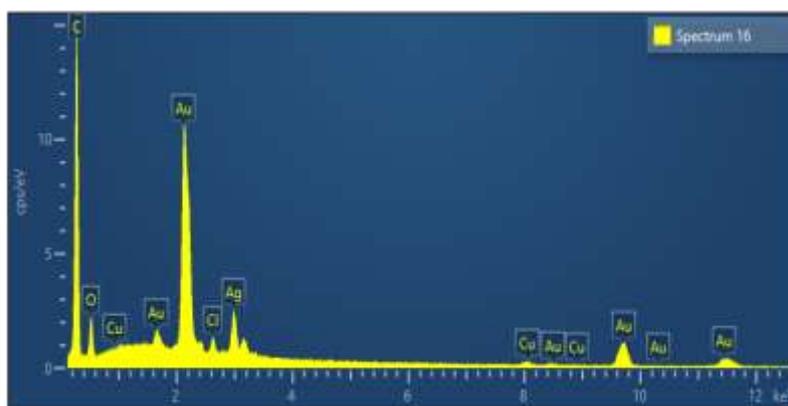


Figura 4.18. Micrografías de la 3° capa de piel después de 5 h de contacto con el apósito 5QAg₂-5PVA. El aumento se muestra en cada micrografía. Análisis elemental de la superficie por EDS.

Graficando cualitativamente la concentración porcentual de NpAg determinada por EDS en función del número de capas de piel adheridas a la cinta y removidas por la técnica de *tape stripping* se observó una disminución significativa de NpAg con la profundidad medida desde la superficie hacia el interior del *stratum corneum* (Figura 4.19). Dado que el espesor del SC correspondería a más de 20 capas, es poco probable que las NpAg llegaran a esa profundidad. Sin embargo, estudios complementarios se necesitan para determinar cuantitativamente la profundidad de la migración de las NpAg así como la concentración de las mismas.

Wu y col. (2009) informaron que después de la exposición de piel porcina a NpTiO₂ durante 24 h, los pigmentos de tamaño nanométrico de Ti solo pudieron detectarse en las cinco primeras cintas, pero no en los tejidos de la piel ni en los líquidos receptores a distintos tiempos de muestreo. Las nanopartículas de TiO₂ solo se depositaron en la superficie exterior del estrato córneo y no pudieron penetrar en las capas más profundas de la piel, epidermis o dermis. Estos resultados son consistentes con las evidencias publicadas por Gamer y col. (2006), Pflücker y col. (2001) Gärtner y col. (2002).

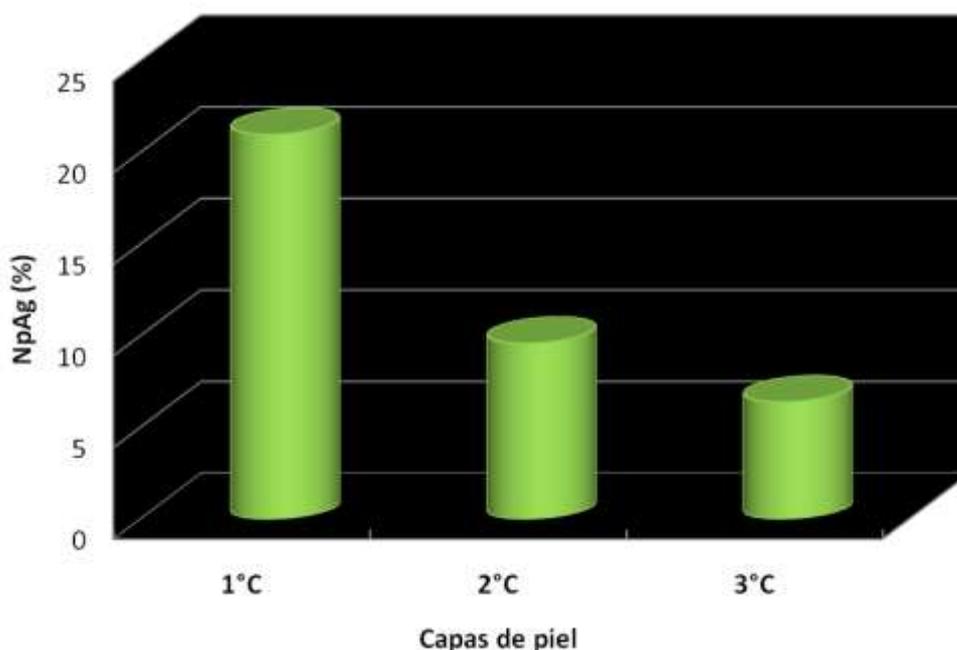


Figura 4.19. Concentración porcentual de NpAg en función de las capas de piel removidas de la zona del antebrazo por la técnica de *tape stripping*. La representación es solo cualitativa para visualizar la variación de concentración con la profundidad del SC medida desde la superficie.

4.5.5 Conclusiones

El método de extracción de cinta es una herramienta muy simple y mínimamente invasiva para obtener el máximo conocimiento sobre las propiedades del estrato córneo, así como para diagnosticar algunos trastornos de la piel. En combinación con otros métodos simples o más avanzados, puede ayudar tanto en la investigación básica como en la detallada. Se puede aplicar con un riesgo muy bajo de efectos secundarios durante una consulta médica estándar.

Sin embargo, se debe tener en cuenta que la selección de los parámetros cruciales del procedimiento de extracción de la cinta (tipo y tamaño de la cinta, fuerza y presión durante la extracción de la piel, así como la cantidad de células recolectadas) son factores importantes para obtener resultados confiables en cualquier método analítico que se utilice posteriormente. Por eso, se recomienda optimizar cada parámetro del proceso de recolección para uso propio. Las muestras recolectadas se pueden analizar directamente a través del microscopio o se pueden usar para el aislamiento y análisis de moléculas seleccionadas mediante espectrometría o cromatografía (Sobiepanek y Kobiela, 2019).

4.6 APLICACIÓN II

4.6.1 Hemocompatibilidad *in vitro*

La hemocompatibilidad es uno de los principales criterios que limitan la aplicabilidad clínica de los biomateriales con contacto sanguíneo. Estos materiales entran en estrecho contacto con la sangre, que es un complejo órgano, compuesto por 55% de plasma, 44% de eritrocitos y 1% de leucocitos y plaquetas (Figura 4.20). Por lo tanto, las interacciones adversas entre los materiales desarrollados y la sangre deben ser analizadas para prevenir la activación y destrucción de los componentes sanguíneos.

Los eritrocitos son las células sanguíneas más abundantes con 4-6 10^6 células/ μ l y son importantes para el transporte de oxígeno (O_2) desde el pulmón a todos los tejidos y células y de dióxido de carbono (CO_2) de los tejidos de nuevo al pulmón. Los eritrocitos son las células más rígidas de la sangre, son sensibles a la ruptura y la hemólisis debido al esfuerzo cortante y cambios en la presión osmótica. Las plaquetas sanguíneas son las más pequeñas (1-3 μ m) y el segundo tipo de células más abundantes en la sangre con 1.5-3.5 10^5 células/ μ l, que pueden rápidamente reconocer superficies extrañas e iniciar la

coagulación de la sangre. Además, la sangre humana contiene $4.3-10 \cdot 10^3$ leucocitos/ μl , como granulocitos, linfocitos, monocitos (Weber y col., 2018).

La ruptura de eritrocitos, llamada hemólisis, va acompañada de la liberación de hemoglobina en el plasma (Zare y col., 2019). Por lo tanto, un aumento de la concentración de hemoglobina libre en el plasma es un indicador directo de la destrucción de los eritrocitos. El daño de los eritrocitos puede conducir a la reducción del transporte de oxígeno a los tejidos y órganos in vivo y el aumento de los niveles de hemoglobina libre puede inducir toxicidad o alterar la función renal (Qian y col., 2010). Dependiendo de la hemólisis, los materiales se pueden clasificar en tres categorías diferentes: superior al 5 % de hemólisis se consideran hemolíticos, entre 5 y 2% como ligeramente hemolíticos, y por debajo del 2% como no hemolíticos (Totea y col., 2014).

El quitosano ha sido un material estudiado como agente hemostático, además de sus características como biocompatible y antibacteriano. Esta actividad hemostática del quitosano es importante para comprender el mecanismo de acción como coagulante y el desarrollo de vendas médicas que controlan el sangrado.

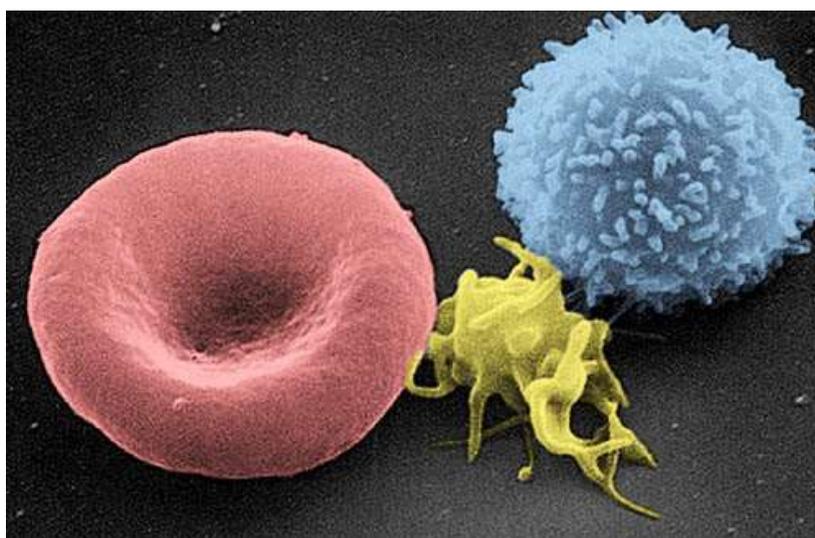


Figura 4.20. Imagen tomada con un microscopio electrónico de barrido en la que se observa, de izquierda a derecha: glóbulo rojo, plaqueta y glóbulo blanco.

4.6.2 Fases de cicatrización de heridas cutáneas

Una herida es cualquier tipo de lesión que ocurre en la piel debido a un corte o daños. La cicatrización de la herida es un proceso mediante el cual cualquier pérdida en la

integridad del tejido se repara mediante una serie de fases (Figura 4.21). Se pueden distinguir diferentes fases en la cicatrización de heridas cutáneas:

(A) Inmediatamente después de la lesión cutánea, los elementos sanguíneos y aminas se extravasan de los vasos sanguíneos localmente dañados dentro de la dermis. La permeabilidad vascular se incrementa temporalmente para permitir que los neutrófilos (neutrófilos polimorfonucleares [PMN]), plaquetas y proteínas plasmáticas se infiltren en la herida. Sigue la vasoconstricción, en respuesta a factores liberados por estas células. **(B)** La coagulación entonces ocurre como el agregado de plaquetas con fibrina, que se deposita en la herida después de la conversión del fibrinógeno. **(C)** Las plaquetas liberan varios factores, incluyendo PDGF y TGF- β , que atraen PMNs a la herida, señalando el comienzo de la inflamación. **(D)** Después de 48 h, los macrófagos reemplazan a los PMNs como las células inflamatorias principales. En conjunto, los PMNs y los macrófagos eliminan los desechos de la herida, liberan factores de crecimiento y comienzan a reorganizar la matriz extracelular. **(E)** La fase de proliferación comienza aproximadamente a las 72 h cuando se producen fibroblastos, reclutados a la herida por factores de crecimiento liberados por células inflamatorias, comienzan a sintetizar colágeno, y se produce angiogénesis y re-epiteliación. **(F)** La reticulación del colágeno y la reorganización se producen durante meses después de la lesión en la fase de remodelación de la reparación. Se ha reportado que el quitosano influye beneficiosamente en las etapas **(B-E)**.

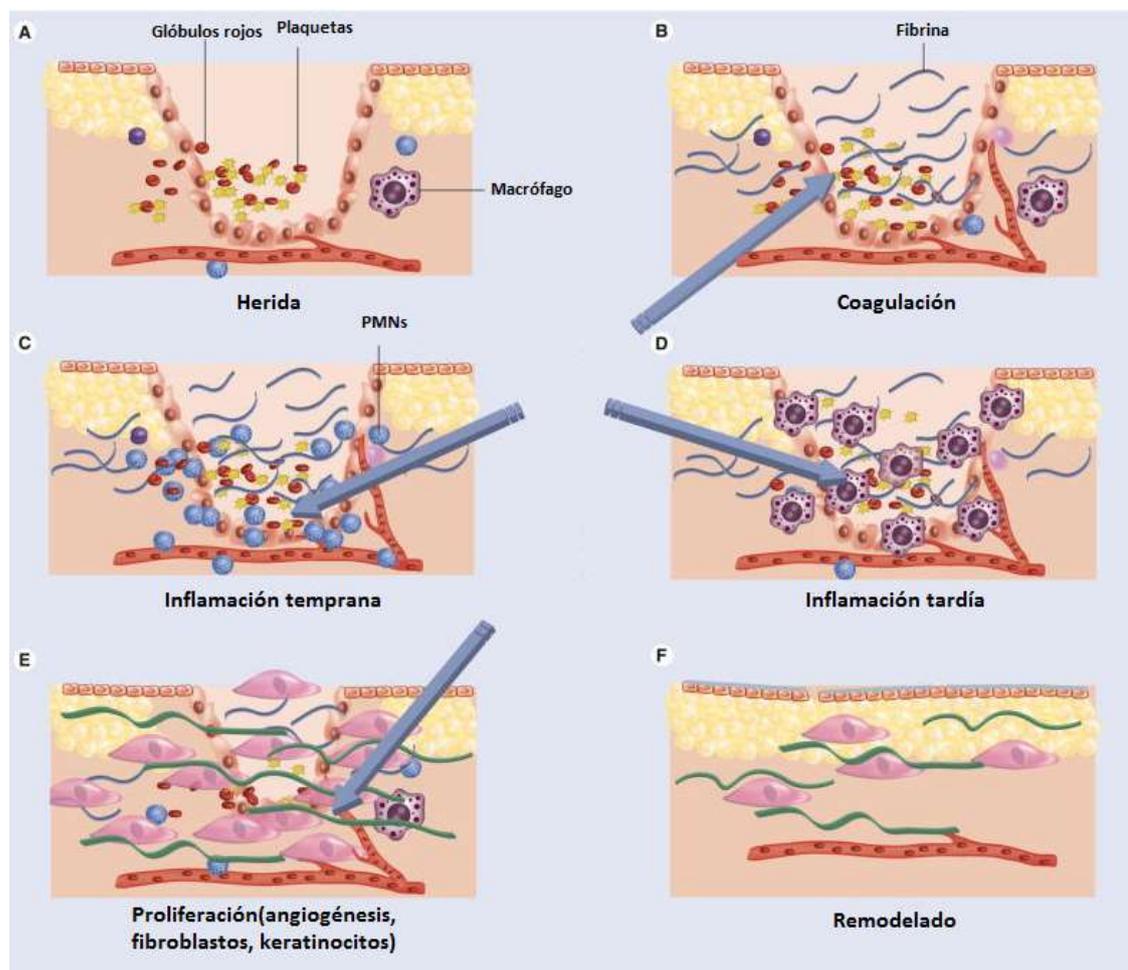


Figura 4.21. Fases de la cicatrización de heridas cutáneas. Adaptado de Dai y col. (2011).

Tradicionalmente, se utiliza gasa de algodón como apósitos que sirve sólo como un marco estructural para cubrir la herida llamados apósitos pasivos. Sin embargo, se ha incrementado el uso de apósitos interactivos o bioactivos que incluyen películas, esponjas, hidrogeles, etc., que proporcionan una eficacia antibacteriana, además del marco estructural. Los bioactivos juegan un papel más allá de los apósitos interactivos en el proceso de curación (Mohandas y col., 2018).

Actualmente, los apósitos se desarrollan utilizando diferentes tipos de polímeros cuyo origen es sintético o natural. Hay apósitos sintéticos de poli (metacrilatos), polivinilpirrolidina, etc. Los agentes activos basados en metales han recibido mucho interés en el escenario clínico. Se han realizado extensos estudios sobre NpAg, NpCu, NpTiO₂, NpAu incorporadas en una matriz de quitosano (Srivastava y col., 2011; Regiel-Futyra y col., 2015; Gopal y col., 2014).

4.6.3 Objetivos

- Evaluar la posibilidad de la aplicación de las películas nanocompuestas como apósitos para uso tópico
- Estudiar la biocompatibilidad de los apósitos nanocompuestos a través de ensayos relacionados con la capacidad hemostática: tiempo de coagulación, adhesión de plaquetas y porcentaje de hemólisis

4.6.4 Materiales y métodos

Materiales

La sangre fue colectada de dos voluntarias según los protocolos establecidos. Se usaron citrato de sodio marca Cicarelli, cloruro de calcio y cloruro de sodio de Anedra.

Tiempo de coagulación

Se colocaron películas de quitosano, 5QAg₂-5PVA y 5QCu₂-5PVA de 10 mg, en tubos de vidrio y se precalentaron a 37°C durante 10 min. Se mezclaron 9 partes de sangre con 1 parte de citrato de sodio 3.8% y se agregaron 340 µl a cada uno de los tubos con películas. Se calentaron a 37°C y se agregaron 20 µl de CaCl₂ 0.2 M para inactivar el anticoagulante e iniciar la formación de coágulos. Las muestras fueron examinadas invirtiendo los tubos hasta que el flujo sanguíneo se detuvo por completo registrándose el tiempo desde la adición del CaCl₂. Asimismo se tomó como control un tubo sin película.

Un acortado tiempo de coagulación indica una activación del proceso de coagulación por el material de ensayo.

Ensayo de hemólisis

Se prepararon citrato de sodio 3.8% como anticoagulante y solución salina al 0.9% p/v. Se mezcló la sangre con el citrato en relación 9:1. A continuación 5 ml de la sangre citratada se mezcló con 4 ml de la solución salina. Se colocaron 1 cm² (aprox. 10 mg) de las muestras de películas en 4 ml de solución salina y se calentaron a 37°C durante 30 min. Se agregaron 0.2 ml de la sangre citratada diluida a cada muestra de película y se calentaron a 37°C durante 60 min. Después de la incubación, las muestras se centrifugaron y se analizó el sobrenadante a 545 nm con un espectrofotómetro. Como control positivo (+) y negativo

Capítulo 4: Matrices de quitosano-poli(vinil alcohol) funcionalizadas con nanopartículas

(-) se usaron 4 ml agua ultrapura y 4 ml solución salina con 0.2 ml de sangre, respectivamente. El porcentaje de hemólisis se calculó con la fórmula:

$$\text{Hemólisis (\%)} = \frac{A_{\text{muestra}} - A_{(-)}}{A_{(+)} - A_{(-)}} \times 100$$

donde,

A_{muestra} es la absorbancia del sobrenadante que estuvo en contacto con la película, $A_{(+)}$ es la absorbancia del control positivo y $A_{(-)}$ es la absorbancia del control negativo.

Adhesión de plaquetas

La sangre entera se centrifugó con 3.8% de citrato de sodio a 4°C a 1000 rpm durante 10 min (PRP) con una relación 9:1.

Las muestras de películas se enjuagaron con agua bidestilada y con PBS 0.1M. Luego, se colocaron en tubos *Eppendorf*, se agregaron 650 μl de PRP y se incubaron a 37°C durante 1h.

Las muestras se enjuagaron para remover el plasma y las plaquetas no adheridas con PBS 0.1M. Se agregó glutaraldehído al 2% por 1 h para fijar las plaquetas adheridas y se deshidrataron con un tren de alcoholes 30, 50, 70 y 100%

Luego se secaron a temperatura ambiente y se observaron por SEM

4.6.5 Resultados

En la [Tabla 4.8](#) se muestran los valores de tiempo de coagulación obtenidos para las películas ensayadas. Asimismo, se pueden observar el tiempo de coagulación obtenido sin presencia de película que resultó un 60% mayor

En las fotografías de los ensayos se exponen los tubos con muestras y los controles antes ([Figura 4.22a](#)) y después del proceso de centrifugación ([Figura 4.22b](#)).

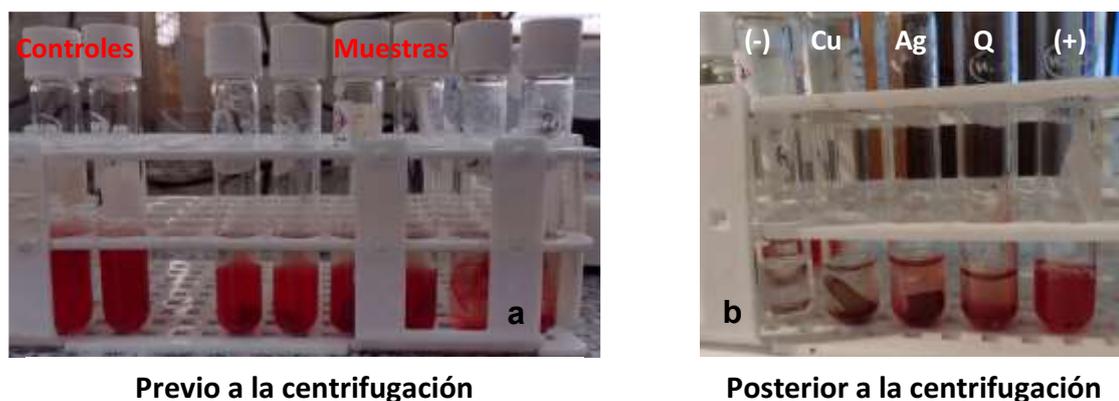


Figura 4.22. Tubos con las muestras (Q, QCu-PVA y QAg-PVA) y los controles (-) y (+) antes y después del proceso de centrifugación.

Tabla 4.8. Valores de hemólisis % y tiempo de coagulación obtenidos para las películas ensayadas

Película	Tiempo de coagulación (seg)	Hemólisis %	Fotografía de la hemólisis
5QCu ₂ -5PVA	192 (9) ^a	0.035 (0.004) ^a	
Q	186 (10) ^a	1.47 (0.19) ^b	
5QAg ₂ -5PVA	177 (11) ^a	4.06 (0.24) ^c	
Control (-)	-	0	
Control (+)	-	100	
Control sin película	298 (13) ^b	-	

^{a,b} Diferentes letras dentro de la columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Las películas ensayadas tuvieron fuerte capacidad para coagular los glóbulos rojos con poca hemoglobina en el eluido (Figura 4.22). Después de realizar los experimentos *in vitro* el orden de las películas para promover la coagulación fue: QCu-PVA > Q > QAg-PVA (Figura 4.22). El quitosano tiene carga positiva y atrae a los glóbulos rojos y plaquetas con carga negativa, facilitando la adherencia plaquetaria y la trombosis como muestra la Figura 4.22 (Zhao y col., 2019). El mecanismo hemostático de los materiales a base de quitosano sugiere que la sorción plasmática primaria conduce a la concentración de células sanguíneas en el lugar lesionado. Al mismo tiempo, la coagulación de adherencia y agregación de eritrocitos y plaquetas causa una rápida formación del coágulo.

Capítulo 4: Matrices de quitosano-poli(vinil alcohol) funcionalizadas con nanopartículas

La coagulación de eritrocitos está directamente asociada con las propiedades hemostáticas. La aglutinación de eritrocitos se elevó en presencia de quitosano debido a la reticulación de los mismos por la cadena del polímero formando una red que capturó células para crear un coágulo artificial (Maksym y Sikora, 2015). Asimismo, de acuerdo a Wang y col. (2003) las películas de quitosano pueden inducir adhesión plaquetaria, agregación y activación de la coagulación sanguínea intrínseca.

Se encontró que la solución de quitosano en ácido acético acuoso al 2% causó hemaglutinación incluso en baja concentración y el tiempo de coagulación de la sangre se redujo en un 40% del tiempo de coagulación normal (Yamazaki y Hudson, 2012). Además, el quitosano no indujo la lisis de los glóbulos rojos (Figura 4.23).

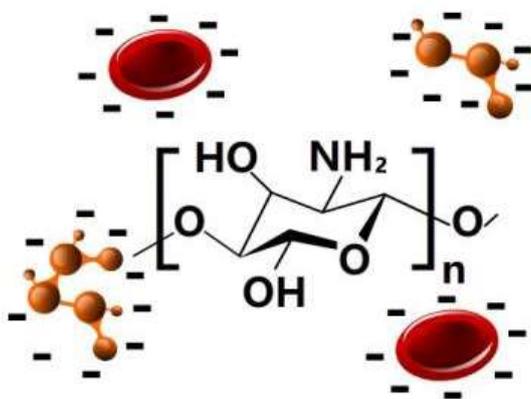


Figura 4.23. Esquema del mecanismo hemostático.

Por otra parte, el alcohol polivinílico (PVA), un material hidrofílico que contiene una gran cantidad de grupos -OH, ha atraído mucha atención en aplicaciones biomédicas, especialmente en la curación de heridas y en ingeniería de tejidos (Hu y col., 2018). Chen y col. (2017) incorporaron el componente PVA a una matriz de Q y fabricaron esferas monodispersas de Q-PVA mediante técnicas de electropulverización y gelación ionotrópica que redujeron el tiempo de coagulación y la pérdida de sangre.

Asimismo, se encontró histológicamente que NpCu podría estimular la proliferación y migración de fibroblastos. Algunas enzimas dependientes del cobre ayudan en la síntesis de colágeno para facilitar la curación de heridas. Se sabe que el quitosano es policatiónico en medios ácidos, por lo que quela iones metálicos como Fe, Cu o Mg.

Capítulo 4: Matrices de quitosano-poli(vinil alcohol) funcionalizadas con nanopartículas

Esto demuestra que las nanopartículas de quitosano queladas por iones cúpricos suprimen los sitios de interacción con los glóbulos rojos y las plaquetas. Esto podría explicar el aumento del recuento de glóbulos rojos y plaquetas (Ahmed y col., 2021).

El análisis de hemólisis es una medida para evaluar la biocompatibilidad. La prueba de hemólisis determina la solubilidad de las células sanguíneas en contacto con materiales extraños y ha sido muy potente para evaluar la propiedad de la hemólisis de apósitos para heridas (Huo y col., 2018). Los valores de hemólisis % calculados para las películas ensayadas se muestran en la Tabla 4.10. Asimismo, se pueden observar los valores de hemólisis de los controles (-) y (+) que se corresponden con 0 y 100%, respectivamente.

Después de la centrifugación de las muestras a 1000 rpm durante 10 min, el sobrenadante del control (-) se observó completamente clarificado y el control (+) totalmente coloreado con un valor de absorbancia de 2.85 a 545 nm. El sobrenadante de la muestra QCu-PVA fue muy semejante al control (-) y arrojó una tasa de hemólisis del 0.035, valor muy por debajo del límite admisible.

Según Wang y col. (2019), para materiales que tienen aplicaciones potenciales como dispositivos implantados o drogas, se requiere una tasa de hemólisis inferior al 5 %. Sin embargo, de acuerdo con estudios *in vitro* la hemólisis se clasifica como no preocupante cuando varía de 5 a 25% (Dobrovolskaia y col., 2008).

Tong y col. (2019) estudiaron la capacidad hemolítica de un nanocompuesto de óxido de grafeno reducido combinado con nanopartículas de plata. Los autores informaron que el nanocompuesto no causó hemólisis presentando un valor inferior al 2%.

Adhesión de plaquetas sobre la superficie de los biomateriales

La adsorción de proteínas sobre la superficie de biomateriales es el paso inicial después del contacto con la sangre. Posteriormente, las proteínas inician la adhesión y activación de plaquetas en la superficie (Weber y col., 2018). Estas plaquetas pueden activar más plaquetas vecinas y en el último paso los trombos se estabilizan mediante la generación de una red de fibrina. La activación de las plaquetas es un proceso muy rápido de 180 ms (van Oeveren, 2012) y se puede detectar diferencias en la apariencia morfológica de las plaquetas en la superficie del material dependiendo de los diferentes estados de activación: (1) plaquetas no activadas: redondas, discoide en forma sin pseudopodia, (2)

plaquetas parcialmente activadas: dendríticas con pseudopodia temprana, (3) plaquetas moderadamente activadas: dendríticas de propagación con extensiones irreversibles, (4) plaquetas totalmente activadas: completamente extendidas (Park y col., 1990). La adhesión y la activación de las plaquetas conducen a un reordenamiento del citoesqueleto y por lo tanto a un cambio morfológico de plaquetas en la superficie del biomaterial con amplia formación de pseudopodia. Finalmente, la agregación de plaquetas y la generación de una red de fibrina puede ser analizada usando SEM (Zhang y col., 2017).

Como se puede observar en la Figura 4.24 la incubación con el nanocompuesto 5QCu₂-5PVA (b) y con la película Q (c) condujo a la adhesión de plaquetas. Se observó una diferencia significativa en la morfología de las plaquetas adheridas sobre el nanocompuesto 5QAg₂-5PVA en comparación con las otras muestras. En estas superficies aparecieron plaquetas con pseudopodios interconectados. Por el contrario, en las plaquetas de las películas nanocompuestas 5QAg₂-5PVA no se observó formación de pseudopodios. De hecho, es bien sabido que la topografía de la superficie puede inducir una reorganización espacial de las proteínas adsorbidas, así como la forma en que se produce este fenómeno (Curtis y Wilkinson, 1999). Por el contrario, cuando las proteínas adsorbidas mantienen su estado nativo, no causan adhesión plaquetaria y agregación (Tanaka y col., 2000).

La interacción de los biomateriales con la sangre conduce a reacciones humorales y celulares, que pueden resultar en inflamación y activación no deseadas de la coagulación y/ofibrinólisis. Así, el desarrollo de biomateriales con mejor hemocompatibilidad aumenta la tolerancia y minimiza los efectos secundarios no deseados, como la formación de trombos. Por lo tanto, durante el desarrollo de nuevos dispositivos médicos en contacto con la sangre, no sólo las características mecánicas y químicas deben desempeñar un papel importante, sino también la hemocompatibilidad.

Así, en varios estudios, la trombogenicidad superficial de los biomateriales fue estudiada por caracterización de la morfología celular y la propagación utilizando SEM (Balasubramanian y Slack, 2001; Aguilar y col., 2002). Además, las células adheridas y la densidad celular pueden ser detectadas usando fluorescencia y microscopía confocal (Nguyen y col., 2016).

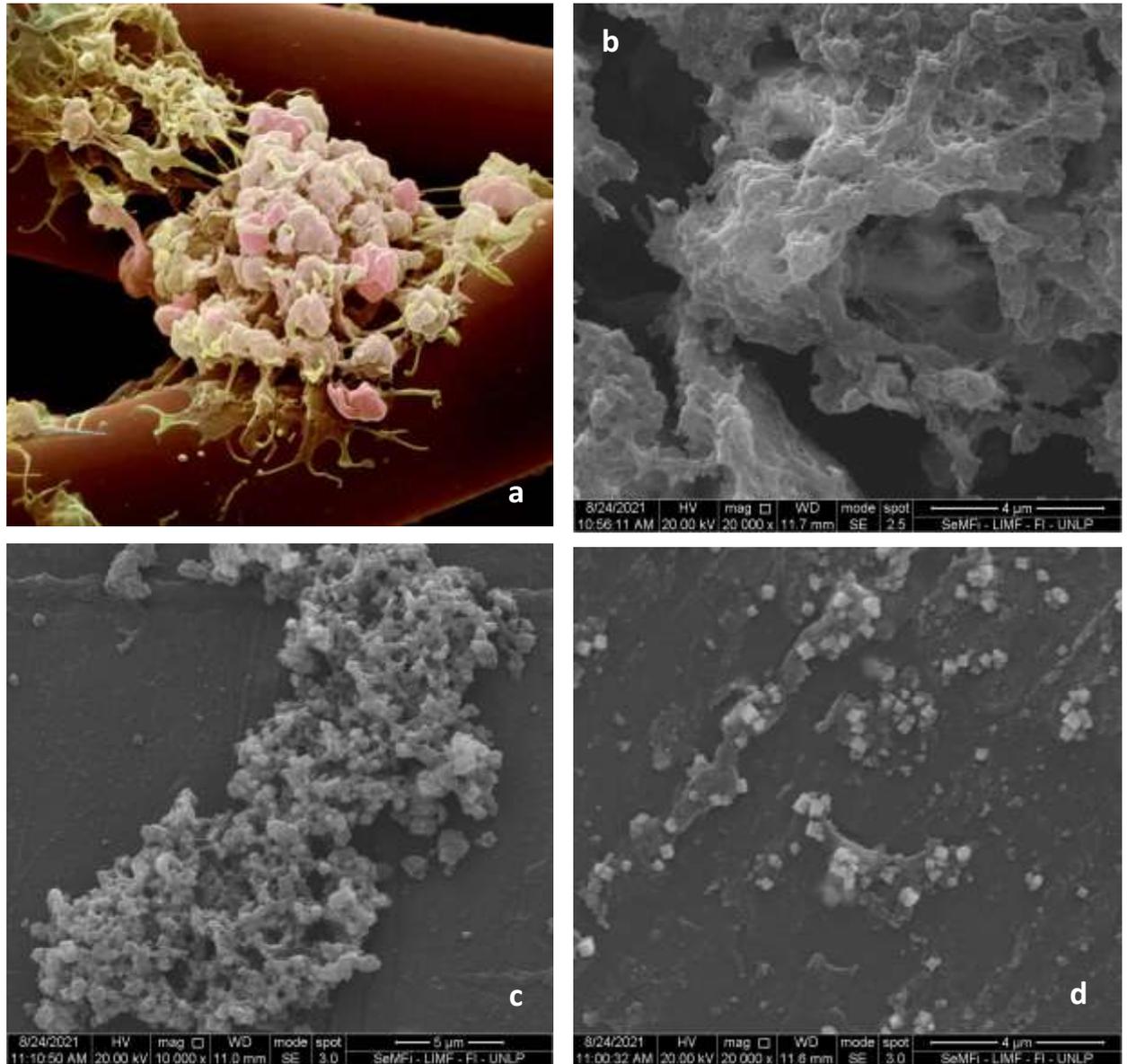


Figura 4.24. (a) Plaquetas actuando en el proceso de coagulación <https://respuestas.tips/cual-es-el-numero-normal-de-plaquetas>. Adhesión de plaquetas sobre (b) película nanocompuesta 5QCu₂-5PVA, (c) película Q y (d) película nanocompuesta 5QAg₂-5PVA.

4.6.6 Conclusiones

El quitosano combinado con PVA ofreció abundancia de carga positiva de los grupos amino para facilitar la coagulación. Asimismo, proporcionó propiedades físicoquímica más homogéneas y estables. Los nanocompuestos de Cu demostraron capacidad hemostática; pueden actuar como agentes protrombina o procoagulante usados para acelerar el proceso de coagulación de sangre.

Capítulo 4: Matrices de quitosano-poli(vinil alcohol) funcionalizadas con nanopartículas

QCu-PVA intervino en la regulación de múltiples eventos que son fundamentales para el proceso de curación. La incorporación de nanocobre en el quitosano formó una combinación adecuada, que promovió eficientemente diferentes fases de cicatrización por la modulación sistemática de citoquinas y factores de crecimiento.

Durante la aplicación de nanocompuestos como apósito o envase, el quitosano al estar combinado con nanopartículas de Cu o Ag, moduló la liberación controlada de iones metálicos, mejoró la actividad antimicrobiana y modificó la citotoxicidad.

También la eficiencia de la carga y la liberación de iones metálicos desde los nanocompuestos se pueden modificar sobre la base de diferentes técnicas de fabricación. Las posibles razones para el incremento del efecto debido a la adición de nanopartículas metálicas como plata, zinc, cobre, oro, titanio, etc., es un área inexplorada. La naturaleza antimicrobiana se conserva, a pesar de la ausencia de grupos amino libres o protonación en las matrices de quitosano (Mohandas y col., 2018). La liberación de nanopartículas metálicas de la matriz depende de las propiedades del material.

4.7 APLICACIÓN III

4.7.1 Migración/liberación de NpCu presente en matrices nanocompuestas

Las matrices nanocompuestas no se diseñaron con el propósito de aplicarlas en el envasado de alimentos donde habría un contacto estrecho entre la película y el sustrato. Sin embargo, se decidió estudiar la forma bajo la cual se producía la liberación de las NpCu, la concentración máxima capaz de difundir y el mecanismo de migración en una matriz alimenticia usada como modelo en el entendimiento de que estos resultados pueden ser empleados para guiar estrategias futuras para mejorar el diseño de los materiales nanoestructurados.

4.7.2 Objetivos

- Verificar el proceso de migración por contacto entre la película funcionalizada con nanopartículas de cobre y un sustrato modelo
- Modelar el potencial proceso de liberación del cobre e interpretar los parámetros para establecer el mecanismo de migración

4.7.3 Materiales y métodos

Migración en sistema modelo alimenticio

Se estudió la migración del cobre presente en las matrices nanocompuestas de quitosano-PVA en contacto directo con un producto alimenticio a efectos de evaluar la cantidad máxima de cobre capaz de migrar (Figura 4.25). La formulación para este ensayo fue 5QCu₃-5PVA. Como sustrato del sistema modelo se usaron muestras de papa cortadas uniformemente. El peso en base seca de las muestras de papa fue 0.5210 g (DE=0.06). Cada uno de las muestras se colocó en contacto con una película de 5QCu₃:5PVA. El peso en base seca de la película fue 0.0555 g (DE=0.008) y la temperatura de ensayo 4°C. Se ensayaron distintos tiempos de migración: 11, 22, 33, 44 y 55 horas



Figura 4.25. Montaje del ensayo de migración de cobre desde una matriz nanocompuesta en contacto directo con rodajas de papa.

Cuantificación del cobre mediante espectrofotometría de absorción atómica

La determinación de Cu se realizó usando espectrofotometría de absorción atómica (AA). La extracción del metal en las muestras se llevó a cabo en base a la norma EPA SW 846 método 3050 con ligeras modificaciones.

La muestra seca se pesó en un vaso de precipitado de 250 ml. Posteriormente se adicionaron 10 ml de una solución 1:1 (v/v) de HNO₃:H₂O; se digirió la muestra durante 30 minutos a 95°C. La muestra resultante se dejó enfriar y se le agregó 5 ml de HNO₃ concentrado. A la mezcla resultante se le digirió a reflujo durante 30 minutos repitiendo este paso cuantas veces fue necesario hasta que la muestra no cambió de aspecto (color, turbidez, liberación de vapores coloreados). La muestra se concentró hasta 5 ml y se la trató con 10 ml de solución concentrada de H₂O₂ (30 %). La mezcla resultante se dejó reposar hasta alcanzar temperatura ambiente.

Capítulo 4: Matrices de quitosano-poli(vinil alcohol) funcionalizadas con nanopartículas

Finalmente, se adicionaron 5ml de HCl concentrado y 10 ml de agua destilada. Esta mezcla se dejó en reflujo hasta alcanzar un volumen aproximado de 5 ml; posteriormente se llevó a volumen (25 ml) usando un matraz aforado completando con agua destilada. La solución se almacenó en recipiente plástico hasta su análisis.

Para la cuantificación del cobre se usó un espectrofotómetro de llama Varian AA240 usando como gases aire-acetileno (Figura 4.26).



Figura 4.26. Espectrofotómetro de llama Varian AA240

4.7.4 Resultados

Concentración de Cu en películas nanocompuestas de quitosano y PVA-

La Tabla 4.9 muestra la concentración de Cu determinada para la películas ensayadas expresada en mgCu/ g_{película seca} y en mgCu/ l_{solución filmogénica}.

Tabla 4.9. Concentración de cobre determinadas por AA en las películas nanocompuestas usadas en los ensayos de migración

Muestra	mg Cu / g película seca	mg Cu / l solución filmogénica
5QCu ₃ -5PVA	53.4 (1.4)	564 (9.8)

Con respecto al resultado expresado en mg Cu/l_{solución filmogénica}, estequioméricamente según la síntesis de las NpCu, la concentración esperada era de 572 mg Cu/ l para 5QCu₃-5PVA, por lo cual el error experimental fue de 0.18 %.

Ensayos de migración

La concentración inicial (C_0) de cobre en las películas y la concentración a tiempo (C_t) después del ensayo de migración permitieron calcular la cantidad de Cu que había migrado ($C_{u_m}\%$) usando la Ec.4.1.

$$C_{u_m}\% = \frac{C_t}{C_0} \times 100 \quad \text{Ec 4.1}$$

Difusión en papa

Antes del ensayo de migración se determinó la concentración de Cu en la muestra de papa. El resultado cuantificado por AA fue de $9 \mu\text{g}/\text{g}_{\text{peso seco}}$. Para el caso de la película ensayada la concentración de Cu fue $2.96 \text{ mg Cu}/\text{g}_{\text{pelicula}}$

En la Figura 4.27 se muestran los resultados fotográficos de la apariencia de las películas (a) y las muestras del sustrato de papa (b) después de los distintos tiempos de contacto.

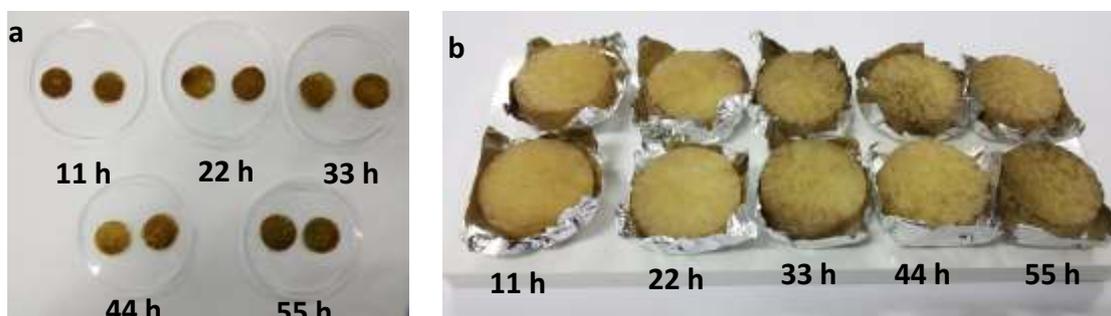


Figura 4.27. Apariencia resultante de la migración por contacto a diferentes tiempos experimentales: a) películas 5QCu₃-5PVA; b) sustrato utilizado: papa.

En los distintos tiempos de contacto de las matrices nanocompuestas con los sustratos de papa se evidenció el aumento de la concentración de Cu en el sustrato analizado según los resultados obtenidos por AA.

Con los resultados obtenidos de la cinética de migración, el comportamiento se analizó aplicando dos modelos matemáticos. Las ecuaciones no lineales corresponden a los modelos de cinética de pseudo primer orden (Ec.4.2) y Korsmeyer-Peppas (Ec.4.3).

$$\frac{C_t}{C_0} = f_{t_{max}} (1 - e^{-k_1 t}) \quad \text{Ec. 4.2}$$

$$\frac{C_t}{C_0} = k_{KP} t^n \quad \text{Ec. 4.3}$$

Para el caso de la Ec.4.2 f_{tmax} corresponde a la máxima fracción de Cu liberado durante el proceso, k_1 es la constante cinética de primer orden (h^{-1}). Por otro lado, para el modelo de Korsmeyer-Peppas (Ec.4.3) los parámetros modelados son k_{KP} que corresponde a la constante de cinética del modelo (h^{-1}) y n es el exponente que indica el mecanismo de transporte implicado en el proceso.

La Tabla 4.10 muestra los resultados de los parámetros obtenidos de las regresiones de las Ecs. 4.2-4.3; la bondad del ajuste se analizó determinado el coeficiente de R^2 y el error porcentual absoluto (MAPE), el cual se calculó usando la Ec. 4.4, donde y_e es el valor determinado experimentalmente, y_p es el predicho por el modelo y n es el número total de datos.

$$MAPE = \frac{\sum |(y_e - y_p) / y_e|}{n} \times 100 \quad Ec.4.4$$

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.12 y la Figura 4.28.

Tabla 4.10. Resultados de los parámetros obtenidos de las ecuaciones usadas para los modelos de liberación/migración

Modelo pseudo primer orden			
f_{tmax}	$k_1 \times 10^{-2} (h^{-1})$	R_2	MAPE
0.47 (0.01)	7.7 (0.003)	0.998	2.25
Korsmeyer-Peppas			
$k_{KP}(h^{-1})$	n	R_2	MAPE
0.13 (0.03)	0.33 (0.06)	0.928	4.39

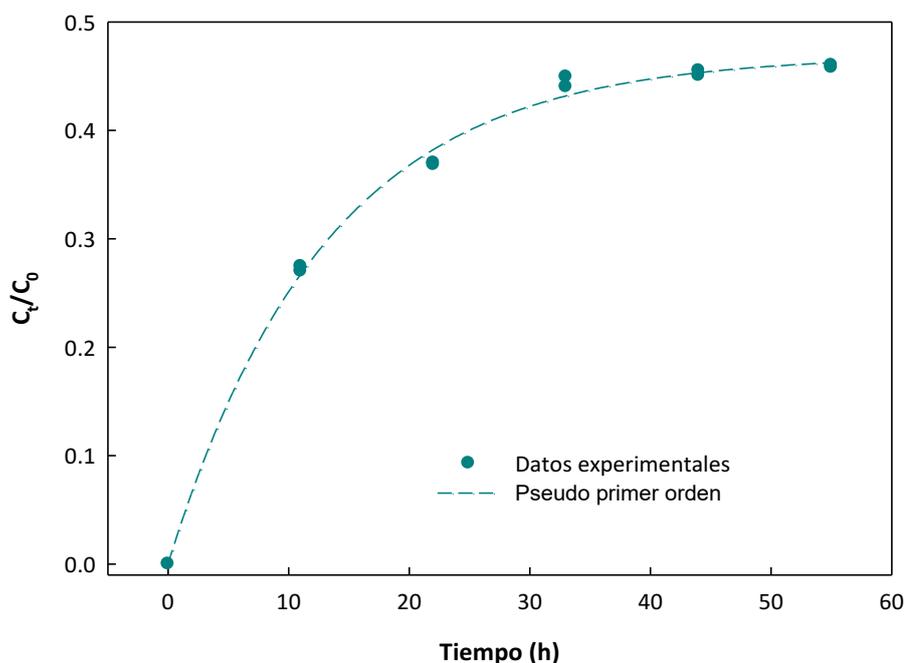


Figura 4.28. Cinética de liberación/migración de cobre en el sistema de estudio.

La liberación de compuestos activos desde una matriz polimérica usada como envase implica tres pasos:

(1) difusión molecular dentro de la película hacia la interfase película/sustrato, (2) transferencia de masa a través de la interfase y (3) dispersión en el sustrato (Lee y col., 2008).

El modelo de Korsmeyer–Peppas permite que la cinética sea estimada mediante el valor del exponente de difusión n . Valores de $n < 0.5$ indican una difusión Fickiana, o liberación del compuesto activo controlada por difusión, como en el Modelo de Higuchi. Si el exponente está en el rango $0.5 < n < 1$, indica una difusión anómala, o liberación del compuesto controlada tanto por difusión como por erosión. Si $n = 1$, indica transporte caso II, o liberación de orden cero, donde la velocidad de liberación es constante y controlada por la relajación del polímero. Finalmente, cuando $n > 1$, indica transporte súper caso II, o liberación controlada por erosión (Lamarra y col., 2020).

La Figura 4.28 muestra la variación experimental de la concentración de Cu (C_t/C_0) con respecto al tiempo y los valores predichos por los modelos. A partir de los resultados se pudo observar que la cantidad liberada de Cu fue del 20% durante las primeras 10 hs de contacto. El sustrato alcanzó una concentración de saturación de Cu a las 33 horas y luego

Capítulo 4: Matrices de quitosano-poli(vinil alcohol) funcionalizadas con nanopartículas

se produjo un amesetamiento. En este punto el Cu % fue 44.82 y al finalizar el proceso (tiempo=55 h), Cu % fue de 45.79 %. Por lo tanto en las condiciones ensayadas no se superó el 60 % de la concentración inicial de la película. En nuestro caso con $n=0.33$, el mecanismo de liberación resultó de tipo Fickiano.

4.8 CONCLUSIONES

Las mezclas de las suspensiones de quitosano cargadas con nanopartículas con una solución de PVA en distintas proporciones para obtener matrices nanocompuestas se llevó a cabo para mejorar las propiedades mecánicas especialmente para superar la rigidez de las matrices QAg y QCu. Las propiedades relacionadas con la resistencia al agua, específicamente la WVP, también mejoraron en las formulaciones 50:50. El incremento en la proporción de PVA llevó a una disminución de los valores de permeabilidad al vapor de agua.

Las interacciones entre los componentes de las matrices nanocompuestas fueron verificadas mediante los análisis de los espectros ATR-FTIR.

La piel puesta en contacto con matrices nanocompuestas funcionalizadas con NpAg (5QAg₂-5PVA) se sometieron a un ensayo *tape stripping* que permitió determinar cualitativamente la transferencia de nanopartículas hacia el SC que se fue disminuyendo hacia las capas más profundas de la piel.

Las matrices nanocompuestas 5QCu₂-5PVA y 5QAg₂-5PVA se estudiaron desde el punto de vista de su hemocompatibilidad dado su potencial uso como apósitos. Las mejores propiedades se obtuvieron para los nanocompuestos de quitosano y PVA funcionalizados con nanopartículas de cobre.

Los nanocompuestos funcionalizados con NpCu se aplicaron sobre un sustrato alimenticio lo que permitió comprobar la difusión de iones Cu hacia el sustrato. La máxima cantidad que difundió hacia el sustrato fue del 47%. Si bien las matrices nanocompuestas no se formularon con el objetivo de ponerlas en contacto directo con un sustrato alimenticio, este resultado podría ser valioso en futuros ensayos de citotoxicidad. Un diseño adecuado de nanocompuesto de quitosano combinado con nanopartículas y la dosificación debe ser evaluado exhaustivamente en forma preclínica antes de avanzar con las aplicaciones clínicas y alimenticias.

4.9 REFERENCIAS

- Abdelrazek, E. M., Elashmawi, I. S., & Labeeb, S. (2010). Chitosan filler effects on the experimental characterization, spectroscopic investigation and thermal studies of PVA/PVP blend films. *Physica B: Condensed Matter*, 405(8), 2021–2027. <https://doi.org/10.1016/j.physb.2010.01.095>
- Aguilar, M. R., Rodríguez, G., Fernández, M., Gallardo, A., & San Román, J. (2002). Polymeric active coatings with functionality in vascular applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 13(12), 1099–1104. <https://doi.org/10.1023/A:1021100916920>
- Aguirre-Loredo, R. Y., Rodríguez-Hernández, A. I., Morales-Sánchez, E., Gómez-Aldapa, C. A., & Velazquez, G. (2016). Effect of equilibrium moisture content on barrier, mechanical and thermal properties of chitosan films. *Food Chemistry*, 196, 560–566. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.065>
- Ahmed, S. B., Mohamed, H. I., Al-Subaie, A. M., Al-Ohali, A. I., & Mahmoud, N. M. R. (2021). Investigation of the antimicrobial activity and hematological pattern of nano-chitosan and its nano-copper composite. *Scientific Reports*, 11(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88907-z>
- Asran, A. S., Henning, S., & Michler, G. H. (2010). Polyvinyl alcohol-collagen-hydroxy apatite biocomposite nanofibrous scaffold: Mimicking the key features of natural bone at the nanoscale level. *Polymer*, 51(4), 868–876. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2009.12.046>
- Bahrani, S. B., Kordestani, S. S., Mirzadeh, H., & MANSOURI, P. (2003). Poly (vinyl alcohol)-chitosan blends: preparation, mechanical and physical properties. *Iranian Polymer Journal*, 12(2), 139–146. <https://www.sid.ir/en/Journal/ViewPaper.aspx?ID=12706>
- Balasubramanian, V., & Slack, S. M. (2001). Effects of fibrinogen residence time and shear rate on themorphology and procoagulant activity of human platelets adherent to polymeric biomaterials. *ASAIO Journal*, 47(4), 354–360. <https://doi.org/10.1097/00002480-200107000-00012>
- Bommannan, D., Potts, R. O., & Guy, R. H. (1990). Examination of stratum corneum barrier function in vivo by infrared spectroscopy. *Journal of Investigative Dermatology*, 95(4), 403–408. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12555503>
- Bonilla, J., Fortunati, E., Atarés, L., Chiralt, A., & Kenny, J. M. (2014). Physical, structural and antimicrobial properties of poly vinyl alcohol-chitosan biodegradable films. *Food Hydrocolloids*, 35, 463–470. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.07.002>
- Bourakadi, K. el, Merghoub, N., Fardioui, M., Mekhzoum, M. E. M., Kadmiri, I. M., Essassi, E. M., Qaiss, A. el K., & Bouhfid, R. (2019). Chitosan/polyvinyl alcohol/thiabendazolum-montmorillonite bio-nanocomposite films: Mechanical, morphological and antimicrobial properties. *Composites Part B: Engineering*, 172(May), 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2019.05.042>
- Buraidah, M.H., & Arof, A.K. (2011). Characterization of chitosan/ PVA blended electrolyte doped with NH₄Cl. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 357(16–17), 3261–3266. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2011.05.021>
- Butler, B. L., Vergano, P. J., Testin, R. F., Bunn, J. M., & Wiles, J. L. (1996). Mechanical and barrier properties of edible chitosan films as affected by composition and storage. *Journal of Food Science*, 61(5), 953–956. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1996.tb10909.x>

Capítulo 4: Matrices de quitosano-poli(vinil alcohol) funcionalizadas con nanopartículas

- Cacciotti, I., Mori, S., Cherubini, V., & Nanni, F. (2018). Eco-sustainable systems based on poly(lactic acid), diatomite and coffee grounds extract for food packaging. *International Journal of Biological Macromolecules*, *112*, 567–575. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.018>
- Clausen, M. L., Slotved, H. C., Krogfelt, K. A., & Agner, T. (2016). Tape Stripping Technique for Stratum Corneum Protein Analysis. *Scientific Reports*, *6*(Table 2), 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep19918>
- Chen, Q., Liu, Y., Wang, T., Wu, J., Zhai, X., Li, Y., Lu, W. W., Pan, H., & Zhao, X. (2017). Chitosan-PVA monodisperse millimeter-sized spheres prepared by electrospraying reduce the thromboembolic risk in hemorrhage control. *Journal of Materials Chemistry B*, *5*(20), 3686–3696. <https://doi.org/10.1039/c7tb00032d>
- Chhatri, A., Bajpai, J., Bajpai, A. K., Sandhu, S. S., Jain, N., & Biswas, J. (2011). Cryogenic fabrication of savlon loaded macroporous blends of alginate and polyvinyl alcohol (PVA). Swelling, deswelling and antibacterial behaviors. *Carbohydrate Polymers*, *83*(2), 876–882. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.08.077>
- Chivrac, F., Pollet, E., & Avérous, L. (2009). Progress in nano-biocomposites based on polysaccharides and nanoclays. *Materials Science and Engineering R: Reports*, *67*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.msere.2009.09.002>
- Costa, E. S., & Mansur, H. S. (2008). Preparation and characterization of chitosan/poly(vinyl alcohol) blend chemically crosslinked by glutaraldehyde for tissue engineering application. *Quimica Nova*, *31*(6), 1460–1466. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000600034>
- Costa-Júnior, E. S., Barbosa-Stancioli, E. F., Mansur, A. A. P., Vasconcelos, W. L., & Mansur, H. S. (2009). Preparation and characterization of chitosan/poly(vinyl alcohol) chemically crosslinked blends for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, *76*(3), 472–481. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.11.015>
- Curtis, A., Wilkinson, C. (1999). New depths in cell behaviour: reactions of cells to nanotopography. *In Biochemical Society Symposium*, *65*, 15–26. <https://europepmc.org/article/med/10320930>
- Dai, T., Tanaka, M., & Huang, Y. (2011). Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, *9*(7), 857–879. <https://doi.org/10.1586/eri.11.59>
- Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R. M., & Chiellini, E. (2011). Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, *36*(8), 981–1014. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.02.001>
- Dobrovolskaia, Marina A., Clogston, J. D., Neun, B. W., Hall, J. B., Patri, A. K., y McNeil, S. E. (2008). Updated method for in vitro analysis of nanoparticle hemolytic properties. *Nano Letters*, *8*(8), 2180–2187. <https://doi.org/10.1021/nl0805615>
- Donglu, F., Wenjian, Y., Kimatu, B. M., Mariga, A. M., Liyan, Z., Xinxin, A., & Qihui, H. (2016). Effect of nanocomposite-based packaging on storage stability of mushrooms (*Flammulina velutipes*). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *33*, 489–497. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.11.016>

Capítulo 4: Matrices de quitosano-poli(vinil alcohol) funcionalizadas con nanopartículas

- Echeverría, I., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., Mauri, A. N., & Montero, M. P. (2018). Active nanocomposite films based on soy proteins-montmorillonite- clove essential oil for the preservation of refrigerated blue fin tuna (*Thunnus thynnus*) fillets. *International Journal of Food Microbiology*, 266, 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.003>
- El Achaby, M., Essamlali, Y., el Miri, N., Snik, A., Abdelouahdi, K., Fihri, A., Zahouily, M., & Solhy, A. (2014). Graphene oxide reinforced chitosan/polyvinyl pyrrolidone polymer bio-nanocomposites. *Journal of Applied Polymer Science*, 131(22), 1–11. <https://doi.org/10.1002/app.41042>
- El Miri, N., Abdelouahdi, K., Zahouily, M., Fihri, A., Barakat, A., Solhy, A., & el Achaby, M. (2015). Bio-nanocomposite films based on cellulose nanocrystals filled polyvinyl alcohol/chitosan polymer blend. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(22), 1–13. <https://doi.org/10.1002/app.42004>
- El-Hefian, E. A., Nasef, M. M., & Yahaya, A. H. (2011). Preparation and characterization of chitosan/poly(vinyl alcohol) blended films: Mechanical, thermal and surface investigations. *E-Journal of Chemistry*, 8(1), 91–96. <https://doi.org/10.1155/2011/969062>
- Escobar-Chávez, J. J., Merino-Sanjuán, V., López-Cervantes, M., Urban-Morlan, Z., Piñón-Segundo, E., Quintanar-Guerrero, D., & Ganem-Quintanar, A. (2008). The tape-stripping technique as a method for drug quantification in skin. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 11(1), 104–130. <https://doi.org/10.18433/J3201Z>
- Ezerskaia, A., Pereira, S. F., Urbach, H. P., & Varghese, B. (2018). Depth resolved quantitative profiling of stratum corneum lipids and water content using short-wave infrared spectroscopy. In *Photonics in Dermatology and Plastic Surgery*, 10467, 104670R. <https://doi.org/10.1117/12.2291896>
- Gamer, A. O., Leibold, E., & Van Ravenzwaay, B. (2006). The in vitro absorption of microfine zinc oxide and titanium dioxide through porcine skin. *Toxicology in Vitro*, 20(3), 301–307. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2005.08.008>
- George, J., Sajeevkumar, V. A., Ramana, K. V., Sabapathy, S. N., & Siddaramaiah. (2012). Augmented properties of PVA hybrid nanocomposites containing cellulose nanocrystals and silver nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry*, 22(42), 22433. <https://doi.org/10.1039/c2jm35235d>
- Ghaderi, J., Hosseini, S. F., Keyvani, N., & Gómez-Guillén, M. C. (2019). Polymer blending effects on the physicochemical and structural features of the chitosan/poly(vinyl alcohol)/fish gelatin ternary biodegradable films. *Food Hydrocolloids*, 95(April), 122–132. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.04.021>
- Giteru, S. G., Ali, M. A., & Oey, I. (2019). Solvent strength and biopolymer blending effects on physicochemical properties of ze in-chitosan-polyvinyl alcohol composite films. *Food Hydrocolloids*, 87, 270–286. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.08.006>
- Goffin, A. L., Raquez, J. M., Duquesne, E., Siqueira, G., Habibi, Y., Dufresne, A., & Dubois, P. (2011). From interfacial ring-opening polymerization to melt processing of cellulose nanowhisker-filled polylactide-based nanocomposites. *Biomacromolecules*, 12(7), 2456–2465. <https://doi.org/10.1021/bm200581h>

Capítulo 4: Matrices de quitosano-poli(vinil alcohol) funcionalizadas con nanopartículas

- Gopal, A., Kant, V., Gopalakrishnan, A., Tandan, S. K., & Kumar, D. (2014). Chitosan-based copper nanocomposite accelerates healing in excision wound model in rats. *European Journal of Pharmacology*, 731(1), 8–19. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.02.033>
- Guerrero, P., Stefani, P. M., Ruseckaite, R. A., & de La Caba, K. (2011). Functional properties of films based on soy protein isolate and gelatin processed by compression molding. *Journal of Food Engineering*, 105(1), 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.02.003>
- Haghighi, H., Licciardello, F., Fava, P., Siesler, H. W., & Pulvirenti, A. (2020). Recent advances on chitosan-based films for sustainable food packaging applications. *Food Packaging and Shelf Life*, 26, 100551. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100551>
- Hajji, S., Chaker, A., Jridi, M., Maalej, H., Jellouli, K., Boufi, S., & Nasri, M. (2016). Structural analysis, and antioxidant and antibacterial properties of chitosan-poly (vinyl alcohol) biodegradable films. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(15), 15310–15320. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6699-9>
- Hajji, S., Salem, R. B. S. ben, Hamdi, M., Jellouli, K., Ayadi, W., Nasri, M., yBoufi, S. (2017). Nanocomposite films based on chitosan–poly(vinyl alcohol) and silver nanoparticles with high antibacterial and antioxidant activities. *Process Safety and Environmental Protection*, 111, 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2017.06.018>
- Honeywell-Nguyen, P. L., & Bouwstra, J. A. (2005). Vesicles as a tool for transdermal and dermal delivery. *Drug Discovery Today: Technologies*, 2(1), 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2005.05.003>
- Hu, Z., Zhang, D. Y., Lu, S. T., Li, P. W., & Li, S. D. (2018). Chitosan-based composite materials for prospective hemostatic applications. *Marine Drugs*, 16(8), 1–25. <https://doi.org/10.3390/md16080273>
- Huo, S., Jiang, Y., Jiang, Z., Landis, R. F., Liang, X. J., & Rotello, V. M. (2018). Stable and oxidant responsive zwitter ionic nanoclusters. *Nanoscale*, 10(16), 7382–7386. <https://doi.org/10.1039/c7nr08951a>
- Jamróz, E., Kulawik, P., & Kopel, P. (2019). The effect of nanofillers on the functional properties of biopolymer-based films: A review. *Polymers*, 11(4), 1–43. <https://doi.org/10.3390/polym11040675>
- Jayakumar, R., Prabakaran, M., Nair, S., & Tamura, H. (2010). Novel chitin and chitosan nanofibers in biomedical applications. *Biotechnology Advances*, 28(1), 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.11.001>
- Jeong, S. H., Kim, J. H., Yi, S. M., Lee, J. P., Kim, J. H., Sohn, K. H., Park, K. L., Kim, M. K., & Son, S. W. (2010). Assessment of penetration of quantum dots through in vitro and in vivo human skin using the human skin equivalent model and the tape stripping method. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 394(3), 612–615. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.03.032>
- Jia, Y. T., Gong, J., Gu, X. H., Kim, H. Y., Dong, J., & Shen, X. Y. (2007). Fabrication and characterization of poly (vinyl alcohol)/chitosan blend nanofibers produced by electrospinning method. *Carbohydrate Polymers*, 67(3), 403–409. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.06.010>

Capítulo 4: Matrices de quitosano-poli(vinil alcohol) funcionalizadas con nanopartículas

- Jiang, Y., Li, Y., Chai, Z., y Leng, X. (2010). Study of the physical properties of whey protein isolate and gelatin composite films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 5100–5108. <https://doi.org/10.1021/jf9040904>
- Kanatt, S. R., Rao, M. S., Chawla, S. P., y Sharma, A. (2012). Active chitosan-polyvinyl alcohol films with natural extracts. *Food Hydrocolloids*, 29(2), 290–297. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.03.005>
- Kanmani, P., & Rhim, J.W. (2014). Physical, mechanical and antimicrobial properties of gelatin based active nanocomposite films containing AgNPs and nanoclay. *Food Hydrocolloids*, 35, 644–652. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.08.011>
- Kumar, P. T. S., Abhilash, S., Manzoor, K., Nair, S., Tamura, H., & Jayakumar, R. (2010). Preparation and characterization of novel β -chitin/ nanosilver composite scaffolds for wound dressing applications. *Carbohydrate Polymers*, 80(3), 761–767. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.12.024>
- Lamarra, J., Calienni, M. N., Rivero, S., & Pinotti, A. (2020). Electrospun nanofibers of poly(vinyl alcohol) and chitosan-based emulsions functionalized with cabreuva essential oil. *International Journal of Biological Macromolecules*, 160, 307–318. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.096>
- Lamarra, J., Rivero, S., & Pinotti, A. (2020). Nanocomposite bilayers based on poly(vinyl alcohol) and chitosan functionalized with gallic acid. *International Journal of Biological Macromolecules*, 146, 811–820. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.049>
- Lee, S. Y., Mohan, D. J., Kang, I. A., Doh, G. H., Lee, S., & Han, S. O. (2009). Nanocellulose reinforced PVA composite films: Effects of acid treatment and filler loading. *Fibers and Polymers*, 10(1), 77–82. <https://doi.org/10.1007/s12221-009-0077-x>
- Liu, Y., Zhang, X., Xia, Y., & Yang, H. (2010). Magnetic-field-assisted electrospinning of aligned straight and wavy polymeric nanofibers. *Advanced Materials*, 22(22), 2454–2457. <https://doi.org/10.1002/adma.200903870>
- Lotfi, M., Tajik, H., Moradi, M., Forough, M., Divsalar, E., yKuswandi, B. (2018). Nanostructuredchitosan/ monolaurin film: Preparation, characterization and antimicrobialactivityagainst Listeria monocytogenesonultrafilteredwhitecheese. *Lwt*, 92, 576–583. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.03.020>
- Luo, Z., Qin, Y., & Ye, Q. (2015). Effect of nano-TiO₂-LDPE packaging on microbiological and physicochemical quality of Pacific white shrimp during chilled storage. *International Journal of Food Science and Technology*, 50(7), 1567–1573. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12807>
- Maksym, P. v. (2015). Chitosan as a Hemostatic agent: Current state. *European Journal of Medicine. Series B*, 2(1), 24–33. <https://doi.org/10.13187/ejm.s.b.2015.2.24>
- Marín-Silva, D. A., Rivero, S., & Pinotti, A. (2019). Chitosan-based nanocomposite matrices: development and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 123. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.035>
- Mathew, S., S, S., Mathew, J., yRadhakrishnan, E. K. (2019). Biodegradable and active nanocompositepouchesreinforcedwithsilvern nanoparticlesforimprovedpackagingofchickensausage

Capítulo 4: Matrices de quitosano-poli(vinil alcohol) funcionalizadas con nanopartículas

- s. *FoodPackaging and ShelfLife*, 19(August 2018), 155–166. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.12.009>
- Mohandas, A., Deepthi, S., Biswas, R., yJayakumar, R. (2018). Chitosanbasedmetallicnanocompositescaffolds as antimicrobialwounddressings. *Bioactive Materials*, 3(3), 267–277. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.11.003>
- Naveen Kumar, H. M. P., Prabhakar, M. N., VenkataPrasad, C., Madhusudhan Rao, K., Ashok Kumar Reddy, T., Chowdoji Rao, K., & Subha, M.C.S. (2010). Compatibility studies of chitosan/PVA blend in 2% aqueous acetic acid solution at 30 °c. *Carbohydrate Polymers*, 82(2), 251–255. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.04.021>
- Nguyen, T. H., Palankar, R., Bui, V. C., Medvedev, N., Greinacher, A., & Delcea, M. (2016). Rupture Forces among human blood platelets at different degrees of activation. *Scientific Reports*, 6(December 2015), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep25402>
- Nicole, L., Laberty-Robert, C., Rozes, L., & Sanchez, C. (2014). Hybrid materials science: A promised land for the integrative design of multifunctional materials. *Nanoscale*, 6(12), 6267–6292. <https://doi.org/10.1039/c4nr01788a>
- Pandele, A. M., Ionita, M., Crica, L., Dinescu, S., Costache, M., & Iovu, H. (2014). Synthesis, characterization, and in vitro studies of graphene oxide/chitosan-polyvinyl alcohol films. *Carbohydrate Polymers*, 102(1), 813–820. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.10.085>
- Park, K., Mao, F. W., & Park, H. (1990). Morphological characterization of surface-induced platelet activation. *Biomaterials*, 11(1), 24–31. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(90\)90047-T](https://doi.org/10.1016/0142-9612(90)90047-T)
- Paul, D. R., & Robeson, L. M. (2008). Polymer nanotechnology: Nanocomposites. *Polymer*, 49(15), 3187–3204. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2008.04.017>
- Peppelman, M., van den Eijnde, W. A. J., Jaspers, E. J., Gerritsen, M. J. P., & van Erp, P. E. J. (2015). Combining tape stripping and non-invasive reflectance confocal microscopy: An in vivo model to study skin damage. *Skin Research and Technology*, 21(4), 474–484. <https://doi.org/10.1111/srt.12217>
- Pinto, A. M. B., Santos, T. M., Caceres, C. A., Lima, J. R., Ito, E. N., & Azeredo, H. M. C. (2015). Starch-cashewtree gumnano composite films and their application for coating cashewnuts. *LWT – Food Science and Technology*, 62(1), 549–554. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.07.028>
- Pflücker, F., Wendel, V., Hohenberg, H., Gärtner, E., Will, T., Pfeiffer, S., Wepf, R., & Gers-Barlag, H. (2001). The human stratum corneum layer: An effective barrier against dermal uptake of different forms of topically applied micronised titanium dioxide. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, 14(SUPPL. 1), 92–97. <https://doi.org/10.1159/000056396>
- Qian, Q., Nath, K. A., Wu, Y., Daoud, T. M., & Sethi, S. (2010). Hemolysis and acute kidneyfailure. *American Journal of Kidney Diseases*, 56(4), 780–784. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2010.03.025>
- Regiel-Futyra, A., Kus-Liškiewicz, M., Sebastian, V., Irusta, S., Arruebo, M., Stochel, G., & Kyzioł, A. (2015). Development of non cytotoxic chitosan-gold nanocomposites as efficient anti bacterial materials. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 7(2), 1087–1099. <https://doi.org/10.1021/am508094e>

Capítulo 4: Matrices de quitosano-poli(vinil alcohol) funcionalizadas con nanopartículas

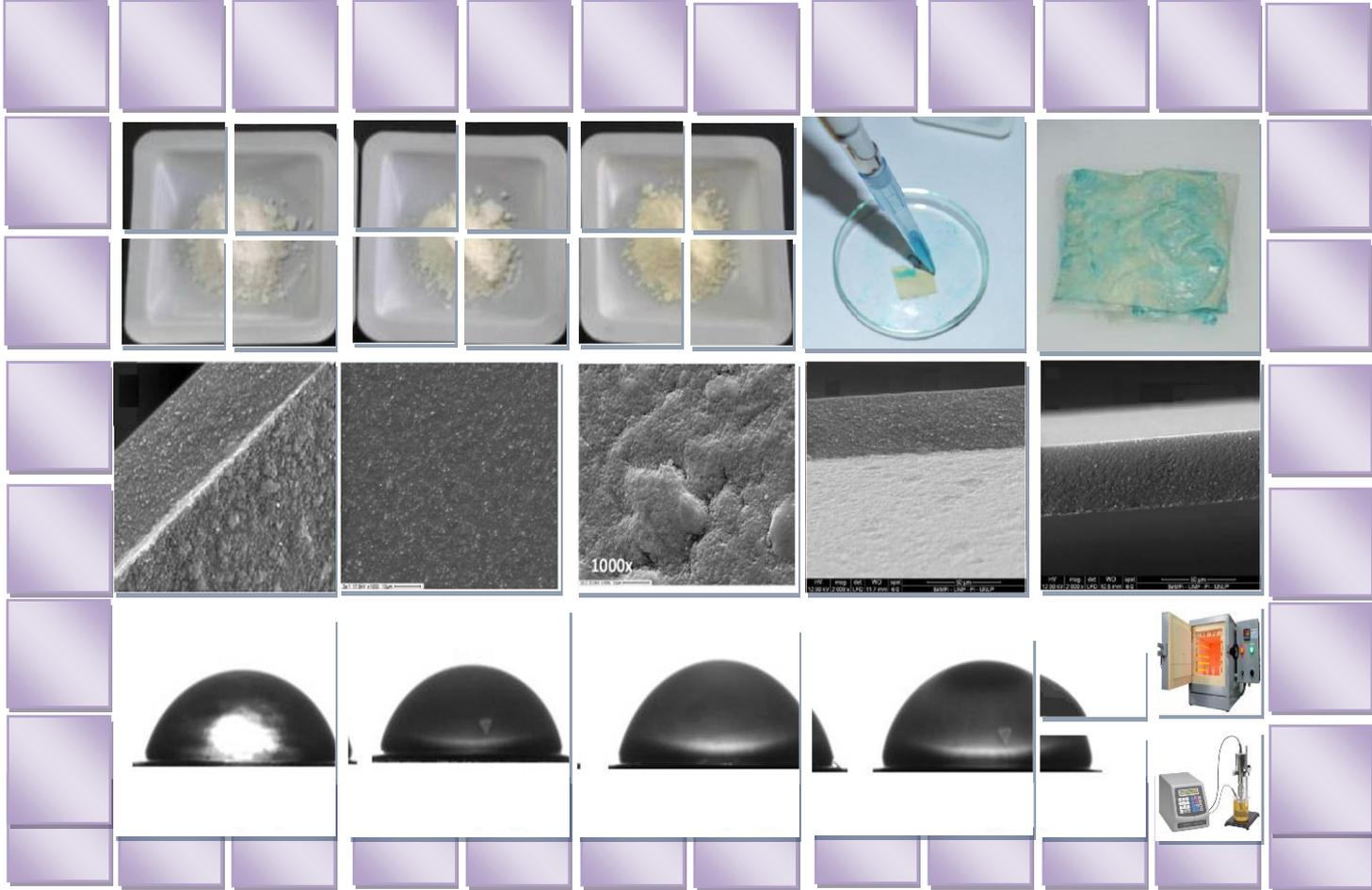
- Respuestas.tips. (2009). *¿Cuál es el número normal de plaquetas?* 2016. [respuesta.tips/celulas-encargadas-de-la-coagulacion/](https://www.respuestas.tips/celulas-encargadas-de-la-coagulacion/)
- Rivero, S., García, M. A., & Pinotti, A. (2009). Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan. *Journal of Food Engineering*, *90*(4), 531–539. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.07.021>
- Rodríguez, J. R., Turégano-López, M., DeFelipe, J., & Merchán-Pérez, A. (2018). Neuroanatomy from mesoscopic to nanoscopic scales: An improved method for the observation of semithin sections by high-resolution scanning electron microscopy. *Frontiers in Neuroanatomy*, *12*(February), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fnana.2018.00014>
- Rodríguez-González, C., Martínez-Hernández, A. L., Castañó, V. M., Kharissova, O. , Ruoff, R. S., & Velasco-Santos, C. (2012). Polysaccharide nanocomposites reinforced with graphene oxide and keratin-grafted graphene oxide. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, *51*(9), 3619–3629. <https://doi.org/10.1021/ie200742x>
- Rogovina, S. Z., Alexanyan, C. , & Prut, E. v. (2011). Biodegradable Blends Based on Chitin and Chitosan: Production, Structure, and Properties. *Journal of Applied Polymer Science*, *121*, 1850–1859. <https://doi.org/10.1002/app.33477>
- Santos, C., Silva, C., Buttel, Z., Guimaraes, R., Pereira, S., Tamagnini, P., & Zille, A. (2014). Preparation and characterization of polysaccharides/ PVA blend nanofibrous membranes by electrospinning method. *Carbohydrate Polymer*, *99*, 584–592.
- Schulz, J., Hohenberg, H., Pflücker, F., Gärtner, E., Will, T., Pfeiffer, S., & Wittern, K. P. (2002). Distribution of sunscreens on skin. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *54*, 157–163. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00120-5](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00120-5)
- Sionkowska, A. (2011). Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: Review. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, *36*(9), 1254–1276. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.05.003>
- Sobiepanek, A., & Kobiela, T. (2019). Application of the tape stripping method in the research on the skin condition and its diseases. *Cancer Treat Rev*, *5*(1), 1–11.
- Sothornvit, R. (2019). Nanostructured materials for food packaging systems: new functional properties. *Current Opinion in Food Science*, *25*, 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.03.001>
- Srivastava, R., Tiwari, D. K., & Dutta, P. K. (2011). 4-(Ethoxycarbonyl) phenyl-1-amino-oxobutanoic acid-chitosan complex as a new matrix for silver nanocomposite film: Preparation, characterization and antibacterial activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, *49*(5), 863–870. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.07.015>
- Surber, C., Schwarb, F. P., & Smith, E. W. (2001). TAPE-stripping technique. *Journal of Toxicology: Cutaneous and Ocular Toxicology*, *20*(4), 461–474. <https://doi.org/10.1081/CUS-120001870>
- Tanaka, M., Motomura, T., Kawada, M., Anzai, T., YuuKasori, Shiroya, T., Shimura, K., Onishi, M., & Akira Mochizuki. (2000). Blood compatible aspects of poly(2-methoxyethylacrylate) (PMEA)-relationship between protein adsorption and platelet adhesionon PMEA surface. *Biomaterials*, *21*(14), 1471–1481. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00031-4](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00031-4)

Capítulo 4: Matrices de quitosano-poli(vinil alcohol) funcionalizadas con nanopartículas

- Tong, C., Li, L., Xiao, F., Fan, J., Zhong, X., Liu, X., Liu, B., Wu, Z., & Zhou, J. (2019). Daptomycin and AgNPco-loaded rGO nanocomposites for specific treatment of Gram-positive bacterial infection: In vitro and in vivo. *Biomaterials Science*, 7(12), 5097–5111. <https://doi.org/10.1039/c9bm01229j>
- Totea, G., Ionita, D., Demetrescu, I., & Mitache, M. M. (2014). In vitro hemocompatibility and corrosion behavior of new Zr-binary alloys in whole human blood. *Central European Journal of Chemistry*, 12(7), 796–803. <https://doi.org/10.2478/s11532-014-0535-1>
- van Oeveren, W., Tielliu, I. F., & de Hart, J. (2012). Comparison of modified Chandler, roller pump, and ball valve circulation models for in vitro testing in high blood flow conditions: Application in thrombo genicity testing of different materials for vascular applications. *International Journal of Biomaterials*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/673163>
- Vasconcellos, F. C., Goulart, G. A., & Beppu, M.M. (2011). Production and characterization of chitosan microparticles containing papain for controlled release applications. *Powder Technology*, 205(1–3), 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2010.08.066>
- Wang, J., Wang, X., Xu, C., Zhang, M., & Shang, X. (2011). Preparation of graphene/poly(vinyl alcohol) nanocomposites with enhanced mechanical properties and water resistance. *Polymer International*, 60(5), 816–822. <https://doi.org/10.1002/pi.3025>
- Wang, K., Pan, S., Qi, Z., Xia, P., Xu, H., Kong, W., Li, H., Xue, P., Yang, X., & Fu, C. (2020). Recent advances in chitosan-based metal nanocomposites for wound healing applications. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2020(1). <https://doi.org/10.1155/2020/3827912>
- Wang, X. H., Li, D. P., Wang, W. J., Feng, Q. L., Cui, F. Z., Xu, Y. X., Song, X. H., & van der Werf, M. (2003). Crosslinked collagen/chitosan matrix for artificial livers. *Biomaterials*, 24(19), 3213–3220. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00170-4](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00170-4)
- Weber, M., Steinle, H., Golombek, S., Hann, L., Schlensak, C., Wendel, H. P., & Avci-Adali, M. (2018). Blood-contacting biomaterials: In vitro evaluation of the hemocompatibility. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6(July). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00099>
- Wu, J., Liu, W., Xue, C., Zhou, S., Lan, F., Bi, L., Xu, H., Yang, X., & Zeng, F. D. (2009). Toxicity and penetration of TiO₂ nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure. *Toxicology Letters*, 191(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.05.020>
- Wu, Q., Sun, Y., Gao, J., Dong, S., Luo, G., Li, H., & Zhao, L. (2017). Applications of hybrid organic–inorganic materials in chiral separation. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 95, 140–148. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.08.005>
- Wu, S., Wang, W., Yan, K., Ding, F., Shi, X., Deng, H., & Du, Y. (2018). Electrochemical writing on edible polysaccharide films for intelligent food packaging. *Carbohydrate Polymers*, 186(November 2017), 236–242. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.01.058>
- Wu, Z., Huang, X., Li, Y. C., Xiao, H., & Wang, X. (2018). Novel chitosan films with laponite immobilized Ag nanoparticles for active food packaging. *Carbohydrate Polymers*, 199, 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.07.030>
- Xu, Y., Rehmani, N., Alsubaie, L., Kim, C., Sismour, E., & Scales, A. (2018). Tapioca starch active nanocomposite films and their antimicrobial effective nesson ready-to-eat chicken meat. *Food Packaging and Shelf Life*, 16(January), 86–91. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.02.006>

Capítulo 4: Matrices de quitosano-poli(vinil alcohol) funcionalizadas con nanopartículas

- Yamazaki, M., & Hudson, S. M. (2012). Chitosan derivatives for bioadhesive/ hemostatic applications: Chemical and biological aspects. *Polysaccharide Building Blocks: A Sustainable Approach to the Development of Renewable Biomaterials*, 199–226. <https://doi.org/10.1002/9781118229484.ch7>
- Youssef, A. M., Abou-Yousef, H., El-Sayed, S. M., yKamel, S. (2015). Mechanical and antibacterial properties of novel high performance chitosan/nanocomposite films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 76, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.02.016>
- Zare, M., Namratha, K., Alghamdi, S., Mohammad, Y. H. E., Hezam, A., Zare, M., Drmash, Q. A., Byrappa, K., Chandrashekar, B. N., Ramakrishna, S., & Zhang, X. (2019). Novel green biomimetic approach for synthesis of ZnO-Ag nanocomposite; Antimicrobial activity against food-borne pathogen, biocompatibility and solar photocatalysis. *Scientific Reports*, 9(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44309-w>
- Zhang, L., Casey, B., Galanakis, D. K., Marmorat, C., Skoog, S., Vorvolakos, K., Simon, M., & Rafailovich, M. H. (2017). The influence of surface chemistry on adsorbed fibrinogen conformation, orientation, fiber formation and platelet adhesion. *Acta Biomaterialia*, 54, 164–174. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.03.002>
- Zhao, Y. F., Zhao, J. Y., Hu, W. Z., Ma, K., Chao, Y., Sun, P. J., Fu, X. B., & Zhang, H. (2019). Synthetic poly(vinyl alcohol)-chitosan as a new type of highly efficient thermostatic sponge with blood-triggered swelling and high biocompatibility. *Journal of Materials Chemistry B*, 7(11), 1855–1866. <https://doi.org/10.1039/C8TB03181A>



Capítulo 5

Materiales autolimpiantes

5.1 INTRODUCCIÓN

El dióxido de titanio es un material con una gran importancia como pigmento blanco tanto por sus propiedades ópticas, su brillo, su alto índice de refracción (> 2.4), su estabilidad química y nula toxicidad. Es inerte, térmicamente estable y no inflamable.

Sus propiedades han permitido su uso en diferentes áreas (Gázquez González, 2010; Martínez Sanmartín, 2019).

- Pinturas: Pinturas decorativas, lacas, pintura industrial (automóviles, electrodomésticos), pinturas marinas, pinturas en polvo, señalización de tráfico
- Plásticos: Materiales de construcción, mobiliario, objetos de uso doméstico, bolsas y paquetería, juguetes, cubiertas para suelos y paredes
- Papel: Papel para laminados, material de envoltorio, papel fotográfico, sellos de correos, publicaciones (libros, diarios, revistas), papel de escritura
- Tintas de impresión: tintas blancas utilizadas en los sistemas de impresión directa sobre las prendas
- Productos alimenticios: autorizado como colorante alimentario (E-171), en su forma anatasa. Se considera no tóxico y ha sido aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA), la UE y China (Al-Naamani y col., 2016; Archana y col., 2013; Zemljič y col., 2013) para su uso en alimentos para humanos, medicamentos, cosméticos y materiales en contacto con alimentos (Archana y col., 2013; Wist y col., 2002).
- Energía: obtención de hidrógeno a través de hidrólisis fotocatalítica
- Otros usos: antimicrobianos, caucho, esmaltes vítreos, cosméticos, cerámica, fibras sintéticas, productos médicos y farmacéuticos, cueros, jabones, hormigones y emplastes

Asimismo, las matrices de nanotubos de TiO_2 se han explorado ampliamente como plataformas de adhesión y crecimiento para células madre y óseas, prevención de la adhesión bacteriana, administración de fármacos y mejora de la coagulación de la sangre para el control de hemorragias (Archana y col., 2013; Brammer y col., 2008; Peng y col., 2009; Tang y col., 2009). Los iones de titanio liberados de las nanopartículas inhiben la

proliferación microbiana y, por lo tanto, aceleran la cicatrización de heridas (Archana y col., 2013; Grassian y col., 2007).

5.1.1 Minerales y estructura cristalina

En la naturaleza, el TiO_2 aparece con diferentes estructuras cristalinas. Las más comunes son el rutilo y la anatasa, siendo esta última de menor densidad, aunque ambos minerales suelen contener impurezas similares y tienen propiedades semejantes. Además, también hay otra estructura menos conocida llamada brookita, con una configuración ortorrómbica. La Figura 5.1 muestra las distintas estructuras cristalinas. El rutilo es normalmente la fuente mineral preferida en la producción de TiO_2 , por su contenido de 90-98% de dióxido de titanio, siendo el de la anatasa algo menor, entre 80 y 90%. A temperaturas mayores que 915°C , la anatasa (Figura 5.1) se convierte en rutilo.

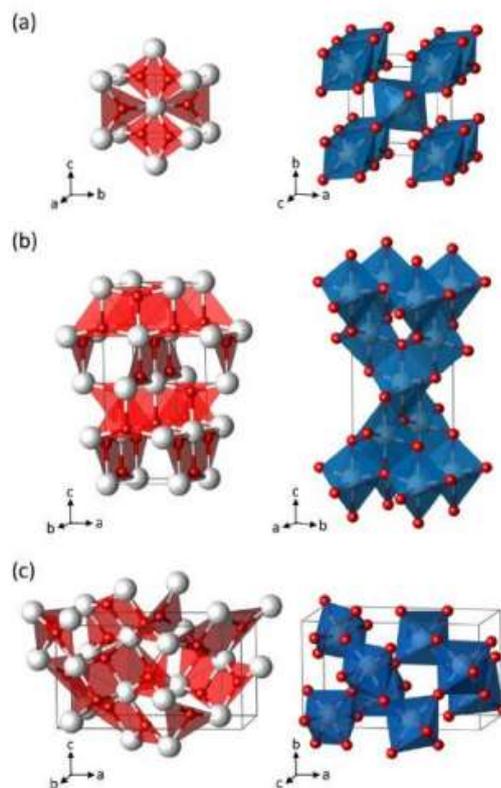


Figura 5.1. Estructuras cristalinas del rutilo, anatasa y brookita. Adaptado de Martínez Sanmartín (2019).

En ambas estructuras cristalinas el átomo de titanio está rodeado por seis átomos de oxígeno en formación aproximadamente regular, pero con organizaciones distintas. La anatasa presenta mejores propiedades fotocatalíticas.

Se considera que la anatasa es la fase más activa fotocatalíticamente, aunque también se han realizado varios estudios sobre la fase rutilo. El rutilo, con una banda de 3.0 eV (418 nm), es un fotocatalizador menos activo que la anatasa (3.2 eV, 387 nm) debido al empaquetamiento más apretado en las estructuras cristalinas, teniendo menos defectos para atrapar electrones fotoexcitados, lo que reduce la recombinación de portadores de carga. Como consecuencia de esto, la gran mayoría de las investigaciones recientes sobre fotocatalizadores de TiO₂ se han realizado sobre la fase anatasa (Teoh y col., 2012). Además, se ha demostrado que una mezcla de anatasa y rutilo tiene mayor actividad fotocatalítica que cualquiera de las dos fases por separado. Degussa P-25 es un catalizador comercial que contiene 80% de anatasa y 20% de rutilo. Se cree que la actividad fotocatalítica mejorada de Degussa P-25 se debe a la capacidad de los electrones excitados generados en las partículas de anatasa de transferirse a las partículas de rutilo, minimizando así la recombinación de cargas (Chen y Mao, 2007).

La fotocatalisis consiste en iniciar o acelerar reacciones de oxidación y reducción (redox) en presencia de un sólido semiconductor. En la Figura 5.2 se muestra una representación esquemática del proceso fotocatalítico. Cuando un material semiconductor es irradiado con radiación de energía igual o mayor a la de banda prohibida, se produce su excitación que promueve el paso de electrones de la banda de valencia a la banda de conducción, provocando la formación de pares hueco-electrón, los cuales son responsables de su conducción eléctrica en solución (Tong y col., 2012). La función del fotocatalizador radica en la modificación de la velocidad de recombinación de pares hueco-electrón (e^-/h^+).

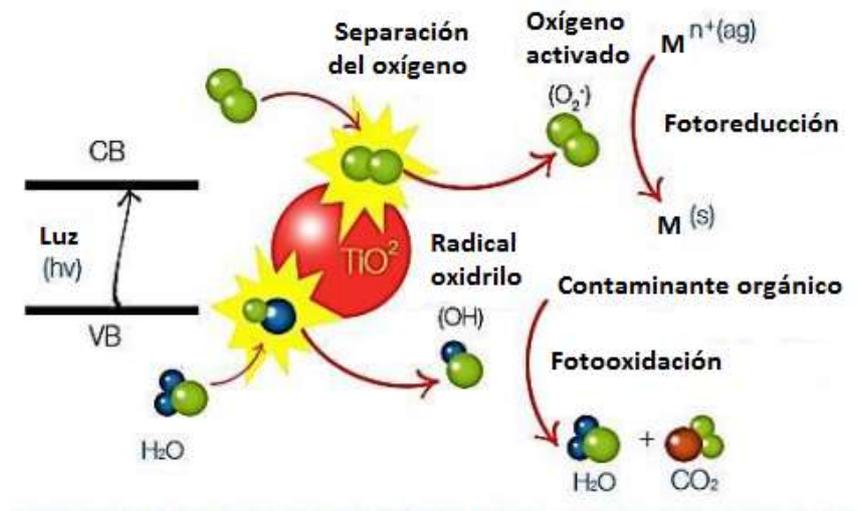
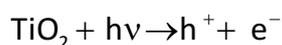


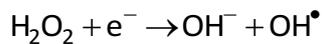
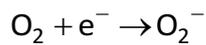
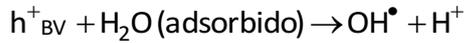
Figura 5.2. Mecanismo general del proceso de fotocatalisis. Adaptado de [Ibhadon y Fitzpatrick \(2013\)](#).

Los pares electrón-hueco (e⁻ /h⁺) son capaces de reaccionar con diferentes especies, abriendo la puerta a posibles aplicaciones, como la producción de hidrógeno mediante hidrólisis y la eliminación de bacterias, materia orgánica o contaminantes ambientales.

El TiO₂ es el semiconductor más utilizado en aplicaciones ambientales ya que muchos compuestos orgánicos tienen un potencial de oxidación por encima de la banda de valencia del óxido de titanio, y por este motivo pueden ser oxidados fotocatalíticamente por este material. En segundo lugar, el potencial redox del par H₂O/•OH se encuentra dentro del dominio del salto de banda del material. La elevada resistencia del TiO₂ a la corrosión fotoinducida unida a su bajo costo e inocuidad hacen que este material sea idóneo para su aplicación en procesos de oxidación avanzada basados en fotocatalisis heterogénea ([Hashimoto y col., 2005](#)). La banda de energía prohibida de este material es de 3.2 eV, que corresponde a una radiación de longitud de onda inferior a 387 nm (región ultravioleta), por lo que la estimulación energética a la que dan lugar los fotones UV es suficiente para generar el par e⁻ /h⁺ y desencadenar la reacción redox ([Alcántara Cobos, 2016](#)).



Estos pares e^- / h^+ pueden recombinarse, generando liberación de calor, o pueden migrar a la superficie del semiconductor, donde sufren reacciones redox con los iones y moléculas que se encuentran cerca del mismo (Chang y col., 2000).



El objetivo del proceso fotocatalítico es provocar la oxidación del contaminante, que se puede producir por la reacción de los huecos con los compuestos adsorbidos, o bien por las especies reactivas de oxígeno (ROS) que se generan por la reacción de los huecos con el agua para formar el radical OH^\bullet el cual es un oxidante fuerte (potencial redox estándar de 2.8 V). Otra posible vía de formación de las ROS es a partir de e^- , ya que estos por reacción con el O_2 pueden generar el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y, por dismutación de este, peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Marín y col., 2007).

El mecanismo de fotorreacción comienza cuando TiO_2 es iluminado con fotones cuya energía es igual o mayor a la separación energética existente entre la banda de valencia y la de conducción. En esta situación, tiene lugar una absorción de esos fotones y la creación en el seno del catalizador de pares e^- / h^+ , los cuales se disocian en fotoelectrones libres en la banda de conducción y foto-huecos en la banda de valencia. Simultáneamente, tiene lugar una adsorción de reactivos y, de acuerdo con el potencial redox (o nivel de energía) del catalizador, un electrón es transferido hacia una molécula aceptora (Ox_1) produciendo una reacción de reducción de la misma; al mismo tiempo, un foto-hueco es transferido hacia una molécula donadora (Red_2), que se oxidará. Cada ión formado reacciona para formar productos intermedios y finales. El flujo neto de electrones es nulo y el catalizador permanece inalterado. La excitación fotónica del catalizador aparece como el paso inicial de la activación de la totalidad del sistema catalítico.

La radiación UV requerida para los procesos fotocatalíticos puede provenir de una fuente artificial o del sol. La fuente artificial de radiación UV representa una gran parte de los costos operativos, tanto de capital como de mantenimiento de un sistema de reacción fotocatalítica debido al consumo eléctrico por su uso y la sustitución periódica de las lámparas UV. El aprovechamiento del sol, significaría, además del ahorro económico que supone esta energía, una disminución del impacto ambiental, todo lo cual hace que el proceso fotocatalítico desde el punto de vista del desarrollo sustentable sea muy atractivo.

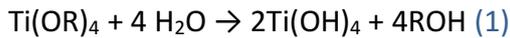
5.1.2 Matrices a base de quitosano funcionalizadas con nanopartículas de TiO₂

En las últimas dos décadas, el uso potencial de la fotocatálisis heterogénea sobre nanopartículas de TiO₂ ha despertado un gran interés en una gran variedad de aplicaciones como la generación de H₂, la desinfección y la desintoxicación del agua, la destrucción de contaminantes a base de gas y las superficies bactericidas y autolimpiantes fotoinducidas (Fujishima y col., 2008; Ochiai y Fujishima, 2012).

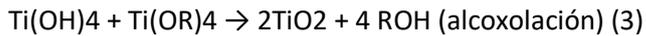
Los factores que determinan las propiedades finales de las nanopartículas son principalmente dependientes de las vías de síntesis utilizadas para producirlas. Desde 1971, el sol-gel ha sido el método de síntesis más conocido y aplicado en la producción de múltiples óxidos como el TiO₂ (Dislich, 1971). Parámetros como el tipo de precursores (Kumar y Rao, 2014), el pH de la solución (Mahshid y col., 2007), el tratamiento preliminar de la solución (Latt y Kobayashi, 2008) y las temperaturas de calcinación (Loryuenyong y col., 2012) dieron lugar a diversas propiedades de las nanopartículas de TiO₂ resultantes. (Yahaya y col., 2017).

El método sol-gel es el proceso de transformación del sol (partículas sólidas suspendidas en líquido) en gel (redes de partículas de sol). Esto implica dos reacciones principales: hidrólisis y condensación, antes de obtener nanopartículas cristalinas de TiO₂ por calcinación (Figura 5.3). Para la síntesis de nanopartículas de TiO₂, los precursores más utilizados son Ti(OBu)₄ (Liao y col., 2009), TiCl₃ (Kumary Rao, 2014), TiCl₄ (Fang y Chen, 2003), TiBr₄ (Németh y col., 2015) y Ti[OCH(CH₃)₂]₄ (TTIP) (Liu y col., 2006). Estos precursores son hidrolizados mediante la adición de agua (hidrólisis), dando lugar a la formación de una red tridimensional compleja (condensación) como se muestra en las siguientes ecuaciones:

Hidrólisis



Condensación



donde,

R representa etilo, i-propilo, n-butilo (Brinker y Scherer, 2013; Vorkapic y Matsoukas, 1998).

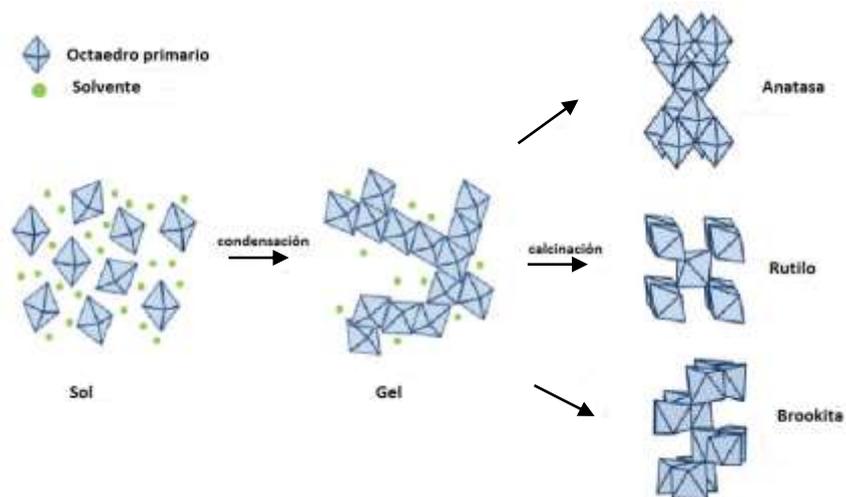


Figura 5.3. Proceso de hidrólisis, condensación y calcinación en el método sol-gel de síntesis de nanopartículas de TiO_2 bajo sus tres formas minerales anatasa, rutilo y brookita.

El tamaño y la morfología de las nanopartículas de TiO_2 finales están muy influenciados por la relación precursor-agua (Watson y col., 2003). Una relación más baja de agua-precursor dio como resultado una partícula monodispersa de 0.5 a 1 nm de diámetro (Mahshid y col., 2007). Para valores de razón más altos, se formarían y agregarían

coloidales y predados inestables. La peptización se lleva a cabo habitualmente para que estos agregados alcancen el tamaño final, que suele ser inferior a 100 nm (Look y Zukoski, 1995).

Desde que Wang y col. (1997) informaron por primera vez sobre la superhidrofilicidad fotoinducida por luz ultravioleta de las películas policristalinas de TiO₂ y sus aplicaciones como superficies fotoinducidas autolimpiantes, este tema ha experimentado un creciente interés (Agrios y Pichat, 2005; Liu y col., 2014). Un efecto sinérgico causado por la producción de especies de oxígeno reactivo fotocatalítico (ROS) inducidas por la luz ultravioleta sobre las superficies de TiO₂, que atacan a las moléculas orgánicas adsorbidas en las películas, y la superhidrofilicidad que conduce a la propagación de gotas de agua es responsable del efecto de autolimpieza observado en las películas de TiO₂ (Agrios y Pichat, 2005; Banerjee y col., 2015). Aunque estas películas parecen tener gran potencial como materiales autolimpiables fotoinducidos, su uso en ambientes interiores es limitado ya que a menudo los dispositivos de iluminación emiten longitudes de onda visibles en lugar de UV. Por esta razón, varios estudios han informado la preparación de materiales de TiO₂ con respuesta a la luz visible (Banerjee y col., 2015; Gaminian y Montazer, 2017). En este caso, las nanopartículas de TiO₂ se han modificado principalmente por dopaje con nitrógeno o deposición de metales nobles (Gaminian y Montazer, 2015; Powell y col., 2014; Wu y col., 2013; Xu y col., 2010; Zhang y col., 2014), lo que permite a las nanopartículas semiconductoras una absorción de luz visible, proporcionando propiedades de autolimpieza e hidrofilicidad fotoinducidas por luz visible.

Las nanopartículas de TiO₂ modificadas con ácido tungstofosfórico (TPA) han mostrado una actividad interesante como fotocatalizadores tras la radiación UV y la luz visible (Li y col., 2010; Rengifo-Herrera y col., 2016). Su absorción de luz visible sería inducida por la formación de un complejo de superficie entre los grupos TPA y Ti-OH (Rengifo-Herrera y col., 2016), con potencial para ser utilizadas como materiales autolimpiantes fotoinducidos.

En literatura, se ha descrito el uso de varios sustratos poliméricos para inmovilizar nanopartículas de TiO₂ y sus aplicaciones como superficies autolimpiantes (Li y col., 2016; Zhiyong y col., 2008). Entre ellos, se han informado algunos estudios sobre el uso de quitosano (Q) (Rabea y col., 2003) como sustrato para inmovilizar nanopartículas de TiO₂.

Estos materiales se han utilizado especialmente para la eliminación de contaminantes en el agua, tales como colorantes orgánicos, inactivación de bacterias y como material de apósito para heridas (Afzal y col., 2017; Haldorai y Shim, 2014; Kamal y col., 2016).

El TiO₂ posee capacidad antimicrobiana ya que se observó que la fotocatalisis bajo la luz cuenta con la suficiente energía para producir especies de oxígeno activo (ROS), como $\cdot\text{OH}$, H₂O₂ y O²⁻, que desempeñan un papel clave en la destrucción de las células microbianas (Wang y col., 2016; Zhang y col., 2017). La fotocatalisis de TiO₂ se ha utilizado ampliamente para la eliminación de diversos microorganismos patógenos que contienen bacterias, hongos e incluso virus (Zhang y col., 2013). Matsunaga y col. (1985) informaron por primera vez que las células microbianas de *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Escherichia coli* podían ser destruidas por el TiO₂ bajo irradiación de luz ultravioleta (Zhang y col., 2017). Un efecto sinérgico causado por la producción de especies de oxígeno reactivo fotocatalítico (ROS) inducidas por la luz ultravioleta sobre las superficies de TiO₂, que atacan a las moléculas orgánicas adsorbidas sobre las matrices de TiO₂, y la superhidrofilia que conduce a la dispersión de las gotas de agua es responsable del efecto de autolimpieza observado. Su uso en ambientes interiores es limitado ya que a menudo los dispositivos de iluminación interior emiten longitudes de onda visibles en lugar de UV. Por esta razón, varios estudios han informado la preparación de materiales de autolimpieza de TiO₂ con respuesta en el rango de luz visible (Gaminian y Montazer, 2017; Rengifo-Herrera y col., 2018). Como ya se dijo, el TiO₂, un material de primera generación, es un semiconductor con una energía de banda prohibida de 3.2 eV, por lo que la producción de ROS fotoinducida puede activarse con luz UV de longitud de onda número inferior a 388 nm. Esta energía representa menos del 5% de la irradiación solar total en la superficie de la tierra, lo que limita su uso como material autolimpiante en aplicaciones solares e interiores (Kuo y col., 2007; Pérez-Obando y col., 2019; Verbruggen y col., 2014; Zhang y col., 2017). Las NpTi se han modificado por dopaje con nitrógeno o deposición de metales nobles (Verbruggen y col., 2014), lo que permite a las nanopartículas semiconductoras una absorción en el rango de luz visible, proporcionando propiedades de autolimpieza y superhidrofilia fotoinducidas por luz visible.

Distintos estudios han descrito varios enfoques para desplazar la absorción de luz de TiO₂ hacia la región visible (Etacheri y col., 2015; Li, y col., 2016; Liu y col., 2014; Pérez-

Obando y col., 2019). Asahi y col. (2001) acuñó el término *dopaje con nitrógeno* para nombrar al material basado en TiO_2 dopado con N_2 . Ellos realizaron una pulverización catódica de TiO_2 bajo una atmósfera de N_2/Ar , seguido por un templado en presencia de N_2 y reportaron que el material mostró respuesta a la luz visible.

Existen pocos estudios en la literatura relacionados con el uso de TiO_2 modificado con nitrógeno activo a la luz visible como material autolimpiante. Irie y col. (2003) y Premkumar (2004) descubrieron por primera vez que las matrices delgadas de TiO_2 dopado con N depositadas sobre vidrio recubierto de SiO_2 y preparadas por pulverización catódica mostraron una superhidrofilia inducida por luz visible. Ambos autores sugirieron que la actividad de la luz visible fue causada por el estrechamiento de la banda siguiendo la teoría descrita por Asahi y col. (2001).

Kimiagar y Mohammadizadeh (2013) informaron la síntesis a través de sol-gel de NpTiO_2 dopadas con N a partir de urea como precursor de nitrógeno y luego su inmovilización en vidrio. La actividad fotocatalítica de estos materiales se evaluó mediante fotodegradación UV del colorante azul de metileno en su superficie, encontrando una alta actividad de decoloración. Vaiano y col. (2014) utilizaron cerámicas funcionalizadas con TiO_2 dopado con N y urea como precursor del dopaje a 550°C . Los resultados demostraron que tras la irradiación con UV, el colorante se degradaba rápidamente mientras que con luz azul, la actividad fotocatalítica era menor. Finalmente, Kusano y col. (2017) informaron la preparación de matrices delgadas de TiO_2 dopadas con N sobre sustratos de Si. Algunos estudios han informado que los sustratos poliméricos pueden usarse como soportes de NpTiO_2 y luego evaluarse como superficies autolimpiantes (Fateh y col., 2014; Jie y col., 2016; Wu y col., 2015; Zhiyong y col., 2008).

Los polímeros tendrían un papel fundamental como soporte para las superficies autolimpiantes. Otro aspecto a destacar es que los biopolímeros son en su mayoría compuestos complejos producidos a partir de recursos renovables, como organismos vivos y plantas. Estos materiales altamente atractivos y aplicables participan en sistemas de biociclo que eventualmente permiten la degradación y la reabsorción en la naturaleza. Algunos estudios han descrito el uso de varios sustratos poliméricos para inmovilizar NpTiO_2 y sus aplicaciones como superficies autolimpiantes (Jie Li y col., 2016; Wu y col., 2015; Zhiyong y col., 2008). En este sentido, se han informado el uso del quitosano con

Este fin, encontrándose que la adición de NpTiO_2 mejoraba las propiedades mecánicas de las matrices de los nanocompuestos (Yun y col., 2016; Zhang y col., 2017). En la actualidad, las matrices poliméricas son de interés como herramientas eficientes que poseen grupos funcionales en sus superficies que pueden usarse como sitios de acoplamiento o adsorción para la separación y/o adsorción en muchas aplicaciones (Tasselli y col., 2013; Mafirad y col., 2017). Además, el quitosano se utiliza como un medio de adsorción (matrices o esferas), principalmente por su hidrofilia y reactividad. Los grupos reactivos hidroxilo (-OH) y amino (-NH₂) permiten que se pueda mezclar con otros polímeros, incluyendo celulosa, alcohol polivinílico, entre otros (Salehi y col., 2012; Shen y col., 2017; Sun y col., 2016; Svang-Ariyaskul y col., 2006). La incorporación de nanopartículas a los sustratos de la matriz también es un método común para el fortalecimiento de propiedades intrínsecas en cuanto al desarrollo de matrices biohíbridas (Homayoonfal y col., 2013; Mafirad y col., 2017). Los grupos funcionales pueden unirse fisicoquímicamente a redes de refuerzo inorgánicas y ser capturadas fuertemente en la preparación de la matriz (Al-Sagheer y Muslim, 2010; Mafirad y col., 2017).

Archana y col. (2013) y Chen y col. (2010) demostraron que los nanocompuestos a base de polímeros con nanopartículas de TiO_2 es un excelente material para apósitos para heridas. Recientemente se han estudiado los compuestos de quitosano con nanopartículas de TiO_2 que demostraron poseer buenas propiedades mecánicas, térmicas y fotocatalíticas (Mallakpour y Madani, 2015; Yun y col., 2016; Zhang y col., 2017) y materiales prometedores en varios campos, como la eliminación de contaminantes ambientales mediante adsorción y fotocátalisis (Kamaly col., 2016), conservación de alimentos (Xu y col., 2017), materiales de recubrimiento (Marín-Silva y col., 2019; Qian y col., 2011), sistemas controlados de administración de medicamentos (Kamari y Ghiaci, 2016), reparación de heridas (Fan y col., 2016; Lamarra y col., 2019), biosensores (Chang y col., 2017), etc. Diferentes tipos de rellenos inorgánicos como hidroxiapatita (Venkatesan y Kim, 2010), cementos de fosfato de calcio (Xu y Simon, 2005) y arcilla (Wang y col., 2005), así como algunas nanopartículas que incluyen nanotubos de carbono (Wang y col., 2005), dióxido de titanio (Boricha y Murthy, 2010; Yang y col., 2009), óxido de zinc (Li y col., 2010) y alúmina (Al_2O_3) (Liu y col., 2011; Salehi y col., 2012) se han utilizado con

frecuencia para reforzar matrices de quitosano. El TiO_2 ha sido elegido ampliamente como relleno para refuerzo debido a su bajo precio, estabilidad química, propiedades antibacterianas, etc. (Homayoonfal y col., 2013; Mafirad y col., 2017). Se demostró que la combinación de Q con las NpTiO_2 en materiales compuestos podía dar como resultado matrices e hidrogeles con mayor resistencia a la tracción (Amin, 2012; Mafirad y col., 2017). Archana y col. (2015) observaron diferencias significativas en la resistencia a la tracción de las películas de quitosano-poli (N-vinilpirrolidona) (Q-PVP) con y sin NpTiO_2 (Al-Sagheer y Merchant, 2011; Li y col., 2008).

Las NpTiO_2 modificadas con ácido tungsofosfórico (TPA) han mostrado una actividad como fotocatalizadores tras la radiación con luz UV y visible (Rengifo-Herrera y col., 2018; Rengifo-Herrera y col., 2016). Por lo tanto, las nanopartículas modificadas con TiO_2 -TPA parecen tener potencial para ser utilizadas como materiales autolimpiantes fotoinducidos con luz visible.

5.2 OBJETIVOS

5.2.1 Objetivo general

Diseñar nanoestructuras híbridas autolimpiantes mediante la inmovilización de nanopartículas de dióxido de titanio modificadas con ácido tungstofosfórico en una matriz continua de quitosano estudiando sus propiedades autolimpiantes fotoinducidas usando verde de malaquita.

5.2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar las nanopartículas de dióxido de titanio modificado con ácido tungstofosfórico (NpTi-TPA) obtenidas por el método sol-gel
- Obtener nanoestructuras híbridas mediante la inmovilización de diferentes concentraciones de nanopartículas de dióxido de titanio modificado con ácido tungstofosfórico en una matriz biodegradable de quitosano
- Caracterizar por diferentes técnicas analíticas las matrices obtenidas de quitosano conteniendo distintas concentraciones de nanopartículas de dióxido de titanio
- Evaluar las propiedades autolimpiantes fotoinducidas de las nanoestructuras híbridas en interfases gas sólido sometidas a diferentes longitudes de onda utilizando como molécula objetivo el colorante catiónico verde de malaquita
- Analizar la estabilidad de las nanoestructuras híbridas autolimpiantes mediante el análisis de ciclos de reutilización

5.3 MATERIALES

Las sustancias químicas usadas para sintetizar las muestras basadas en TiO_2 y realizar las pruebas foto-degradación fueron: tetraisopropóxido de titanio (99%, Sigma-Aldrich), urea (99%, Sigma-Aldrich), ácido tungstofosfórico ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ y $90_3; 23\text{H}_2\text{O}$), (99% , Fluka), oxalato verde de malaquita (VM) (99%, Sigma-Aldrich), etanol (Merck, grado absoluto), HCl (37%, Carlo Erba), nanopulvos de TiO_2 P-25 (Evonik), ácido acético glacial (Carlo Erba) y quitosano al 1% (p/v).

5.4 METODOLOGÍA

5.4.1 Síntesis de nanopartículas de dióxido de titanio modificado con ácido tungstofosfórico (TPA- TiO_2).

La síntesis de las nanopartículas de TiO_2 modificadas con ácido tungstofosfórico (TPA) fue llevada a cabo en el Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias Aplicadas "Dr. Juan N. Ronco". La síntesis se llevó a cabo siguiendo la metodología detallada por [Rengifo-Herrera y col. \(2018\)](#).

El tetraisopropóxido de titanio ($\text{C}_{12}\text{H}_{28}\text{O}_4\text{Ti}$) (26.7 g), usado como agente precursor, se mezcló con etanol absoluto (186.6 g) y se agitó durante 10 minutos bajo atmósfera de nitrógeno N_2 a temperatura ambiente hasta obtener una solución homogénea. Luego, se vertieron lentamente 0.33 ml de solución acuosa de HCl 0.28 M en la mezcla anterior para catalizar la reacción sol-gel y se dejó reposar durante 3 h. Después de eso, se agregaron 120 g de solución de urea-alcohol-agua (relación 1:5:1 en peso) a la solución hidrolizada bajo agitación, para actuar como plantilla, junto con una solución de etanol de $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40} \cdot 23\text{H}_2\text{O}$ (TPA).

La cantidad de solución de TPA incorporada se fijó con la finalidad de obtener una concentración en peso del 30%, que resultaron los materiales con actividad fotocatalítica más alta con radiación UV o con luz visible. Los sólidos se molieron hasta formar un polvo y se extrajeron con agua destilada durante tres períodos de 24 h para remover la urea, en un sistema con agitación continua. Finalmente, los sólidos se calcinaron a 500°C durante 2 h, dando como resultado nanopartículas de dióxido de titanio modificadas con ácido tungstofosfórico (TiO_2 -TPA).

En la Figura 5.4 se muestra el diagrama del procedimiento para la síntesis de las nanopartículas de TiO_2 modificadas con TPA:

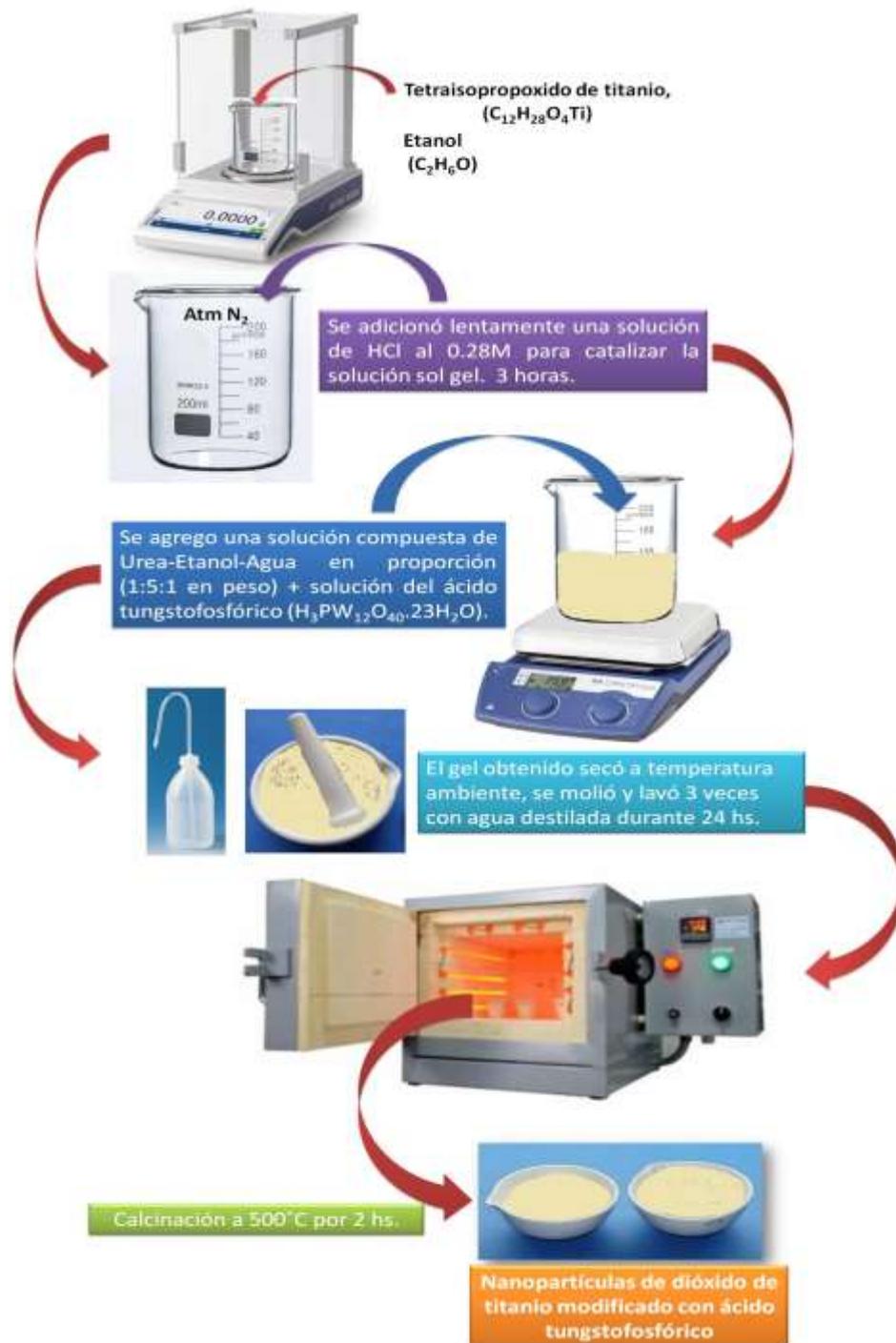


Figura 5.4. Síntesis de nanopartículas dióxido de titanio modificado con ácido tungstofosfórico (TPA-TiO₂). Adaptado de Rengifo-Herrera y col. (2011).

5.4.2 Obtención de matrices QT_i y QP-25

Se preparó una solución de quitosano (Q) al 1% (p/p) por solubilización en solución de ácido acético al 1% (v/v) como se describió en trabajos anteriores de [Lamarra y col. \(2017\)](#). Las nanopartículas se sonicaron con la mitad del volumen de la solución de quitosano hasta su completa homogenización manteniendo la muestra en un baño de hielo y agua. Luego se completó con la solución hasta 100 ml y se homogenizó por 24 h en agitador magnético para no desprotonar los grupos laterales del Q. Diferentes proporciones de nanopartículas de TiO₂ modificadas con TPA se dispersaron en la solución de quitosano para obtener relaciones de nanopartículas a Q 10, 20 y 30 % (p/po).

Posteriormente las soluciones fueron colocadas en cajas de Petri a 38°C, para su secado en estufa de convección forzada durante 72 horas hasta alcanzar peso constante. El mismo procedimiento se realizó con las nanopartículas de NpTiO₂ comercial (P-25) que contenían una concentración de 30 % p/p del semiconductor. En lo sucesivo, las nanoestructuras híbridas obtenidas se denominarán QT_i_x, donde x representa la concentración de TiO₂. Se siguió el mismo procedimiento para preparar matrices de quitosano conteniendo 30% (p/p) de nanopartículas comerciales Degussa P-25 (QP-25₃₀).

Tabla 5.1. Matrices a base de quitosano conteniendo distintas concentraciones de NpTi modificadas con ácido tungstofosfórico (TPA). El contenido de NpTi está expresado en % g/g quitosano y en % g/v solución

Películas	Contenido de NpTi	
	% (p/p _Q)	% (p/v)
Q	0	0
QT _i ₁₀	10	0.1
QT _i ₂₀	20	0.2
QT _i ₃₀	30	0.3
Q-P25 ₃₀	30	0.3

5.4.3 Caracterización de las muestras

Espectroscopía de reflectancia difusa (DRS)

Los espectros de reflectancia difusa de los materiales se registraron utilizando un espectrofotómetro Lambkin 35, Perkin Elmer UV-vis, al que se adjuntó una cámara de reflectancia difusa Labsphere RSA-PE-20 con una esfera integradora de 50 mm de diámetro y un espectro interno en el recubrimiento. El equipo se calibró con un standard Spectralon (Labsphere SRS-99-010, 99% de reflectancia). Los espectros de absorción fueron registrados en el intervalo de longitudes de onda de 250 a 800 nm (Rengifo-Herrera y col., 2018).

Difracción de rayos X (DRX)

Los patrones de difracción de rayos X de las muestras se registraron utilizando un equipo Philips PW 1732 con un registrador incorporado y radiación $\text{CuK}\alpha$, filtro de níquel, 20 mA y 40 kV en la fuente de alto voltaje y ángulo de exploración entre 5 y 60° de 2θ a una velocidad de escaneo de 1° por minuto.

Microscopía electrónica de barrido con espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (SEM-EDS)

Las muestras de nanopartículas de TiO_2 modificadas con TPA y las películas a base de Q se analizaron por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM) utilizando un equipo Philips 505 y un FEI QUANTA 200. La observación de la sección transversal de las películas se realizó sobre películas criofracturadas preparadas por inmersión en N_2 líquido. Las muestras se adhirieron a soportes de bronce usando cinta de fibra de grafito y posteriormente se les aplicó un recubrimiento de oro.

El análisis de rayos X dispersivo de energía (EDS) de las muestras se realizó usando un analizador EDAX 9100 con un potencial de trabajo de 15 kV.

Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier de reflectancia total atenuada (ATR-FTIR)

Estas mediciones se llevaron a cabo utilizando un espectrómetro FT-IR Perkin-Elmer equipado con un accesorio ATR. Los espectros se registraron utilizando 1024 escaneos con una resolución de 4 cm^{-1} .

5.4.4 Experimentos de fotodegradación

Los tratamientos de fotodegradación se realizaron para estudiar la capacidad autolimpiante de los materiales obtenidos. Se evaluó la pérdida de color de una mancha del colorante verde de malaquita que pertenece a la familia de los colorantes trifenilmetanos.

Para llevar a cabo los experimentos se usaron portaobjetos de 2 x 2 cm de nanocompuestos QTi_{xx} (xx=10, 20 y 30%) y QP-25₃₀. Luego se añadieron 80 μ L de solución etanólica de verde malaquita (VM) (1×10^{-4} M) sobre cada muestra y se secó a temperatura ambiente durante 1 h. La irradiación se realizó usando una lámpara Xe-Arc de 200 W (Newport, USA) como fuente de luz, que emite una radiación promedio estimada de $3.6 \text{ mW m}^{-2} \text{ nm}^{-1}$.

Este sistema está equipado con filtros de corte de vidrio (Newport, EE. UU.) para lograr la irradiación con diferentes longitudes de onda: UV-A + Visible: filtro de corte $\lambda > 320 \text{ nm}$, Vis⁻¹: filtro de corte $\lambda > 450 \text{ nm}$ y Vis⁻²: filtro de corte $\lambda > 590 \text{ nm}$ (Figura 5.5). La emisión UV-A se midió utilizando un medidor de luz UV Lutron YK-35UV que proporciona un valor de 35 W m^{-2} . Los espectros de verde de malaquita (VM) fueron seguidos por medio de DRS. La evolución de la banda de absorción principal del colorante VM (624 nm) fue registrada en función del tiempo de irradiación por DRS.

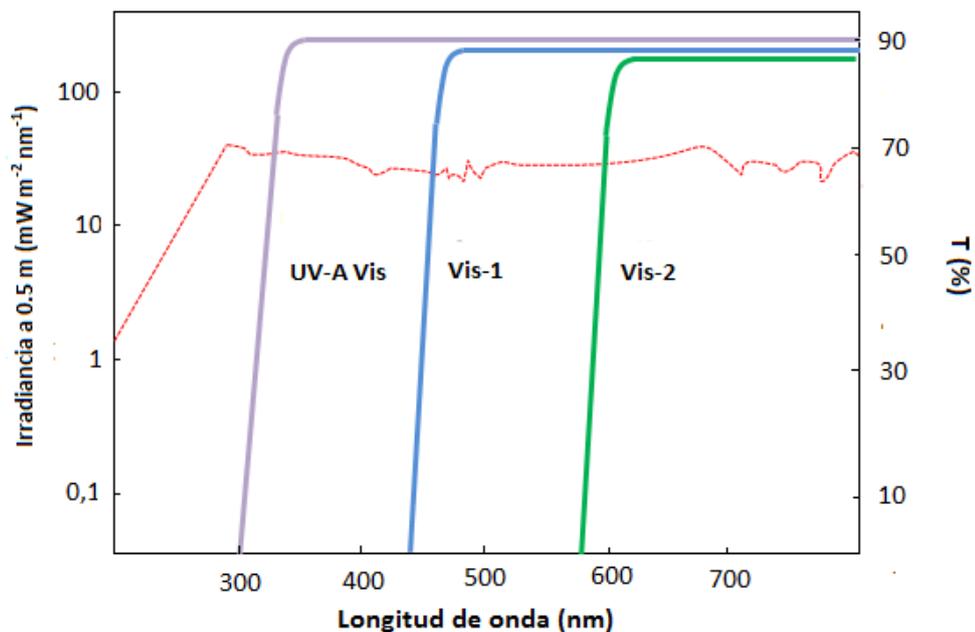


Figura 5.5. Espectro de emisión de la lámpara Xe y transmitancia de los filtros de vidrio.

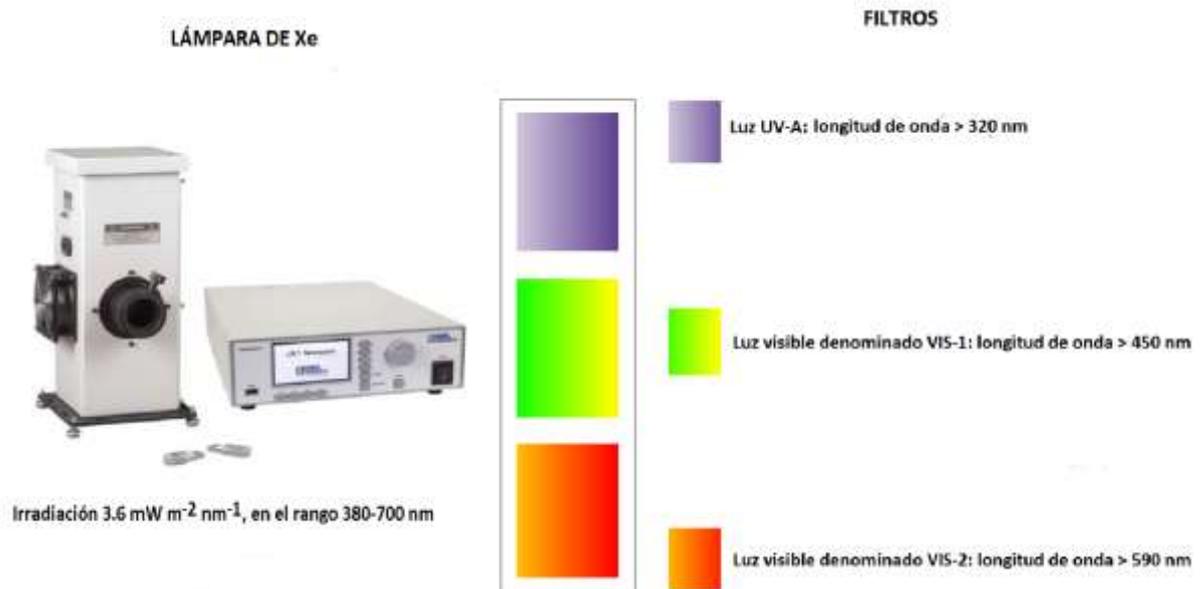


Figura 5.6. Lámpara de Xenón y filtros de UV-A y de luz visible para la irradiación de las matrices desarrolladas. Adaptado de [Mendoza-Portillo \(2018\)](#).

Las matrices estudiadas fueron sometidas a irradiación con la lámpara de Xe durante 6 h a una distancia aproximada de 20 cm.

En la [Figura 5.6](#) se observa el proceso de fotodegradación de la mancha del colorante monitoreando la banda de absorción máxima de luz del colorante ubicada a 624 nm. También se siguió a través de secuencias fotográficas y por medio de reflectancia difusa (DRS).

5.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.5.1 Caracterización de las nanopartículas por microscopía electrónica

Las imágenes obtenidas por SEM (Figura 5.7) revelaron que estos materiales consistieron en partículas esféricas con un diámetro medio de unos 200 nm. Sin embargo, cuando la imagen se magnificó (inserto Figura 5.7a y 5.7b) se observó que las partículas se formaron por la agregación de partículas cúbicas propias de la fase anatasa. Este efecto fue inducido por la presencia de urea que produce la sinterabilidad de las partículas primarias (Vargas-Urbano y col., 2011). De acuerdo a lo estudiado por Afzal y col. (2017) y Kamal y col. (2016), la descomposición de urea en solución acuosa durante la síntesis de sol-gel podría producir un leve aumento del pH, que conduce a la formación de nanopartículas de TiO_2 con un morfología controlada.

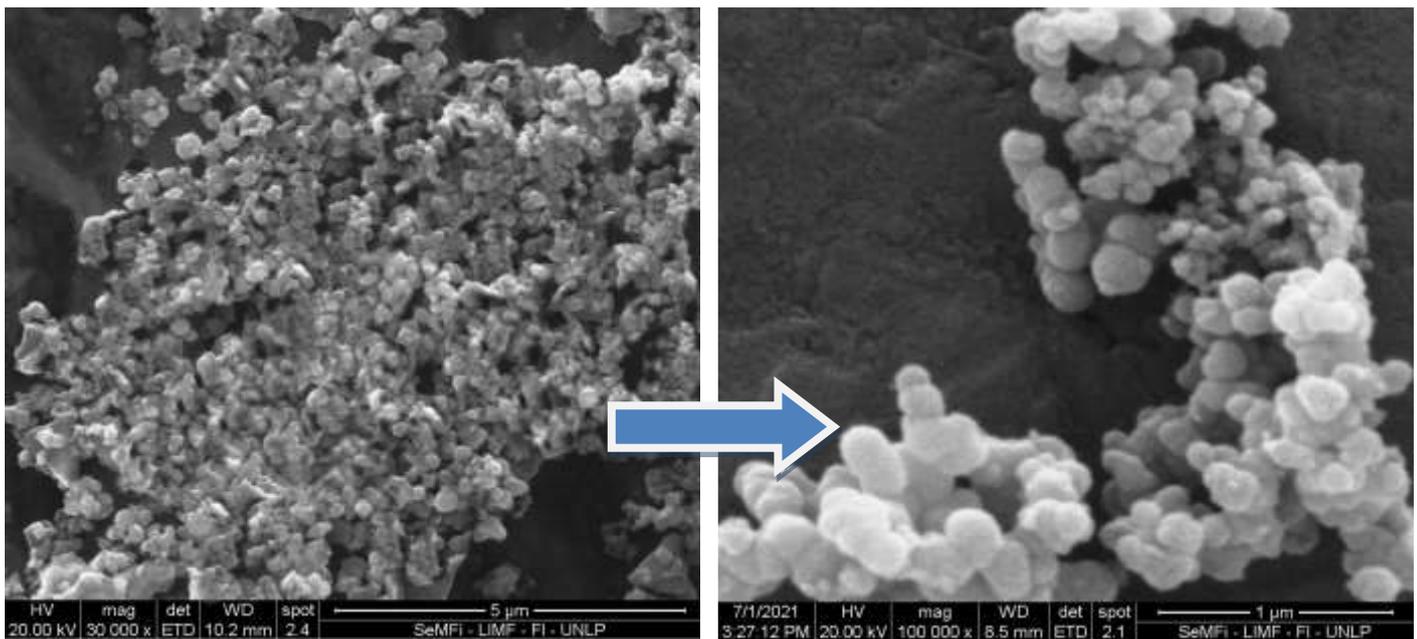


Figura 5.7. Micrografías obtenidas por SEM mostrando nanopartículas NpTi modificadas con TPA. El aumento se muestra en cada micrografía

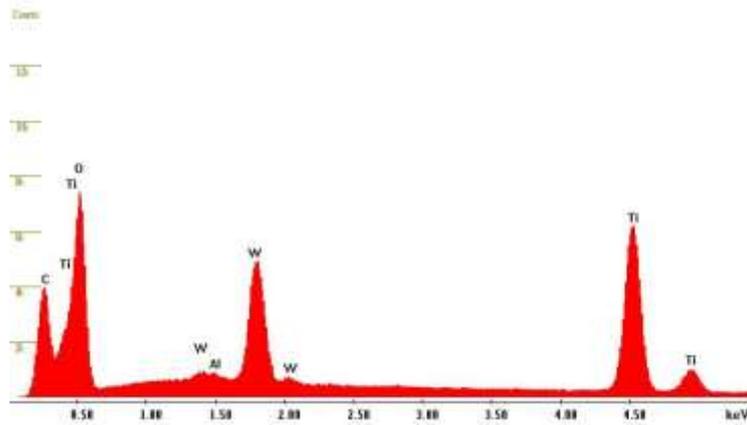


Figura 5.8. Espectro EDS de nanopartículas de TPA-TiO₂ obtenidas por calcinación a 500°C.

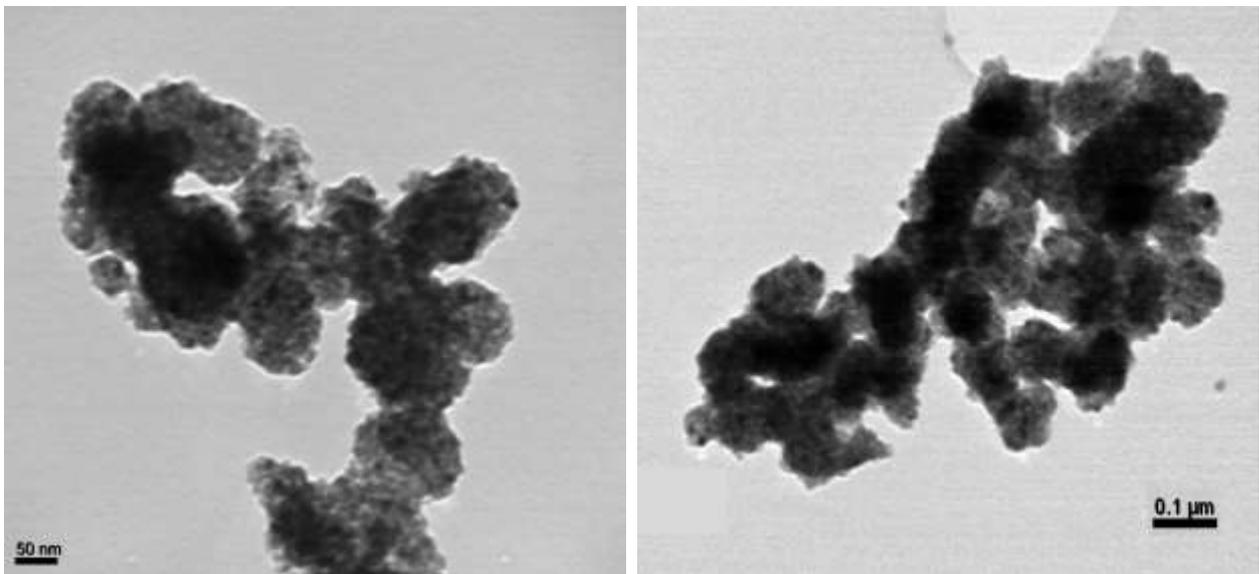


Figura 5.9. Micrografías obtenidas por TEM de nanopartículas de TiO₂ modificadas con TPA. El aumento se indica en cada micrografía.

El espectro EDAS indicó la presencia de Ti, O y C en la muestra pero no mostró N posiblemente debido a la baja concentración que impidió su detección (Figura 5.8). El Ti se presentó a 4.59 keV.

La Figura 5.9 exhibe las imágenes obtenidas por TEM de las muestras calcinadas a 500°C. Se observó un aglomerado oscuro de nanopartículas que contrasta levemente con una red tridimensional que las rodea, probablemente debido a la presencia de urea/TPA. Las dimensiones de las nanopartículas estuvieron en el rango entre 35 y 60 nm. Similares resultados fueron informados por El-Mekkawi y col. (2017) y Luna-Flores y col. (2017).

En un trabajo anterior, se encontró que la estructura cristalina de nanopartículas de TiO_2 que contenían TPA y habían sido calcinadas a 500°C se correspondió principalmente con anatasa. Las principales propiedades texturales y fisicoquímicas de las nanopartículas de TiO_2 se informaron previamente (Rengifo-Herrera y col., 2011). Su caracterización por múltiples técnicas reveló la formación de luz visible que absorbe TiO_2 en longitudes de onda que oscilan entre 400 y 500 nm. Este hecho fue asignado a la generación de complejos de superficie entre los aniones Keggin de TPA y TiO_2 a través de la formación de enlaces Ti-O-W (Lu y col., 2012; Rengifo-Herrera y col., 2016).

5.5.2 Tamaño de las nanopartículas por DSL

El diámetro de las NpTi obtenido a través de DLS dio una distribución centrada en 276 nm, valor un poco superior al observado por TEM probablemente debido a la agregación que experimentan las nanopartículas (Figura 5.10).

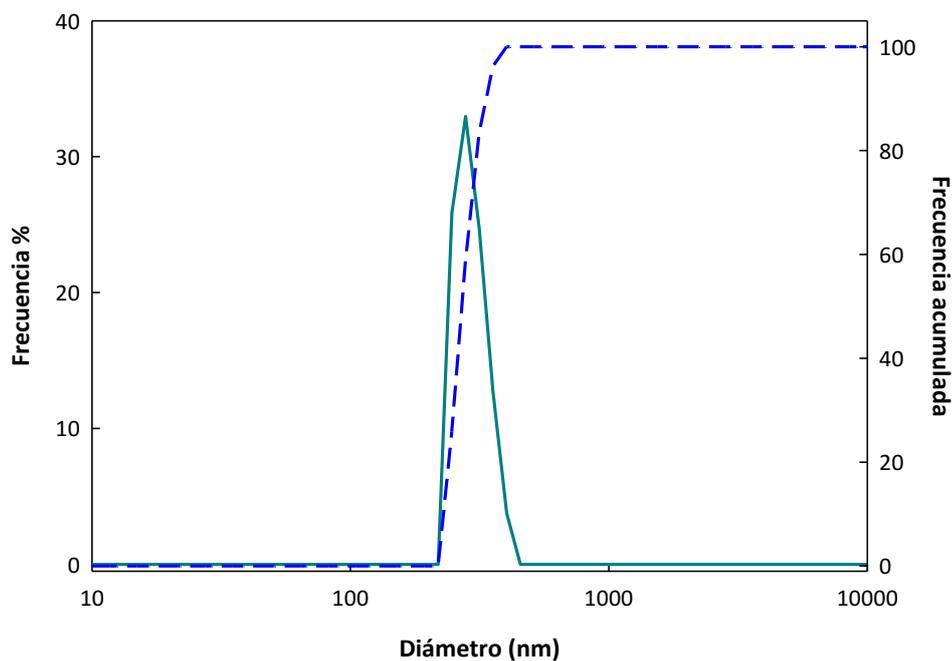


Figura 5.10. Perfil de distribución de tamaño de las nanopartículas TPA- TiO_2 mostrando la frecuencia % y la frecuencia acumulada.

Los espectros de reflectancia difusa UV-vis (DRS) de las nanopartículas se presentan en la Figura 5.11. Las nanopartículas de TPA- TiO_2 presentaron absorción de luz UV a

longitudes de onda inferiores a 400 nm, que es típico de la fase anatasa correspondientes a la transferencia de carga desde la banda de valencia (O 2p) a la banda de conducción (Ti 3d). Además, se observó un hombro pequeño entre 400 y 500 nm relacionado con la presencia de complejos de superficie TPA-TiO₂.

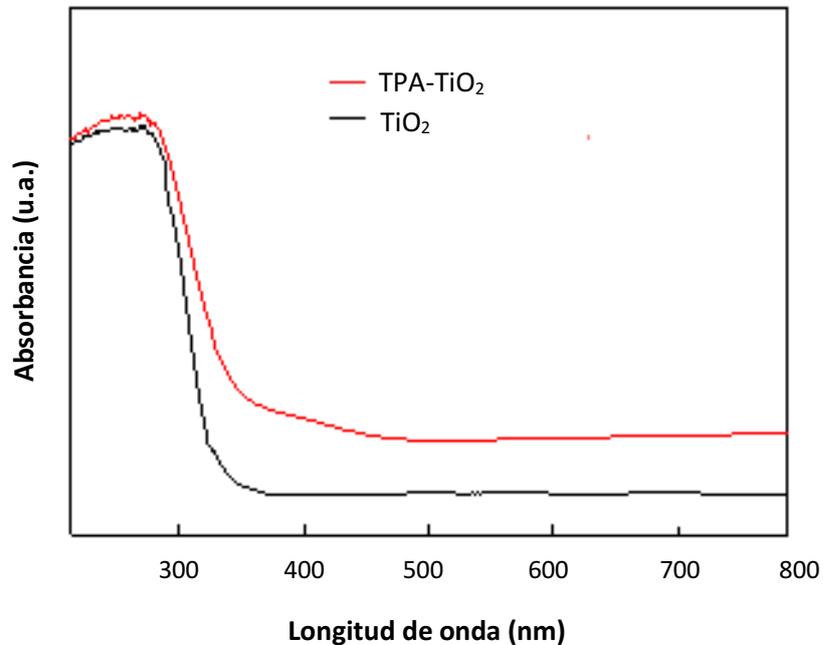


Figura 5.11. Espectros de reflectancia difusa UV-Vis (DRS) de nanopartículas de TiO₂ y TiO₂ modificadas con ácido tungstofosfórico (TPA-TiO₂).

5.5.3 ATR-FTIR de nanopartículas TPA-TiO₂

El espectro ATR-FTIR de las nanopartículas de TiO₂ mostró una banda ancha centrada en 3405 cm⁻¹ que se asignó a la interacción de grupo OH de las moléculas de agua con la superficie de TiO₂. El pico a 1650 cm⁻¹ se relaciona con la vibración de flexión característica del grupo -OH (Figura 5.12).

La estructura Keggin de TPA consta de un tetraedro de fosfato rodeado por un octaedro de WO₆. Las bandas características a 1633 cm⁻¹ y 1070 cm⁻¹ se deben a la flexión O-H y el estiramiento P-O del tetraedro central. Los picos de absorción en 973 cm⁻¹ se puede asignar a la vibración de estiramiento W=O del oxígeno terminal en la estructura de Keggin (Pérez-Obando y col., 2019; Rengifo-Herrera y col., 2016).

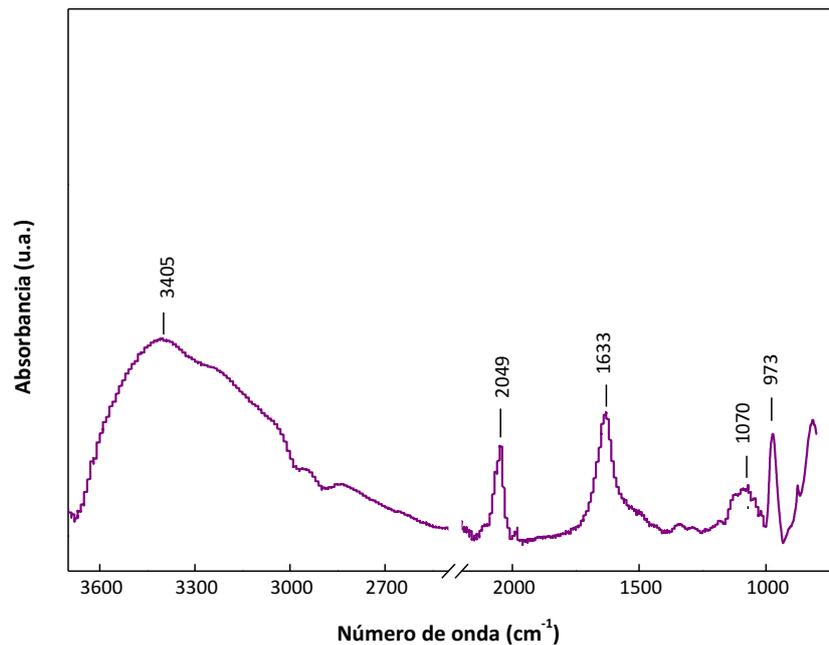


Figura 5.12. Espectro de absorción ATR-FTIR de nanopartículas de TiO_2 modificadas con ácido tungstofosfórico (TPA).

5.5.4 Análisis superficial por espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS)

Para analizar las especies que están presentes en la superficie del material se realizó un análisis XPS en las muestras que contenían TPA (Figuras 5.13a y b, respectivamente). La Figura 5.13 muestra las señales O 1s y Ti 2p para todos los materiales. La señal O 1s reveló la presencia de un pico a 531 eV debido a los enlaces Ti-O y Ti-OH típico del TiO_2 . El espectro O 1s se pudo ajustar mediante dos picos ubicados a 530 y 532 eV atribuidos a interacciones Ti-O y Ti-OH, respectivamente.

Las señales Ti 2p mostraron un doblete a 459 y 465 eV, que corresponden a los picos Ti 2p_{3/2} y Ti 2p_{1/2}, respectivamente. La brecha entre las líneas Ti 2p_{3/2} y Ti 2p_{1/2} es 5.8 eV, lo que sugiere la existencia del estado de oxidación Ti^{+4} (Gao y col., 2017). Los materiales que contenían TPA revelaron la presencia de picos W 4f y P 2p (Rengifo-Herrera y col., 2011). No se encontraron picos que respondieran a la especie N.

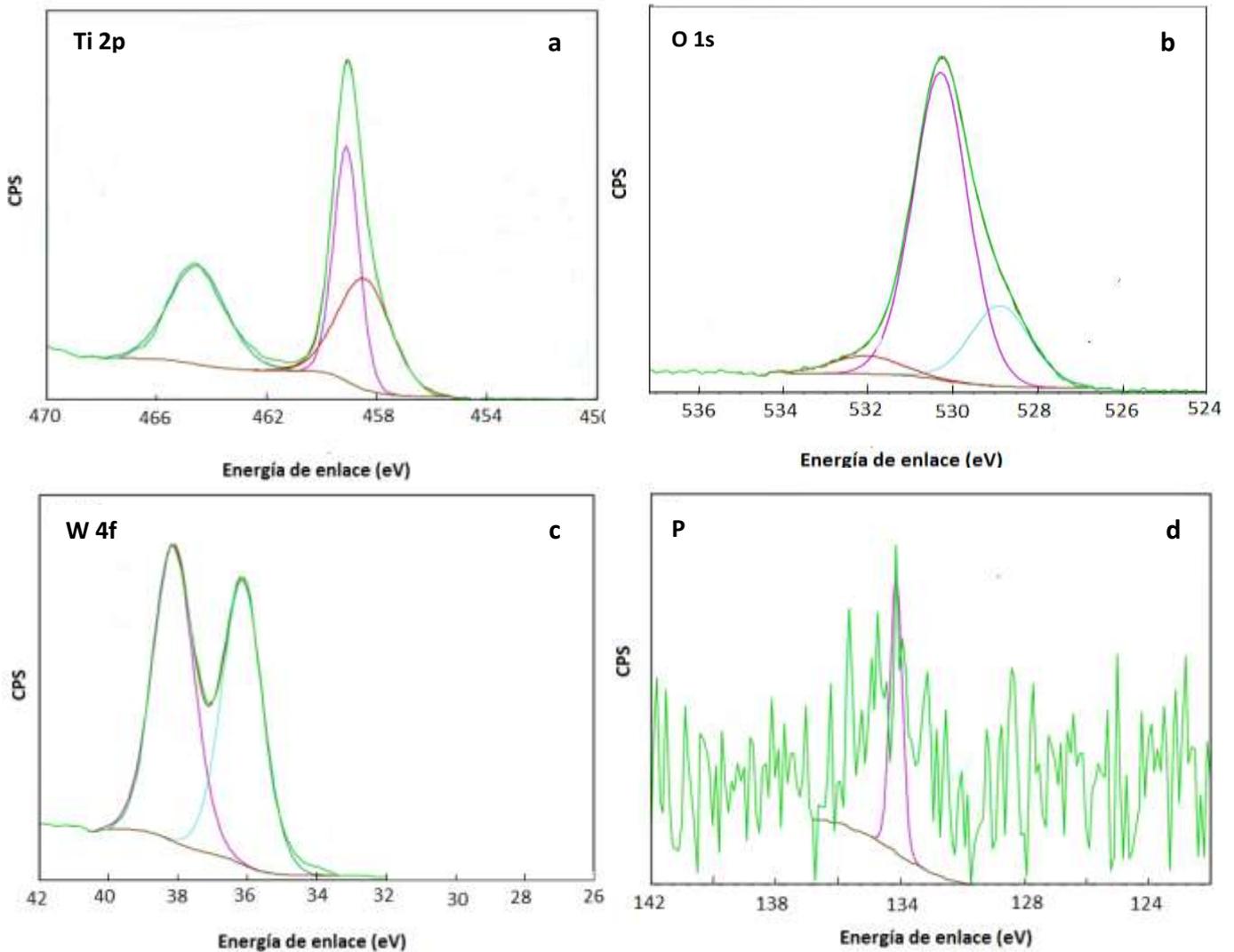


Figura 5.13. Espectro de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS) de nanopartículas de TiO_2 modificadas con ácido tungstofosfórico (TiO_2 -TPA): Ti 2p (a), O 1s (b), W 4f (c) y P 2p (d). Cortesía de Rengifo-Herrera y col. (2011).

El TPA presentó un señal W 4f con un doblete a 35.8, 36.2 y 38.2 eV. El primero asignado a W 4f_{7/2} (Kumbar y col., 2006) es generado por fotoelectrones emitidos por átomos de tungsteno con un estado de oxidación de ⁺⁶.

El otro pico a 38.2 eV fue atribuido a W 4f_{5/2}, mientras que la brecha de energía entre los dos picos de W 4f_{7/2} y W 4f_{5/2} fue aproximadamente 2 perteneciente al tungsteno en estado de valencia W⁺⁶. Por otro lado, se detectó un pico débil de P 2p debido a la presencia de P⁵⁺ localizado a la misma energía de enlace asignada a P⁵⁺ presente en el seno de TPA (134.2 eV) (Hathway y col., 2009; Kumbar y col., 2006; Rengifo-Herrera y col., 2011).

5.5.5 Caracterización de los nanocompuestos QT_i

Las películas de quitosano y los nanocompuestos QT_i mostraron absorción UV a longitudes de onda inferiores a 400 nm, exhibiendo características de absorción de luz típicas de las nanopartículas de TPA-TiO₂ y del quitosano (Figura 5.14). No se observaron diferencias significativas entre las curvas correspondientes a diferentes concentraciones de TiO₂ y consecuentemente los valores de separación de banda (gap) obtenidos usando la teoría de Kubelka-Munk (Ebraheem y El-Saied, 2013) fueron muy similares en el rango 3.37–3.41 eV.

Por otro lado, al aumentar el contenido de nanopartículas de TPA-TiO₂ en películas QT_i, el hombro ubicado a 370 nm se fue haciendo menos visible con características de absorción de luz semejantes a las nanopartículas de TPA-TiO₂.

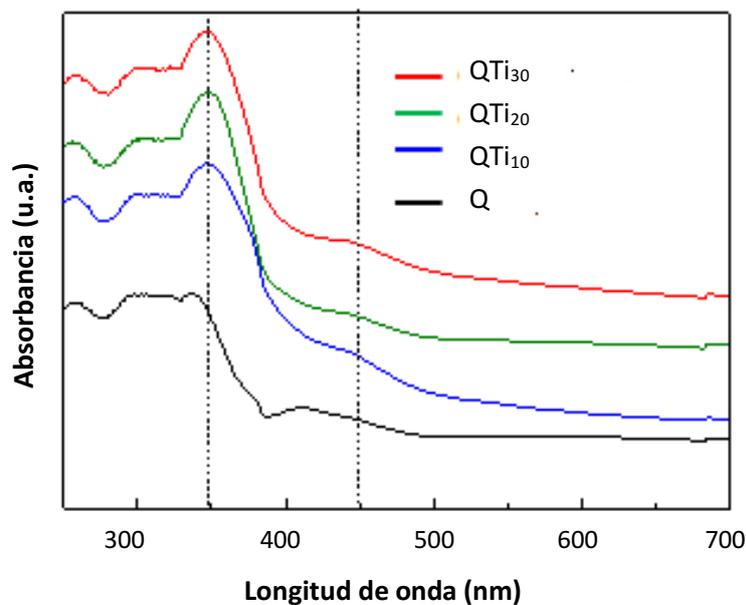


Figura 5.14. Espectro de absorción obtenido por DRS de la película Q y de los nanocompuestos a base de Q cargados con nanopartículas de TiO₂ modificadas con ácido tungstofosfórico (TiO₂-TPA).

5.5.6 Propiedades fisicoquímicas de las matrices de QT_i

En la Tabla 5.2 se muestran los valores de la humedad, solubilidad y permeabilidad al vapor de agua (WVP) de películas a base de quitosano con incorporación de

concentraciones crecientes de nanopartículas de TiO₂ modificadas con ácido tungstofosfórico (TPA).

El porcentaje de humedad de las matrices aumentó con respecto al Q control ($p < 0.05$) pero no se observaron diferencias significativas entre las formulaciones QT_i ($p > 0.05$). Este fenómeno se explicaría ya que los sitios molecularmente no activos o huecos pueden estar ocupados por las moléculas de agua con interacciones con las cadenas laterales del quitosano. Mientras que el oxígeno de la molécula de agua forma un enlace dativo con un átomo de la superficie de Ti, el resto del par de electrones y los OH de la monocapa de agua se orientan en la capa superficial (Dette y col., 2018). Una mezcla de H₂O molecular y OH se une al Ti en la capa de contacto (Nadeem y col., 2018).

Por otro lado, el porcentaje de solubilidad de la matriz de Q control fue de 52.2 %, un valor que correspondió a una matriz con gran afinidad por el agua. Comparada con la película control, la solubilidad de los nanocompuestos sufrió una significativa reducción de aproximadamente 50%, en promedio, después de la adición de las NpTi ($p < 0.05$) Sin embargo no se observaron diferencias entre los nanocompuestos independientemente de la proporción de TiO₂ incorporada ($p > 0.05$)

En sentido contrario, Li y col. (2018) demostraron la disminución de la afinidad por el agua de películas orgánicas al ser ensambladas con nanopartículas de SiO₂ y TiO₂.

Por otra parte, la hidrofiliidad de las moléculas de quitosano conduce a pobres propiedades de barrera. La WVP de las matrices funcionalizadas disminuyó con respecto al control pero la diferencia solo resultó significativa con la adición del 10 y 20% de NpTi (Figura 5.15 y Tabla 5.2). En la literatura, trabajos previos indicaron que la resistencia de las películas a la transferencia al vapor de agua estaba estrechamente relacionada con la tortuosidad generada en la microestructura de la matriz (Li y col., 2010).

Los resultados fueron consistentes con estudios sobre la incorporación de nanopartículas de TiO₂ a una película de gluten/nanocelulosa para disminuir los valores de WVP (El-Wakil y col., 2015). La tendencia también fue observada por Zolfi y col. (2014), trabajando con películas de proteína de suero/ kefirán con incorporación de NpTi.

La mejora de la resistencia al agua como resultado de la adición de TiO_2 se puede explicar debido a la menor hidrofiliidad de las nanopartículas en relación al quitosano, lo que sugiere la formación de una estructura reticulada con mayor tortuosidad.

Tabla 5.2. Propiedades físicas de las matrices las distintas matrices formuladas a base de quitosano y nanopartículas de TiO_2 modificadas con TPA

Matriz	Humedad (%)	Solubilidad (%)	Hinchamiento (%)	WVP ($\times 10^{11} \text{ g.m}^{-1}.\text{s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$)
Q	18.1 (1.3) ^a	52.2 (3.1) ^b	370 (23) ^b	6.5 (0.1) ^c
QTi ₁₀	22.9 (1.5) ^b	25.8 (2.0) ^a	1156 (48) ^c	4.4 (0.3) ^a
QTi ₂₀	25.2(0.5) ^b	26.6 (1.8) ^a	437 (5) ^b	5.5 (0.6) ^b
QTi ₃₀	25.7 (0.1) ^b	24.2 (2.2) ^a	142 (14) ^a	6.0 (0.4) ^{b,c}

^aDistintos superíndices en una misma columna indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$).

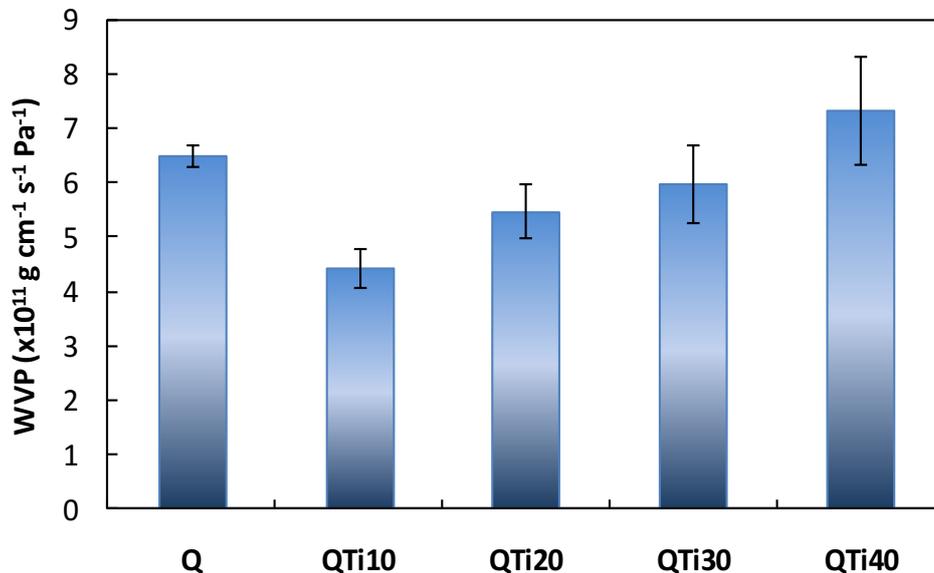


Figura 5.15. Propiedades de barrera al vapor de agua (WVP) de las distintas matrices formuladas a base de quitosano y nanopartículas de TiO_2 modificadas con TPA.

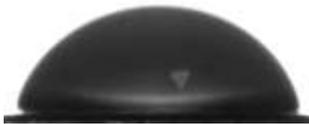
5.5.7 Ángulo de contacto

El ángulo de contacto se usa como indicador del grado de hidrofilia de la superficie de las matrices. Como es bien conocido, ángulos de contacto más altos se identifican con superficies hidrófobas. Como se observa en la [Tabla 5.3](#), para los nanocompuestos con mayor proporción de nanopartículas (QTi₂₀ y QTi₃₀), los valores del componente disperso fueron mayores que el componente polar, lo que indica propiedades de una superficie más hidrofóbica. La película de quitosano tiene la polaridad más alta entre los sistemas seleccionados porque tiene el componente polar más alto de su energía libre de superficie. Sin embargo, para los materiales compuestos, los valores del componente dispersivo son mucho mayores que los del componente polar, lo que indica principalmente propiedades superficiales hidrófobas. Este comportamiento indica que hay menos interacciones entre los grupos reactivos de quitosano en el compuesto. Así, los grupos funcionales de los polímeros quedaron ocultos debajo de la película superficial ([Lewandowska, 2015](#)).

De acuerdo a [El-Wakil y col. \(2015\)](#), los resultados indicaron que el aumento de la cantidad de TiO₂ tendió a evitar la extensión o propagación de las gotas de agua sobre la superficie de la película debido a un aumento de la hidrofobicidad de la misma.

Los ángulos de contacto con valores más bajos como los casos de las matrices Q y QTi₁₀ demostraron una atracción más fuerte agua-película, por lo tanto, la adhesión fue mayor ([Romero-Bastida y col., 2016](#)) con la polaridad más alta entre los sistemas estudiados. La matriz de Q control presentó un ángulo de contacto de 72.75°, en acuerdo con lo expuesto por distintos autores que informaron valores similares, estableciendo que el ángulo es dependiente de la relación Q:H₂O empleada para su síntesis ([Lewandowska, 2015](#); [Sivaselvi y Ghosh, 2017](#)).

Tabla 5.3. Angulo de contacto de las matrices de QTi_{xx}, con NpTi modificadas con ácido tungstofosfórico (TPA). xx=10, 20, 30

Q	QTi ₁₀	QTi ₂₀	QTi ₃₀
			
72.8° (1.8) ^{a,b}	70.3° (2.6) ^a	77.1° (4.4) ^b	78.1° (3.1) ^b

^aDistintos superíndices indican diferencias significativas entre las muestras (p<0.05).

5.5.8 Parámetros de color

Los valores de los parámetros de color no presentaron diferencias significativas entre las formulaciones con TiO₂ (p>0.05). Se muestran los valores de quitosano porque la fase continua de las matrices nanocompuestas se formuló con este polímero (Tabla 5.4). Sin embargo, la comparación con los valores de películas Q no sería pertinente ya que mientras el quitosano fue transparente las matrices nanocompuestas resultaron opacas. Todas las medidas se llevaron a cabo sobre el patrón blanco.

Además de la diferencia total de color, otro parámetro que se calculó es el índice de blancura (IB) a través del uso de la siguiente ecuación (Zhang y col., 2019):

$$IB=100-\sqrt{(100-L^*)^2+a^{*2}+b^{*2}}$$

Tabla 5.4 Parámetros de color de las matrices formuladas a base de quitosano

Muestra	L*	a*	b*	ΔE*	IB
Q	89.5 (0.5) ^b	-1.4 (0.1) ^b	11.9 (0.2) ^a	11.8 (0.6) ^a	15.3 (0.5) ^a
QTi ₁₀	82.9 (1.1) ^a	-5.1 (0.7) ^a	34.1 (1.0) ^b	35.8 (1.5) ^b	38.5 (1.3) ^b
QTi ₂₀	82.2 (1.6) ^a	-3.7 (0.1) ^a	31.3 (0.9) ^b	33.4 (0.9) ^b	36.2 (0.9) ^b
QTi ₃₀	81.5 (1.8) ^a	-4.6 (0.1) ^a	29.0 (0.3) ^b	31.9 (1.2) ^b	34.7 (2.3) ^b

^aDistintos superíndices en una misma columna indican diferencias significativas entre las muestras (p<0.05).

5.5.9 Propiedades mecánicas

Las curvas esfuerzo-deformación de las películas de Q control mostraron el patrón mecánico típico de un material dúctil. La inclusión de 0.1 % (p/v) de TiO₂ provocó un refuerzo mecánico de las matrices de quitosano (Figura 5.16) mientras la extensibilidad disminuyó al 6% debido a las interacciones de las nanopartículas con la matriz de Q actuando como refuerzo de la matriz polimérica. Las interacciones implicaron uniones tipo puente de hidrógeno o unión de O-Ti-O que también que pudo contribuir al aumento de las propiedades de tracción de las películas nanocompuestas (Zhou y col., 2009).

Por otra parte, analizando el comportamiento mecánico de las formulaciones con mayor proporción de NpTi, los resultados del ensayo de tensión permitieron determinar que a partir de una concentración de 0.2 % (p/v) de nanopartículas, el esfuerzo a la tracción experimentó una disminución significativa ($p < 0.05$) y la elongación porcentual aumentó, fenómeno que se acentuó en presencia de concentraciones crecientes de nanopartículas (Tabla 5.5). Con una concentración de 0.4%, la elongación alcanzó 2.5 veces el valor de QT₁₀.

El fenómeno anterior puede ser explicado desde diferentes perspectivas. Por un lado, las nanopartículas de TiO₂ juegan un papel en la unión física de las películas compuestas mejorando sus propiedades mecánicas; por otro lado, la regularidad de la estructura de la red y las propiedades de la película se debilitarían debido a la agregación de nanopartículas. Este resultado es consistente con los obtenidos por El-Wakil y col. (2015) que encontraron que la adición nanopartículas de TiO₂ a películas de zeína/ quitosano aumentó el esfuerzo, mientras que un aumento adicional de TiO₂ nanopartículas dio lugar a una disminución del mismo. Similares resultados fueron informados por Norranattrakul y col. (2013) trabajando con películas compuestas quitosano-TiO₂. Asimismo, de Moura y col. (2009) encontraron que las nanopartículas ocupan el espacio vacío de la matriz activa produciendo cambios en las propiedades mecánicas de la misma.

Según lo expresado por Zhou y col. (2009) y Zolfi y col. (2014), este fenómeno se debería a la mayor hidrofobicidad del TiO₂ en relación a las moléculas de quitosano y por lo tanto a la tendencia a agregarse cuando se alcanza cierta concentración para reducir la disipación de energía en el sistema, lo que fue confirmado por los resultados de SEM, AFM y XRD. La agregación produjo una discontinuidad en los dominios de quitosano

amorfo y por lo tanto un deterioro en las propiedades de tracción de las películas funcionalizadas.

En el caso de QT_{i30}, el esfuerzo alcanzó un valor máximo de 52.5 MPa y la elongación 8.2 %, mientras que para la matriz de Q control presentó una mayor elongación del 8.2% pero a su vez un menor esfuerzo de 51.7 MPa (Figura 5.16).

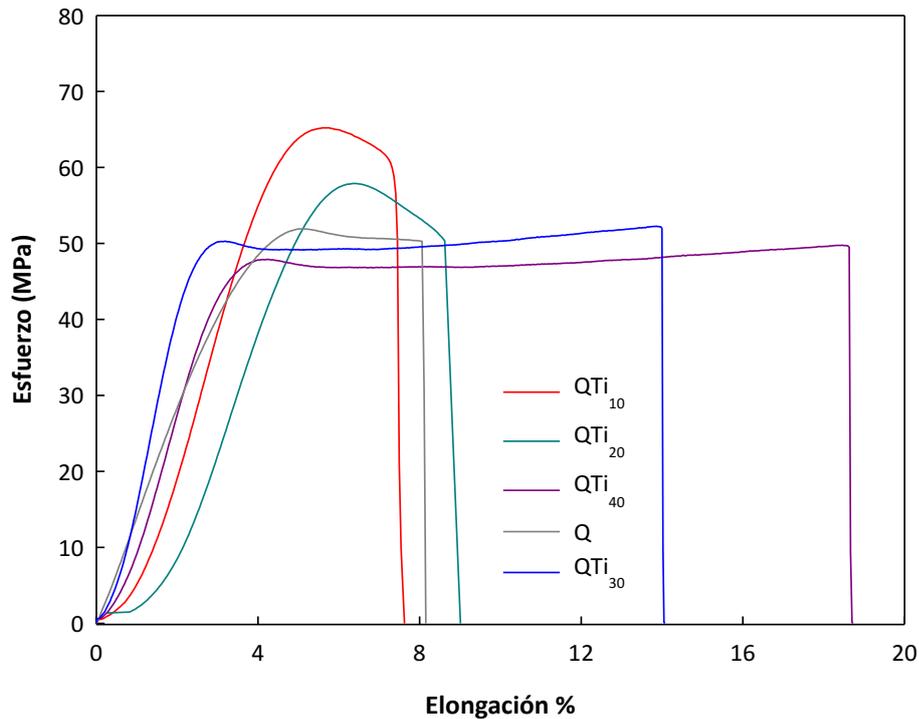


Figura 5.16. Perfiles mecánicos de matrices a base de quitosano (Q) con distintas concentraciones de nanopartículas de TiO₂ modificadas con ácido tungstofosfórico (TPA).

Tabla 5.5. Propiedades mecánicas de las distintas matrices estudiadas

Muestra	Esfuerzo a la ruptura (MPa)	Elongación %
Q	51.7 (6.0) ^a	8.2 (1.1) ^{a,b}
QT ₁₀	65.6 (2.5) ^b	7.5 (1.5) ^a
QT ₂₀	50.7 (2.4) ^a	8.9 (1.9) ^{a,b}
QT ₃₀	52.5 (1.2) ^{a,b}	13.9 (1.8) ^b

*Distintos superíndices en una misma columna indican diferencias significativas entre las muestras (p<0.05).

5.5.10 Análisis térmico por DSC, DMA y TGA

El análisis de las propiedades térmicas de los materiales es importante para establecer su rango de temperatura de procesamiento y uso. La estabilidad térmica de la película Q y el nanocompuesto QTi₂₀ se obtuvo mediante un análisis termo-gravimétrico (Figura 5.17a). Para el Q puro, la pérdida de peso tuvo lugar en tres etapas (Figura 5.17a y Tabla 5.6). La primera etapa se observó entre 20 y 180°C con una pérdida de peso del 15.2%, que se asignó a la evaporación de agua en las películas de Q, principalmente agua unida y adsorbida en la estructura (Martucci y col., 2007). Las pérdidas correspondientes a la segunda etapa (38.7%) comprendida entre 180-400°C se debieron a procesos complejos como la deshidratación de los anillos del polisacárido y a la descomposición de las unidades acetiladas y desacetiladas del quitosano (Neto y col., 2005).

La tercera etapa, comprendida entre 400 y 600°C, llevó a una pérdida de peso del 41.9%, lo que correspondió a la descomposición de Q y vaporización y eliminación de productos volátiles. La curva TGA del nanocompuesto QTi₂₀ también presentó tres etapas, en las cuales las pérdidas de peso fueron 15.2, 40.0 y 43.6% (Tabla 5.6). La pérdida de peso total fue menor que la de Q por lo que la masa residual pasó de 1.2 a 7.5% probablemente debido a reacciones de entrecruzamiento entre el quitosano y el TiO₂.

Asimismo, es posible determinar las principales características térmicas de los sistemas poliméricos a través de la técnica de DSC (El-Wakil y col., 2015). El comportamiento térmico y las propiedades cristalinas de los nanocompuestos se vieron significativamente afectados por la carga de TiO₂ (Figura 5.17b).

El menor número de nanopartículas causó un cambio de la temperatura de fusión hacia temperaturas más elevadas, con un aumento de la entalpía de fusión. Estos resultados se atribuyeron al efecto de anclaje de las nanopartículas que actúan como agente de nucleación para la cristalización; a partir de las curvas de flujo calórico (W/g) se observó un aumento de la entalpía de fusión (190-300 J g⁻¹) en presencia de concentraciones crecientes de NpTi. El proceso de deshidratación se debió a la pérdida de agua físicamente adsorbida y atrapada y a la pérdida de agua estructural o químicamente ligada (Raut y col., 2016).

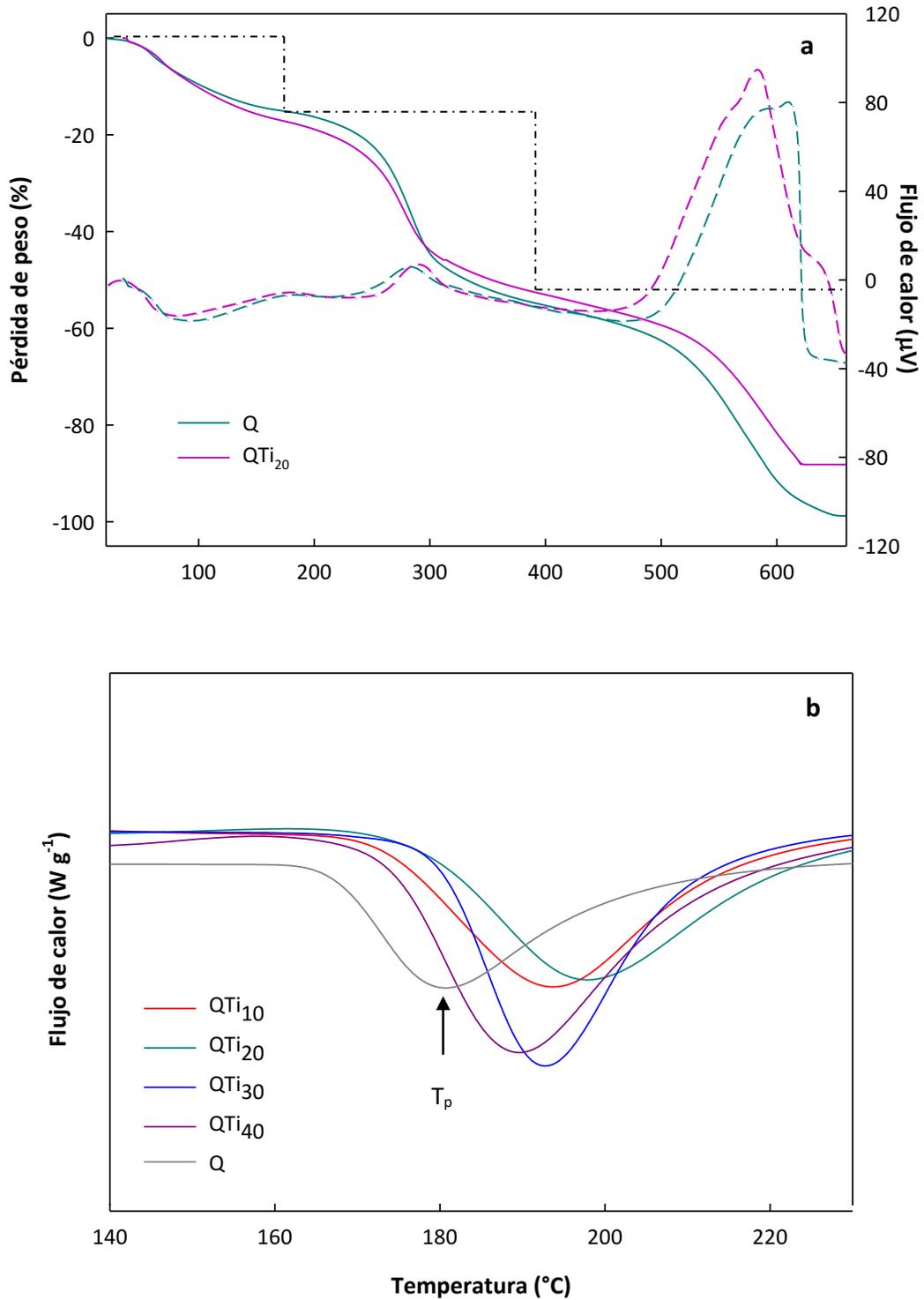


Figura 5.17. (a) Termogramas obtenidos por TGA de muestras de quitosano (Q) y nanocompuesto QT_{i20} formulado con Q y NpTiO₂, **(b)** curvas de flujo de calor de películas de quitosano y nanocompuestos QT_i mostrando la temperatura de pico (T_p).

Tabla 5.6. Etapas de las pérdidas de peso en diferentes etapas obtenidas por TGA

Muestra	Etapa I		Etapa II		Etapa III		Peso residual %
	Rango °C	Pérdida de peso %	Rango °C	Pérdida de peso %	Rango °C	Pérdida de peso %	
Q	20-180	15.2	180-400	40.0	400-600	43.6	1.2
QTi ₂₀	20-180	11.9	180-400	38.7	400-600	41.9	7.5

Tabla 5.7. Temperatura de pico (T_p) con su correspondiente entalpía (ΔH_p), temperaturas de fusión vítrea (T_g) de las formulaciones desarrolladas

Formulación	T_p	ΔH_p	T_{g1}	T_{g2}
Q	122.4 (3.6) ^a	288.3 (6.6) ^d	91.4 (1.8) ^a	-
QTi ₁₀	193.8 (1.5) ^c	188.9 (4.1) ^b	-	157.0 (3.2) ^a
QTi ₂₀	192.3 (1.8) ^c	197.7 (3.2) ^b	-	156.4 (1.9) ^a
QTi ₃₀	192.7 (2.0) ^c	236.3 (6.5) ^c	107.9 (2.5) ^b	159.3 (2.4) ^{a,b}
QTi ₄₀	192.4 (0.9) ^c	299.1 (8.8) ^d	106.8 (2.7) ^b	156.0 (2.7) ^a

^aDistintos superíndices en una misma columna indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$).

El análisis térmico se complementó con calorimetría diferencial de barrido modulada (MDSC) que permitió obtener información acerca de las temperaturas de transición vítrea a partir de la curva de flujo de calor reversible (Figura 5.18a). Las temperaturas de transición vítrea (T_g) de las películas obtenidas a partir de la segunda corrida fueron el resultado de la relajación de los anillos de glucopiranososa a través del oxígeno glucosídico y asistida por un reordenamiento cooperativo de enlaces de hidrógeno (Deveci y col., 2014). En el caso de los nanocompuestos, la T_g ubicada a 158°C en promedio, resultó prácticamente independiente de la concentración de NpTi (Tabla 5.7). Sin embargo, para las mayores concentraciones de partículas (QTi₄₀ y QTi₃₀) se puso en evidencia una segunda T_g aproximadamente a 106°C. Este fenómeno podría deberse a la presencia de dos dominios bien separados, una fase rica en quitosano y otra en nanopartículas, ya que las interacciones de los grupos del Q y Ti se tornaron más débiles. En cambio la

interacción partícula-partícula se fortaleció llevando a cierta aglomeración y posiblemente dejando más libres los dominios ricos en quitosano cuya T_g se localizó a 91.4°C. Estos resultados estarían de acuerdo con los observados a través de SEM y AFM.

Los ensayos de DMA realizado sobre la película de quitosano y la QT_{i20} permitieron corroborar los resultados obtenidos por MDSC (Figura 5.18b). Para la película Q, la $\tan \delta$ se ubicó a 91°C y para QT_{i20} nuevamente se observaron dos valores a 126° y 195°C, indicando la coexistencia de dos fases inmiscibles. De acuerdo a [Lipatov y Alekseeva. \(2007\)](#), la aparición de dos transiciones es el primer signo de materiales heterogéneos con dos fases. Asimismo es posible distinguir un sistema de fases separadas de uno miscible por DSC si las T_g s de los componentes están separadas más de 20°C ([Villarruel y col., 2015](#)). El corrimiento de las temperaturas de transición a lo largo de la escala de temperatura es un signo de separación de fase incompleta, así como de la aparición de una interfase ([Lipatov y Alekseeva, 2007](#)).

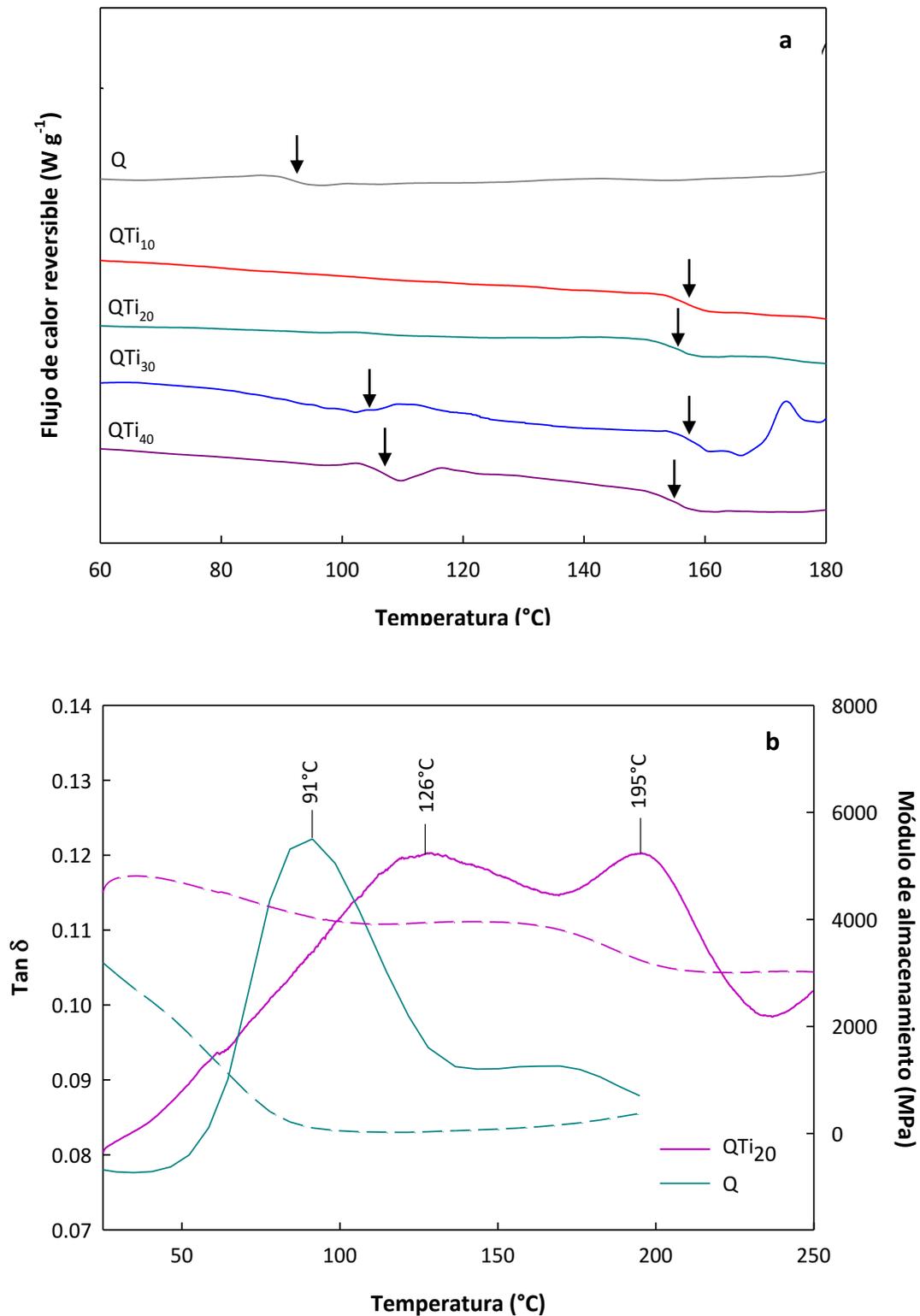


Figura 5.18. (a) Termogramas obtenidos por calorimetría diferencial de barrido modulada (MDSC) de películas a base de quitosano con diferentes concentraciones de nanopartículas de TPA-TiO₂. Se indica el cambio en la línea de base de la señal de flujo de calor reversible como temperatura de transición vítrea (T_g), **(b)** análisis dinámico mecánico (DMA) de películas de quitosano y nanocompuesto QT_i₂₀ formulado con Q y NpTiO₂.

5.5.11 Difracción de rayos X

Los patrones de difracción de rayos X de las matrices: QT_{i10}, QT_{i20} y QT_{i30} se muestran en la [Figura 5.19](#).

El DRX de las películas de quitosano con un patrón de difracción amorfo en concordancia con lo reportado en la literatura podría ser causado por la dificultad de las cadenas del biopolímero para recuperar su forma cristalina empaquetada original cuando las películas son obtenidas a partir de una solución ácida. Se ha señalado que las interacciones intramoleculares entre los grupos -NH₃⁺ e hidroxilo en el quitosano limitan el movimiento molecular de la cadena del polímero. Los difractogramas de las películas exhibieron picos ubicados a $2\theta = 8.0, 10.9, 17.8$ y 22.6° de acuerdo con lo informado por diferentes autores. El pico agudo a $2\theta = 10.9^\circ$ indicó una estructura cristalina hidratada, mientras que el amplio halo correspondió a la parte estructural amorfa de quitosano ([Khan y col., 2012](#)). Además, las nanopartículas ([Figura 5.19](#)) exhibieron los picos característicos de la fase anatasa localizados en $2\theta = 25.3^\circ$ (101), 37.9° (004), 47.8° (200) y 54.3° (211) ([Abdou y col., 2008](#); [Fuchs y col., 2008](#); [Haldorai y Shim, 2014](#); [Julián A. Rengifo-Herrera y col., 2014](#)).

Por otro lado, los espectros DRX de las películas compuestas QT_i reflejaron una modificación en el empaquetado de la cadena después de la inclusión del material cristalino mostrando los picos correspondientes a Q así como los característicos de las NpTi. El aumento de intensidad del pico de anatasa a $2\theta = 25.4^\circ$ se correspondió con el incremento en el porcentaje de NpTi modificadas con TPA que se incorporaron a las matrices Q ([Ali y col., 2018](#)). De acuerdo a [Azizi y col. \(2014\)](#), el hecho de que no se produjera la aparición de nuevos picos ni cambios en la ubicación de los mismos en comparación con los patrones de Q y TiO₂ sería consistente con la coexistencia de dos fases (polímero y nanopartículas) en total acuerdo con los resultados obtenidos por SEM.

No se observaron líneas de difracción relacionadas con el TPA, indicio del alto grado de dispersabilidad en la matriz de titanio ([Fuchs y col., 2008](#)).

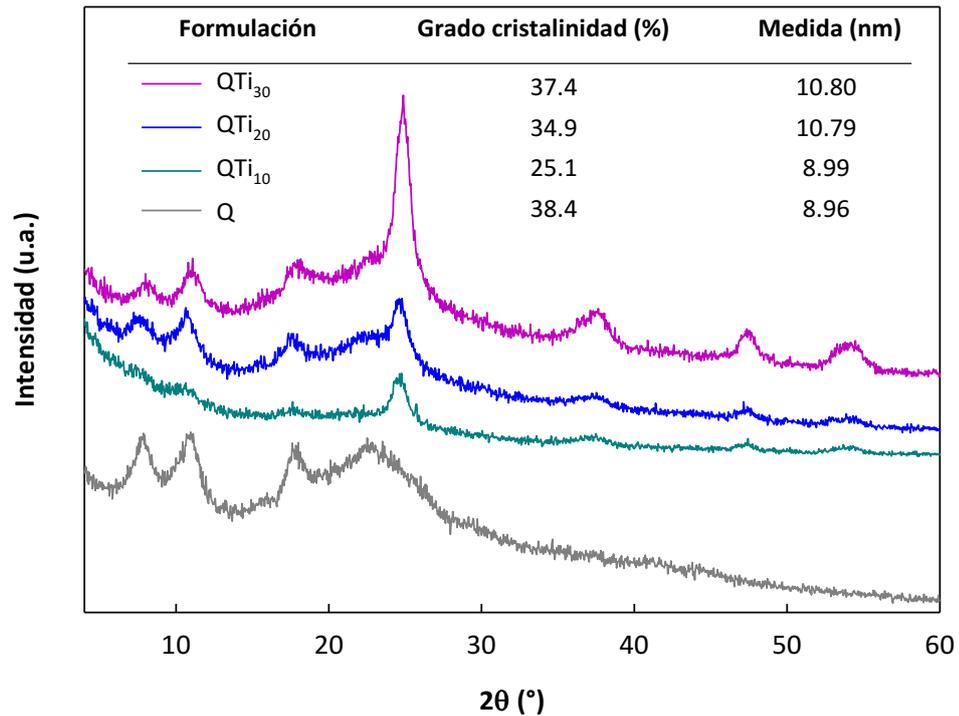


Figura 5.19. Patrón de difracción de rayos X (DRX) de la película control de quitosano (Q) y de los nanocompuestos formulados a base de Q funcionalizados con NpTi modificadas con ácido tungstofosfórico (TPA).

El tamaño cristalino medio de las nanopartículas de TiO₂ así como de las películas de Q y QTi se estimó de acuerdo con la ecuación de Scherrer (Ba-Abbad y col., 2012):

El tamaño cristalino resultó ser 8.0 nm para las muestras de TiO₂ tratadas a 500°C (Tabla inserta en Figura 5.19). Asimismo, los tamaños cristalinos obtenidos para las películas indicaron que la interacción entre Q y las nanopartículas no afectó significativamente el tamaño de los cristales de los nanocompuestos en el caso de la adición de la mínima proporción de TiO₂.

De acuerdo a lo establecido por (Langford y Wilson, 1978), los máximos del patrón de difracción se amplían en una cantidad inversamente proporcional al tamaño cristalino. El ensanchamiento de los picos puede deberse a la formación de microtensiones en la estructura cristalina ocasionada por defectos (Theivasanthi y Alagar, 2013). Valores similares fueron reportados por Ba-Abbad y col. (2012).

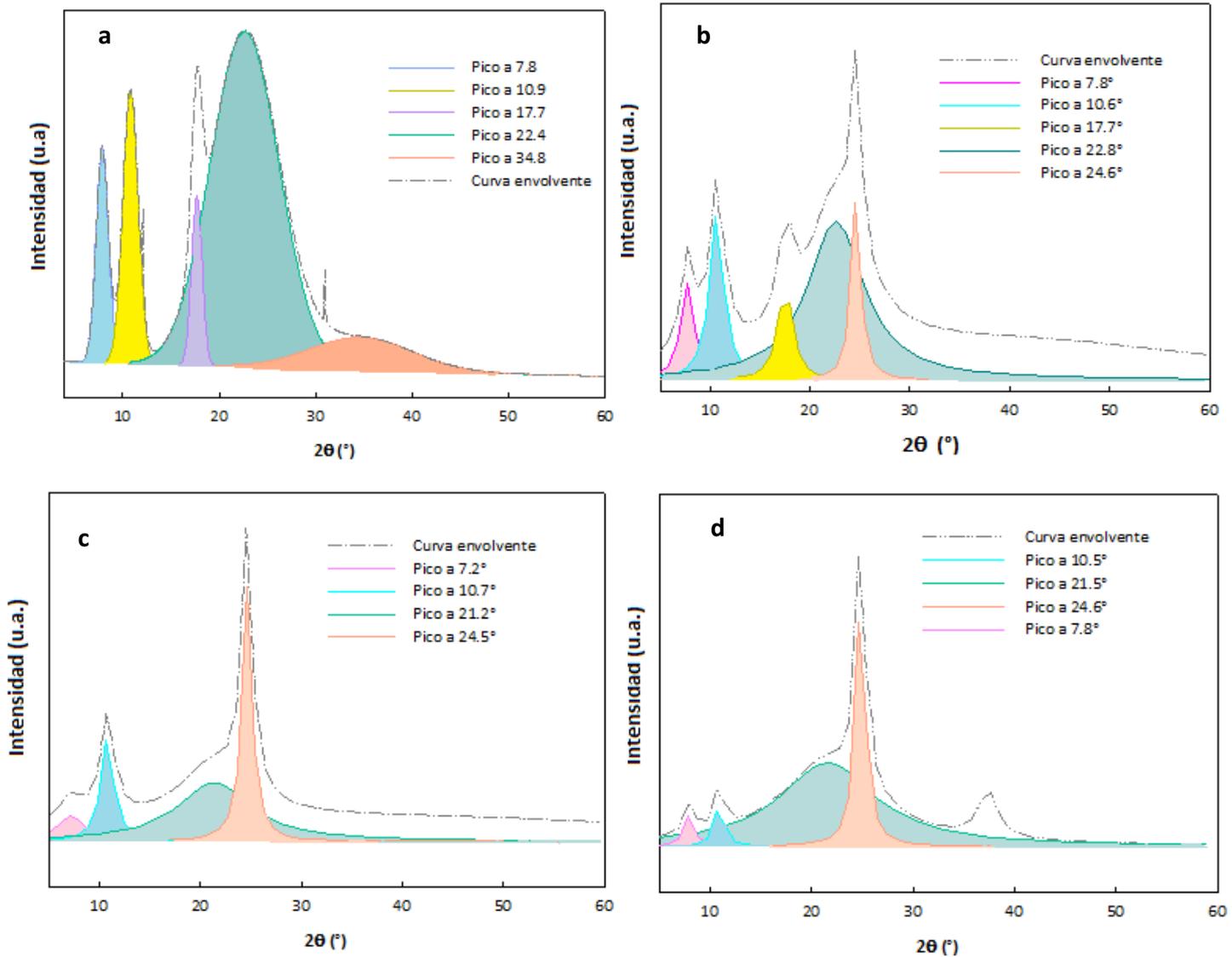


Figura 5.20. Deconvolución de los picos de difracción de RX de la película de quitosano (a), y de los nanocompuestos funcionalizados con NpTiO₂ (b) QT_i₁₀, (c) QT_i₂₀ y (d) QT_i₃₀

En la [Figura 5.20](#) se observa que el patrón va virando desde el característico del Q hacia un patrón con dos fases, una rica en quitosano con una interacción íntima con las NpTi y otra fase rica en partículas más libres.

5.5.12 Microscopía electrónica de barrido (SEM-EDS)

La técnica de microscopía SEM se llevó a cabo para observar la morfología de la superficie de los nanocompuestos y la dispersión de NpTi en la matriz de quitosano.

Las micrografías de la sección transversal de las películas de Q expusieron una matriz lisa con buena integridad, con un aspecto uniforme, compacto y homogéneo (Figura 5.21).

Las películas QT_i, compuestas de dos fases, matriz y nanopartículas, presentaron un aspecto granular rugoso (Figura 5.22 y 5.23). La matriz del biopolímero formó la fase continua y las nanopartículas la discontinua, permitiendo distinguir interfases reconocibles entre ambos materiales. Independientemente de la proporción de nanopartículas incorporadas, las mismas se distribuyeron uniformemente al azar en la matriz de Q sin agregación confirmando la dispersión adecuada de TiO₂ dentro de la matriz de quitosano (Figura 5.23a, b y c). A medida que aumentó la proporción de NpTi se mantuvo la uniformidad. El tamaño de las partículas de TiO₂ observado confirmó el tamaño cristalino calculado a partir del ancho del pico de difracción pico de DRX. Estos resultados estuvieron de acuerdo con aquellos obtenidos por diferentes autores (Qu y col., 2019; Zhou y col., 2009; Zolfi y col., 2014).

Adicionalmente, las imágenes de mapeo obtenido por EDS (línea verde K α de Ti y línea roja L α de W) confirmaron la dispersión homogénea de las nanopartículas de TiO₂ en la matriz de Q (Figura 5.23). Otros elementos observados en el espectro EDS como carbono y oxígeno provinieron en su mayoría de los grupos funcionales del quitosano.

La absorción de agua depende del tamaño poroso y de partícula de la película. La propagación del líquido está controlada por estas características. A partir de la micrografía SEM, se demuestra que la superficie de la membrana juega un papel importante para permitir la absorción de agua (Sivaselvi y Ghosh, 2017).

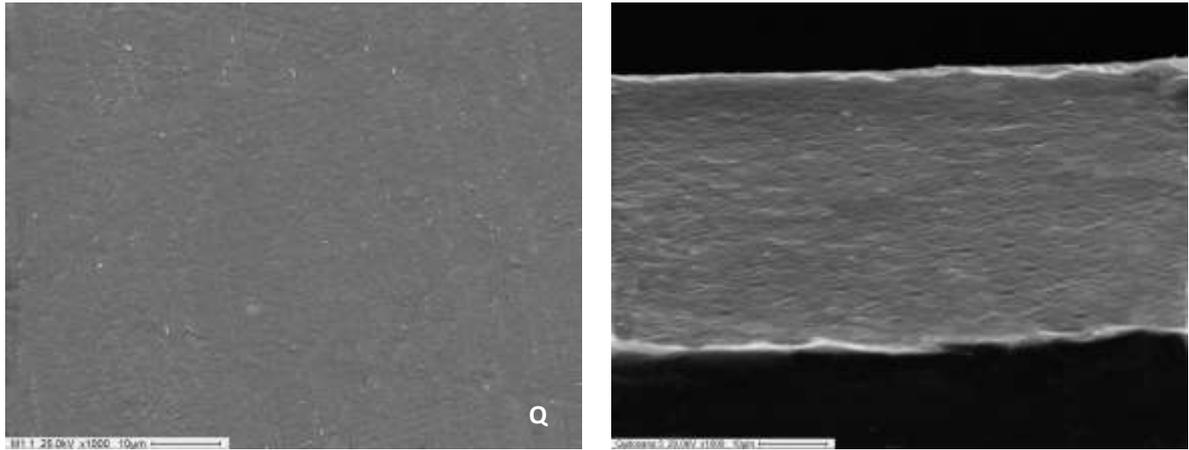


Figura 5.21. Micrografías obtenidas por SEM de la superficie y la sección transversal de películas de quitosano.

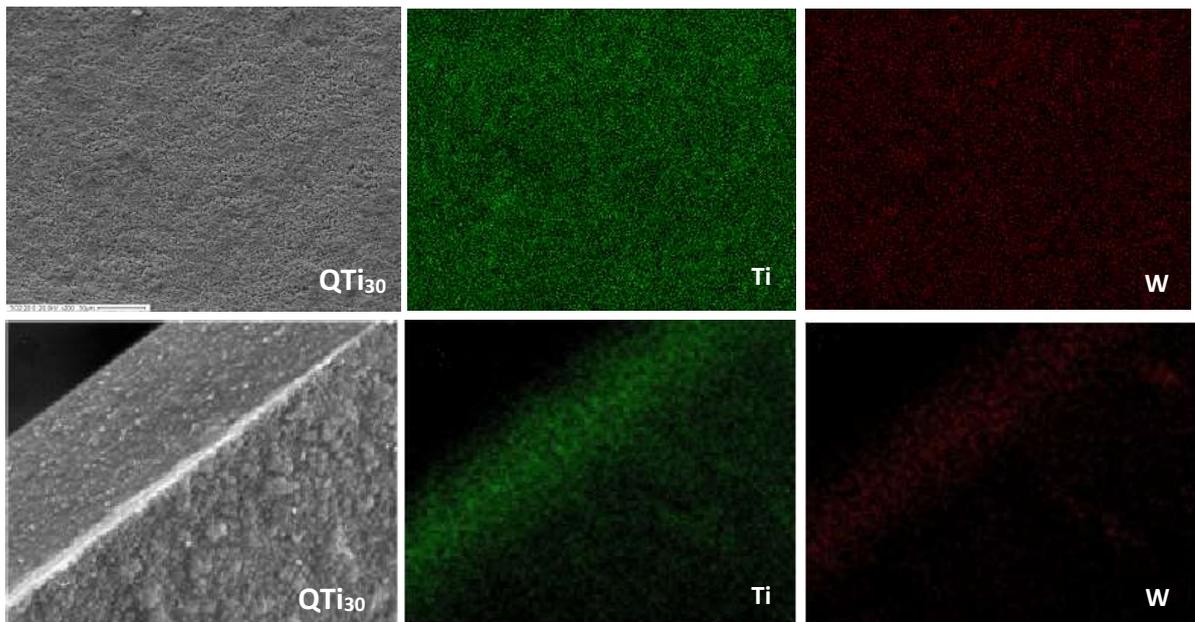
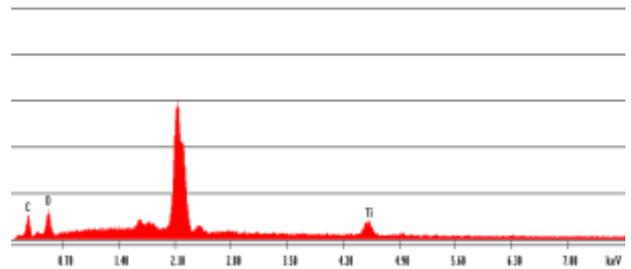
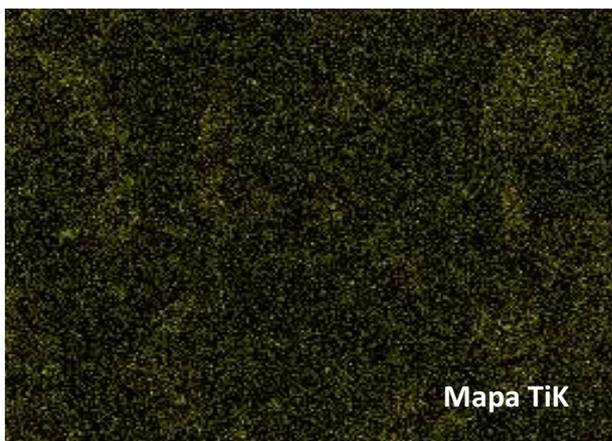
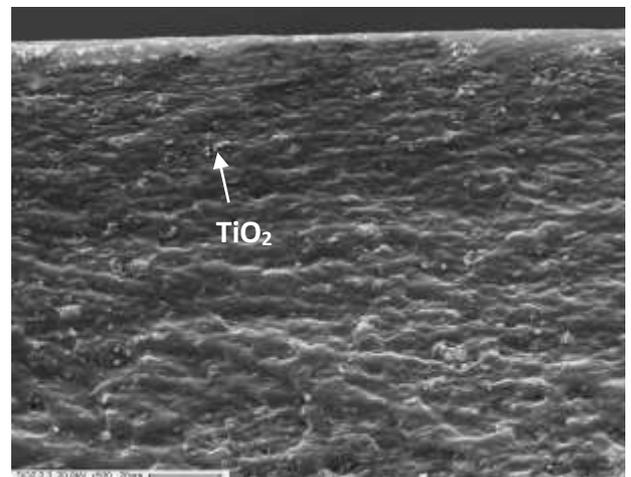
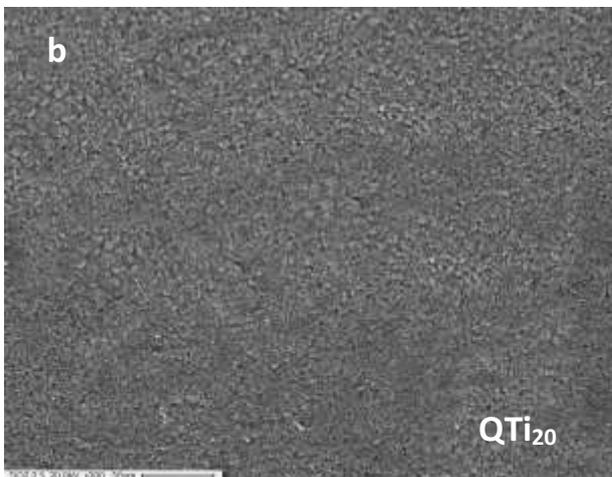
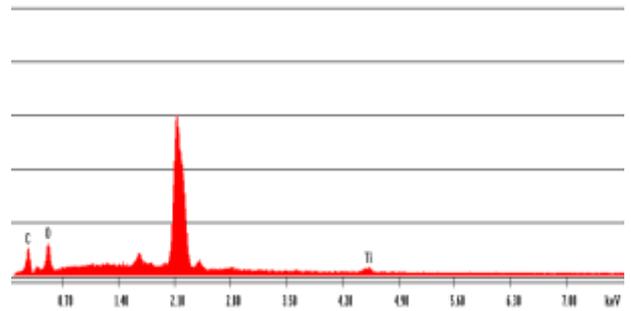
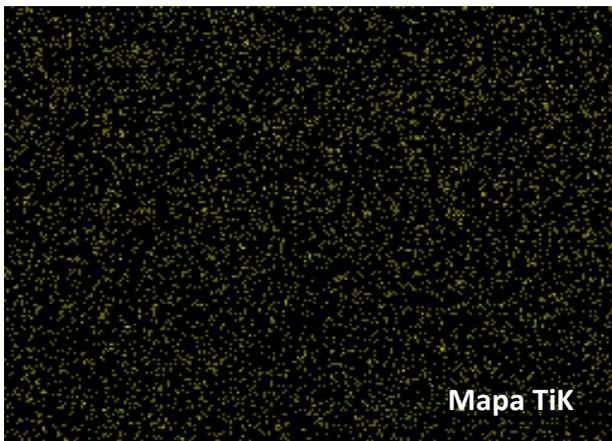
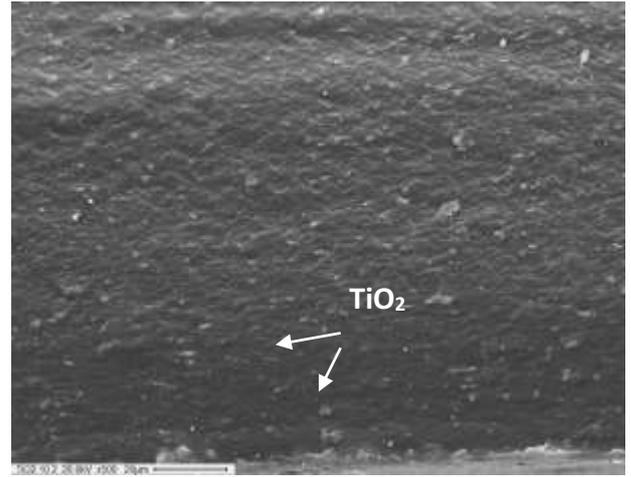
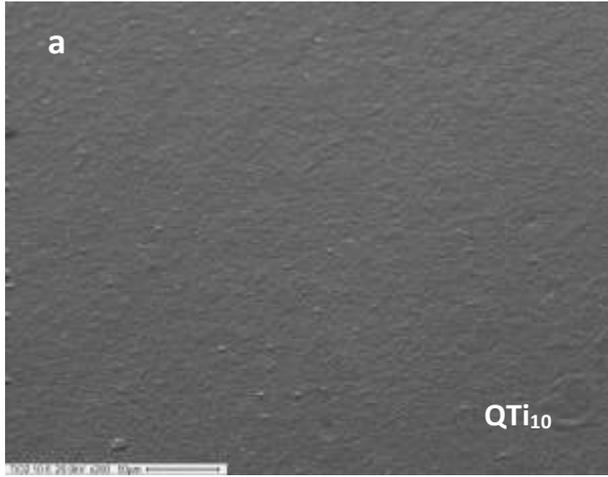


Figura 5.22. Micrografías de la sección transversal de los nanocompuestos QTi₃₀ y los mapas de Ti y W obtenidos mediante una microsonda de análisis elemental. El Ti corresponde a la línea K α 1 a 4.508 KeV y el W a la línea M α 1 ubicada a 1.779 KeV.



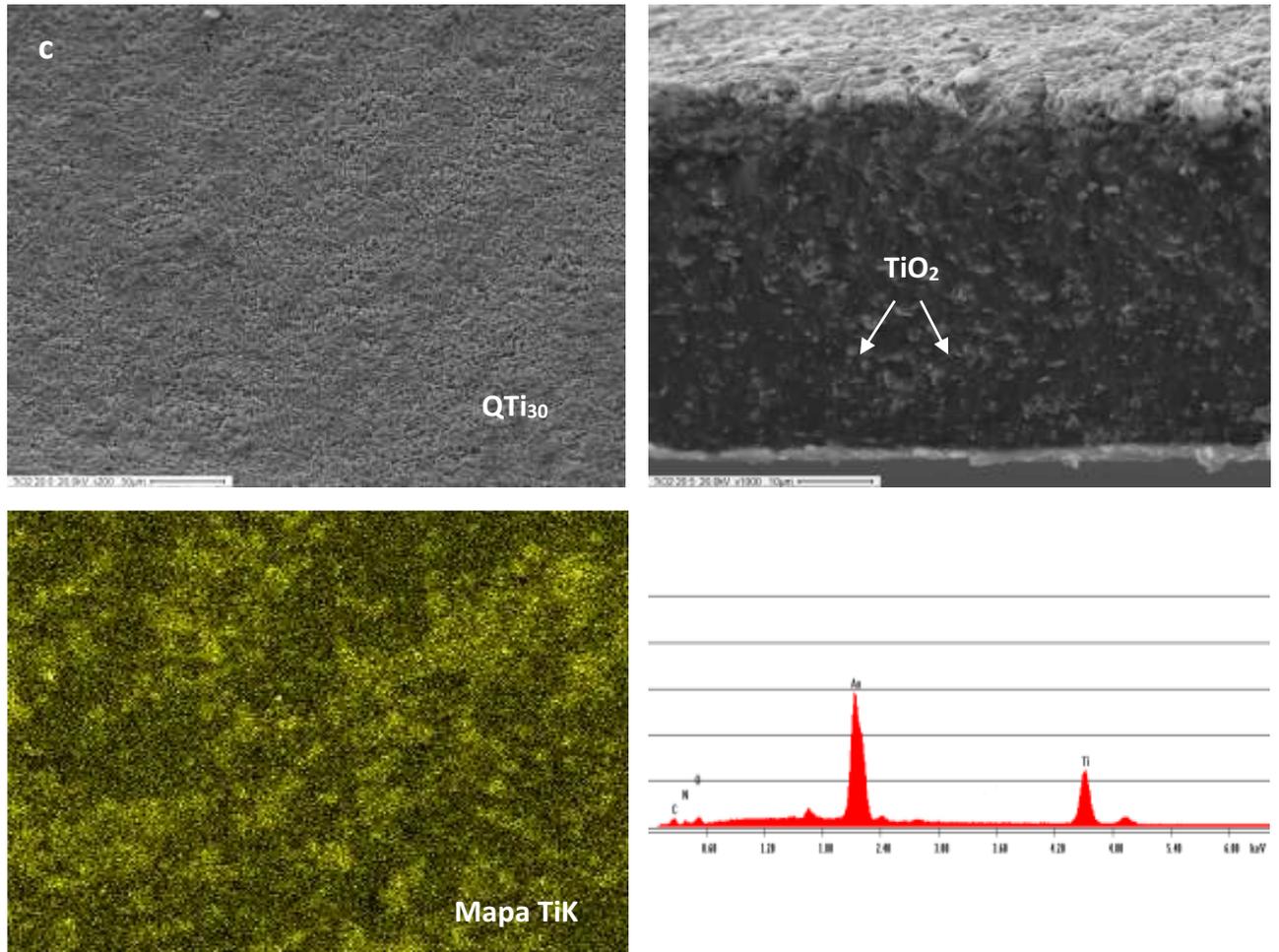


Figura 5.23. Micrografías obtenidas por SEM de superficies y corte transversal de nanocompuestos a base de quitosano funcionalizados con concentraciones crecientes de nanopartículas de TiO_2 (a) 10, (b) 20 y (c) 30% p/p Q modificadas con ácido tungstofosfórico (TPA). Los mapas de Ti fueron obtenidos mediante una microsonda de análisis elemental.

5.5.13 Análisis microestructural por microscopía de fuerza atómica

La microscopía de fuerza atómica (AFM) es una poderosa herramienta muy usada para proporcionar información cualitativa (morfología) y cuantitativa (rugosidad) sobre los biopolímeros a escala nanométrica (Zolfi y col., 2014), como complemento de las micrografías obtenidas por SEM.

La Figura 5.24 muestra imágenes de las películas y compuestos a base de quitosano con diferentes proporciones de nanopartículas de TiO_2 . Como se puede inferir, la concentración de TiO_2 afectó la rugosidad superficial de los nanocompuestos (Figura 5.24).

La superficie de la película pura de Q mostró una serie de pequeñas protuberancias (Figura 5.24a). Por otro lado, las superficies de las matrices QT_i resultaron ser más rugosas con respecto a las películas Q, en coincidencia con los resultados encontrados por (Xiao y col., 2014). Las Figuras 5.24b, c y d ilustran una dispersión aleatoria uniforme de las nanopartículas TiO₂ que apoyan los resultados morfológicos obtenidos por SEM. Resultados similares fueron informados por Mallakpour y Madani (2015).

Una morfología granular de las películas nanocompuestas con TiO₂ estuvo de acuerdo con los resultados obtenidos por DRX, sugiriendo la presencia de granos cristalinos de anatasa. La topografía superficial (a) e imágenes tridimensionales (b) de los nanocompuestos exhibieron superficies heterogéneas con dominios de partículas en una matriz de Q en el rango de tamaño de 0 a 200 nm (Figura 5.24). La rugosidad media de la superficie y de altura pico a pico fueron de 100 y 50 nm en promedio, respectivamente. Algunos aglomerados (tamaño > 500 nm) también se observaron a partir de imágenes AFM.

En las formulaciones con menor proporción de nanopartículas QT_{i10}, la rugosidad superficial no fue significativamente diferente ($p > 0.05$) que la informada para Q. La presencia de mayor concentración de partículas aumentó la rugosidad superficial probablemente debido a la formación de aglomerados, causada por la interacción entre el quitosano y las nanopartículas durante el proceso de secado de las soluciones filmogénicas.

Los valores medios (Ra) y medios-cuadrados (RMS) de rugosidad superficial se incluyen en la Tabla 5.8. El nanocompuesto conteniendo el 30% de NpTi tuvo las proyecciones más altas (Figura 5.23).

Según (Xiao y col., 2014) estas diferencias significativas ($p < 0.05$) en los valores de rugosidad fueron consecuencia de las fuerzas de interacción entre el quitosano y las nanopartículas de TiO₂.

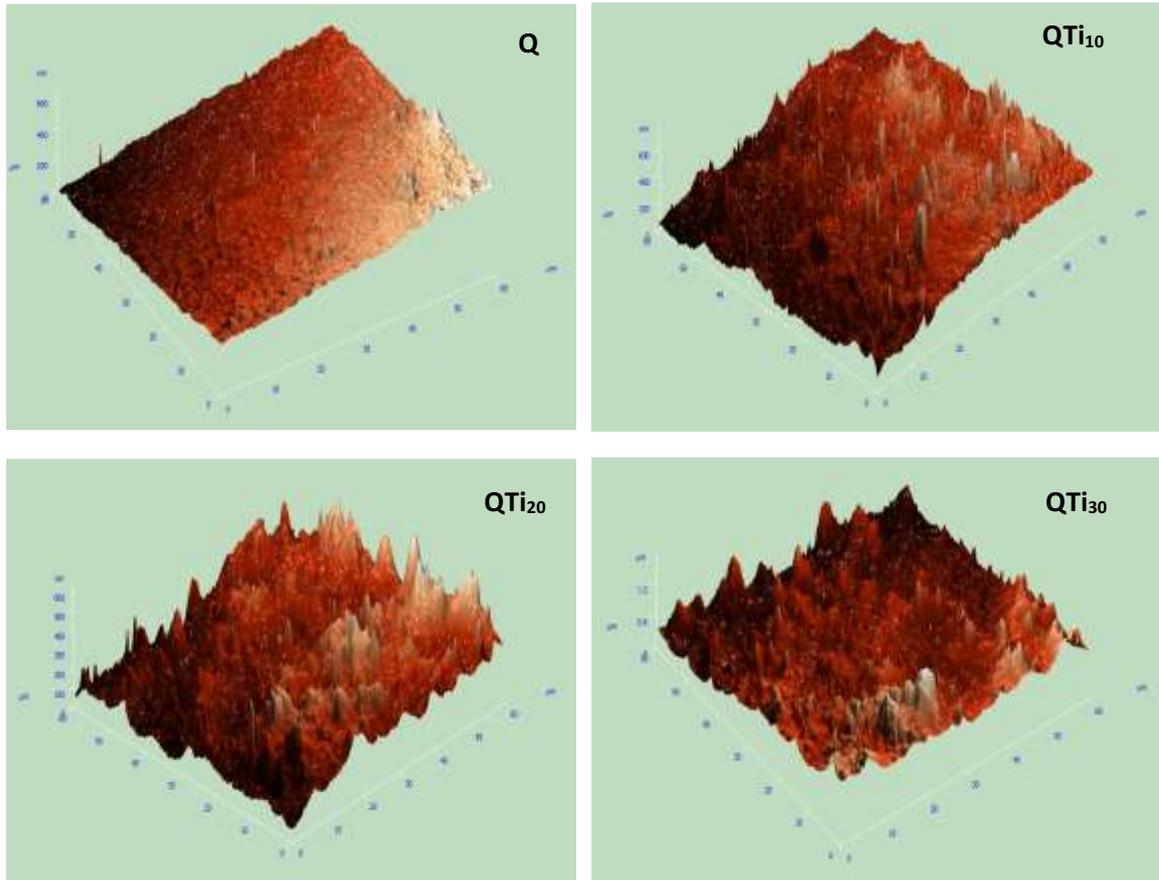


Figura 5.24. Imágenes topográficas obtenidas por AFM de películas de (a) Q, (b) QT₁₀, (c) QT₂₀ y (d) QT₃₀.

Tabla 5.8. Rugosidad de los nanocompuestos en relación a las películas de quitosano obtenido por AFM

Formulación	R _a (nm)	R _q (nm)
Q	127.8 ^a	157.4 ^a
QT ₁₀	131.2 ^a	154.1 ^a
QT ₂₀	199.3 ^b	253.0 ^b
QT ₃₀	235.8 ^c	288.7 ^c

^aDistintos superíndices en una misma columna indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$).

5.5.14 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier combinada con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR). Análisis por componentes principales (PCA)

Las interacciones establecidas durante la funcionalización de los nanocompuestos se confirmaron mediante espectros obtenidos a partir de la técnica ATR-FTIR.

En la [Figura 5.25](#) se muestra el espectro de la matriz de Q control donde se ve una amplia banda de absorción a $3600\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ debido a la superposición de las vibraciones de estiramiento O-H y N-H de grupos funcionales involucrados en enlaces de hidrógeno y picos en 2867 y 2912 cm^{-1} , perteneciente a las vibraciones simétricas y asimétricas de CH_2 de la cadena de carbonada.

Las bandas típicas a 1648 cm^{-1} (estiramiento C=O en grupo acetamida, vibración amida I), 1581 cm^{-1} (flexión-NH₂ en grupo 2-aminoglucosa no acetilada) y 1381 cm^{-1} (estiramiento C-O de grupos alcohólicos primarios). Las películas Q también mostraron bandas de absorción a 1155 cm^{-1} (estiramiento asimétrico del puente C-O-C) y 1032 cm^{-1} (vibraciones esqueléticas que involucran el estiramiento C-O), inherentes a la estructura sacárida de quitosano ([Afzal y col., 2017](#); [Archana y col., 2013](#); [Rengifo-Herrera y col., 2018](#); [Zainal y col., 2009](#)).

El espectro del TiO_2 mostró una banda ancha a 3500 cm^{-1} , correspondiente a la vibración del grupo de estiramiento O-H y un pico a 1630 cm^{-1} atribuido a las interacciones entre las moléculas del agua y los grupos hidroxilo del TiO_2 (mezcla Ti-OH). La vibración debida al enlace Ti-O fue visible a 1383 cm^{-1} y la vibración debida a Ti-O-Ti a 1139 cm^{-1} ([Devanand Venkatasubbu y col., 2013](#); [Selvia y col., 2018](#)). Las bandas anchas centradas a $500\text{--}600\text{ cm}^{-1}$ en el espectro TiO_2 se asignan a la vibración de flexión de enlaces (Ti-O-Ti), mientras que a 3400 cm^{-1} y 1650 cm^{-1} corresponden a la interacción intermolecular de grupos hidroxilos de la superficie de TiO_2 con moléculas de agua ([Al-Taweel y col., 2019](#); [Al-Taweel y Saud, 2016](#)).

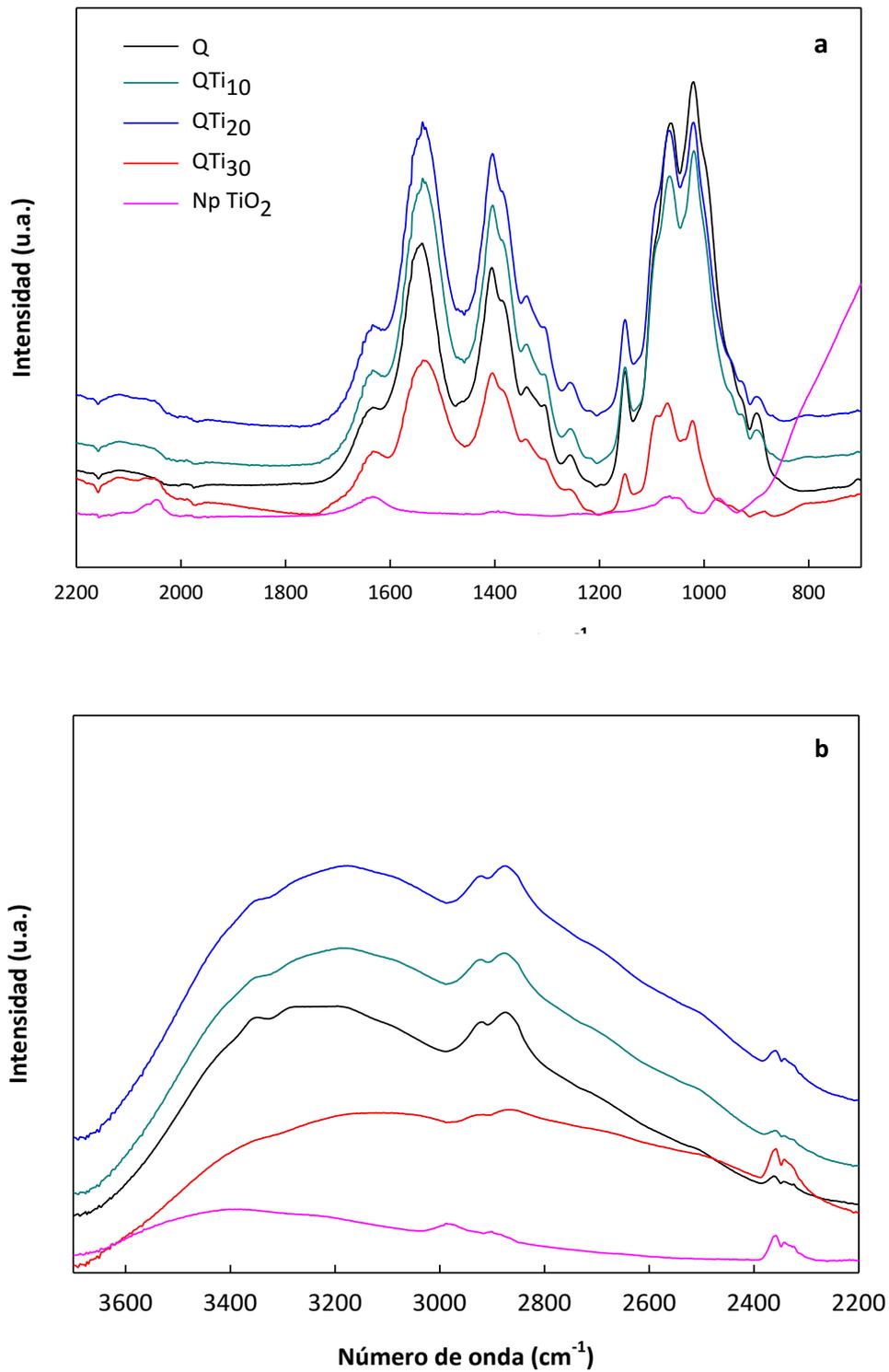


Figura 5.25. Espectros ATR-FTIR de las matrices de Q y QT_{i10}, QT_{i20} y QT_{i30} y polvo de NpTi.

Las matrices conteniendo NpTi mostraron claramente que las intensidades de la banda IR disminuyeron con el aumento de las cargas de NpTi. Los espectros correspondientes a Q y a películas funcionalizadas con nanopartículas, exhibieron una característica general bastante similar, que difirieron principalmente en las intensidades de las ventanas espectrales $3500-2800\text{ cm}^{-1}$ y $1600-1000\text{ cm}^{-1}$. Las frecuencias de las bandas del quitosano no sufrieron cambios significativos debido a las débiles interacciones entre sus grupos y las NpTi, sugiriendo interacciones físicas con el TiO_2 sin afectar la estructura química por ruptura de los enlaces químicos (Ali y col., 2018).

El análisis de componentes principales (PCA) permitió visualizar diferencias significativas entre muestras que contenían diferentes concentraciones de TiO_2 en la región espectral $1700-1400\text{ cm}^{-1}$. A partir de este resultado se pudo inferir la existencia de cambios en las interacciones entre el quitosano y las nanopartículas. Diferentes concentraciones de TiO_2 en la matriz de Q permitieron la localización de cada formulación como grupos independientes entre sí (Figura 5.26). La variación sistemática de los valores experimentales fue apoyada por las 2 PCs. Los componentes principales primero y segundo (PC1 y PC2) reflejaron el 83% y 13% de la varianza total, respectivamente.

Teniendo en cuenta la región $1700-1400\text{ cm}^{-1}$ de los espectros ATR-FTIR, la incorporación de las nanopartículas llevó a una separación de las muestras en 4 grupos en el gráfico bi-plot. Las matrices funcionalizadas se separaron de las películas Q a lo largo de PC2, presentando valores positivos de PC2, mientras que las películas Q presentaron valores negativos.

Además, la distribución de muestras a lo largo de PC1 exhibió puntuación positiva del grupo QTi_{30} y negativa para los otros grupos (QTi_{10} y QTi_{20}) que se ubicaron en el lado opuesto. Mientras tanto, Q presentó valores cercanos a cero.

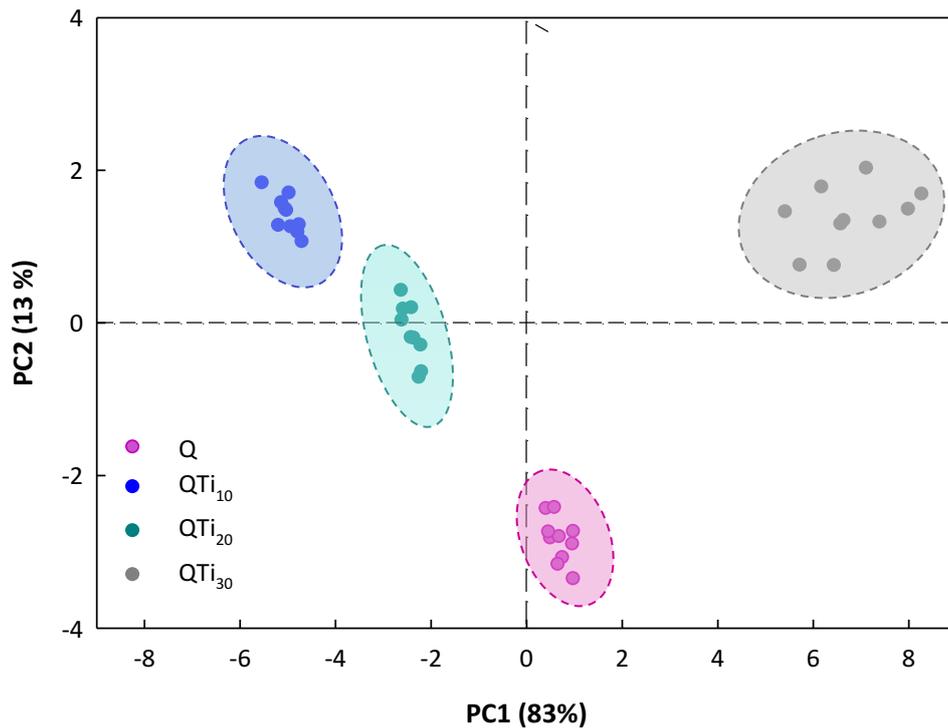


Figura 5.26. Gráfico biplot de las muestras Q, QT₁₀, QT₂₀ y QT₃₀. Análisis PCA de la región espectral 1700-1400 cm⁻¹.

5.5.15 Espectroscopía de tiempo de vida media de aniquilación de positrones (PALS)

Las vidas τ_3 e τ_2 presentaron valores mínimos cuando la concentración de NpTi alcanzó 0.2% (p/v) (Figura 5.27a). Por otro lado, como se muestra en la Figura 5.27b, I_2 aumentó de 30% a 65% mientras que el contenido de NpTi aumentó de 0 a 0.2 % (p/v). La razón es que a bajo contenido de NpTi, las partículas estuvieron completamente separadas y dispersas aleatoriamente en la matriz de Q (Wang y col., 2007). Más positrones se aniquilaron en la capa interfásial resultando en un aumento de I_2 y una constancia de I_3 . Con bajas proporción de NpTi, la distancia entre las nanopartículas fue lo suficientemente grande y permitió un aumento de la cantidad de capas interfásiales con la proporción creciente de partículas. El proceso de captura de positrones en los defectos presentes en las interfases llevó a variaciones en ambos componentes de vida útil, τ_2 y τ_1 . Para una proporción > 0.2 % (p/v), I_2 llegó a un nivel de saturación, la distancia disminuyó y la interacción se volvió más intensa y por lo tanto la capas interfásiales no sufrieron un mayor incremento (Zhang y col., 2003).

Las nanopartículas tienen gran superficie y fuerte interacción con las moléculas del polímero. Esta interacción puede mejorar la adhesión interfasial y conducir a la formación de una capa interfasial, que es útil para la transferencia del esfuerzo entre Np y matriz.

Los valores de las tres vidas medias permanecieron prácticamente constantes en las tres muestras QTi ($p > 0.05$) para concentración de NpTi $>$ que 0.2% (Figura 5.27b).

Según la curva de Tao y Eldrup, el radio de la cavidad sería del orden de $R=2.60 \text{ \AA}$ para una vida media τ_3 de alrededor de 1700 ps. Se observó una combinación lineal de la aniquilación de positrones tanto en componentes de TiO_2 como de Q, como se puede observar en la Figura 5.27c.

Para analizar las muestras, se evaluó la vida media promedio del positrón cuyo valor disminuyó de 550 a 520 ps al aumentar la concentración de nanopartículas en la matriz de quitosano (Figura 5.27c). La matriz de polímero con menor fracción de volumen libre exhibiría mejores propiedades a la tracción.

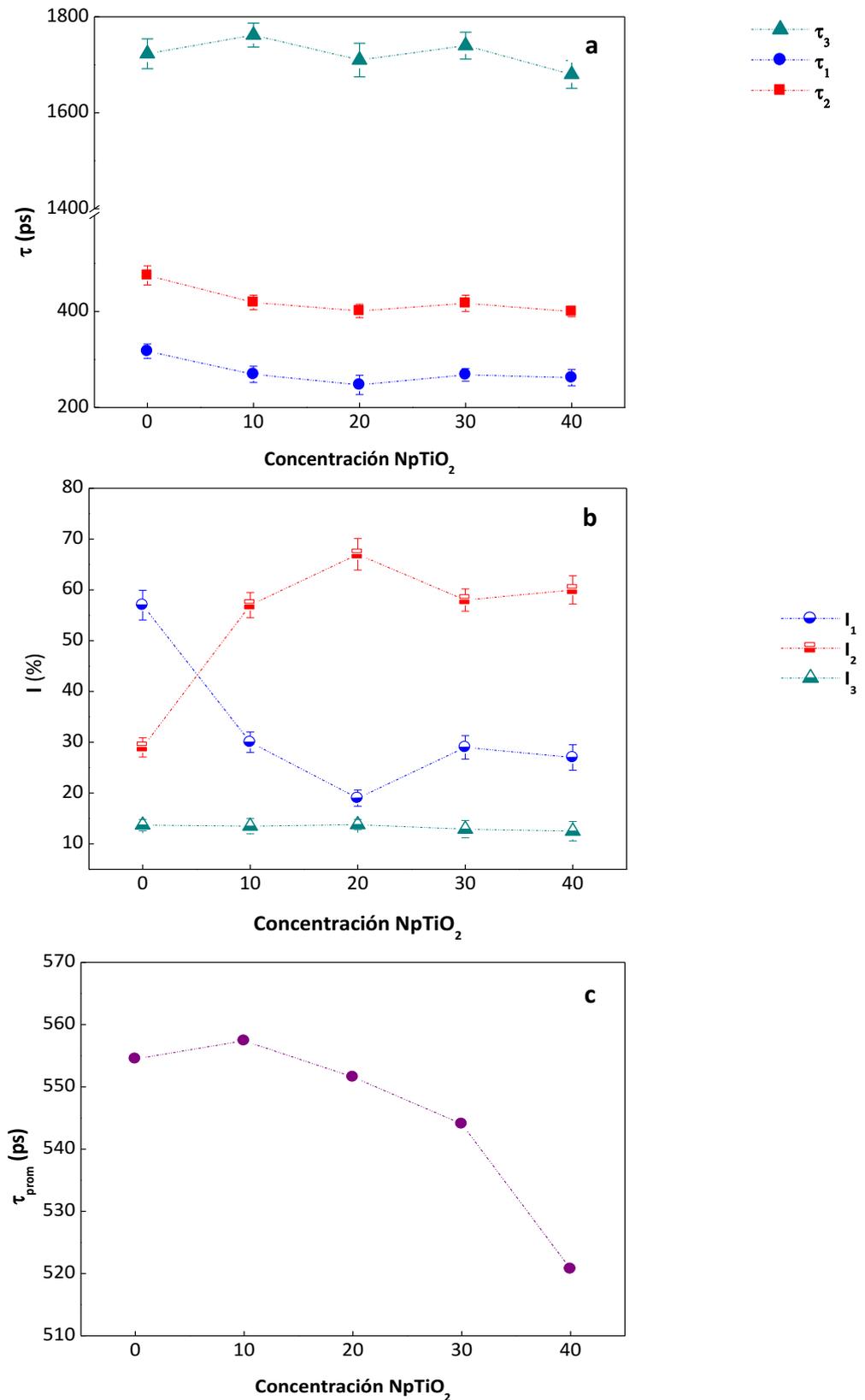


Figura 5.27. Parámetros PALS en función de la concentración de nanopartículas NpTiO₂ modificadas con ácido tungstofosfórico (TPA), τ_1 , τ_2 , τ_3 , I_1 , I_2 , I_3 . Las líneas punteadas que unen los puntos permiten visualizar la tendencia ya que los puntos intermedios no fueron estudiados.

5.6 APLICACIÓN

5.6.1 Reacciones de fotodegradación de verde de malaquita en interfases gas-sólido con diferentes longitudes de onda

Se realizaron experimentos usando diferentes longitudes de onda para determinar por separado los eventos fotoquímicos generados en películas de quitosano que contenían nanopartículas de TiO_2 en respuesta al estímulo provocado por la irradiación. Con este objetivo se estudiaron reacciones de degradación de verde de malaquita causadas por estados excitados usando fuentes de luz con distintas longitudes de onda: (i) irradiación con luz UV-A +Vis, (ii) luz Vis-1 ($\lambda > 450$ nm) y (iii) Vis-2 ($\lambda > 590$ nm).

El desempeño fotocatalítico de los nanocompuestos QTi_{10} , QTi_{20} y QTi_{30} en la oxidación del colorante comercial verde de malaquita se monitoreó mediante el seguimiento de su degradación utilizando fotografías. La cuantificación espectrofotométrica de este proceso se realizó a través de los espectros de absorción obtenidos por DRS a tiempo inicial y cada 1 h hasta un tiempo total de 6 h.

La evolución del proceso de fotodegradación del colorante VM se pudo visualizar a través de imágenes de los nanocompuestos irradiados con UV-A+Vis tomadas a intervalos regulares de tiempo: 0, 2, 4 y 6 h (Figura 5.28). La Figura 5.28 muestra que la fotodegradación del colorante VM se incrementó con el aumento del contenido de TPA- TiO_2 en las películas.

Los nanocompuestos QTi_{30} mostraron el mayor rendimiento de fotodegradación, resultando incluso superior al de la película QP-25₃₀ (Figura 5.28). Sin embargo, no se detectó un incremento apreciable del rendimiento del proceso de degradación del colorante con contenidos de TiO_2 mayores que 30%. Las películas de quitosano control sin inclusión de nanopartículas de TiO_2 no provocaron una fotodegradación del VM. También se realizaron experimentos de control utilizando películas QTi_{30} y QP-25₃₀ en condiciones de oscuridad, pero no se detectó blanqueo de colorante.

Los espectros DRS de películas de QTi coloreadas con VM (Figura 5.28) mostraron una absorción máxima a 624 nm. La intensidad del pico disminuye y el máximo sufre un cambio hipsocrómico durante la irradiación de luz UV + visible. Además, la disminución de la absorción aumentó en el mismo sentido del incremento de la proporción de

nanopartículas hasta un contenido del 30%: $QTi_{10} < QTi_{20} < QTi_{30} \cong QTi_{40}$. Dado que el nanocompuesto QTi_{30} fue el material con la mayor capacidad de fotodegradación del verde de malaquita y el mayor contenido de TPA-TiO₂, se lo eligió para realizar experimentos tras la irradiación de luz visible Vis-1 y Vis-2 ($\lambda > 450$ nm y $\lambda > 590$ nm, respectivamente).

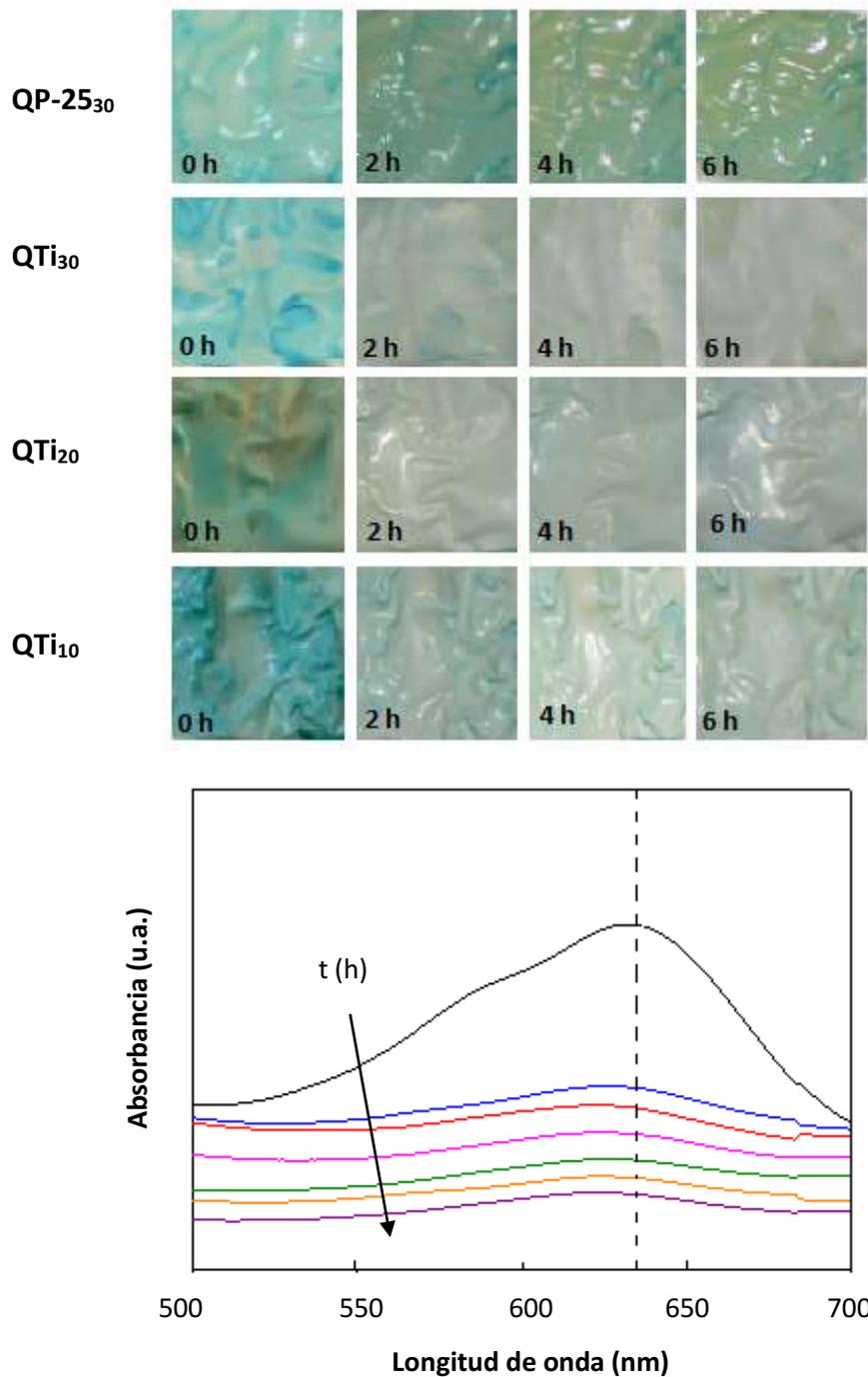


Figura 5.28. (a) Fotografías del proceso de fotodegradación del VM bajo irradiación con luz UV-A+Vis de los nanocompuestos QP-25₃₀ y QTi_{xx} (xx=10, 20 y 30). **(b)** Espectros de absorción DRS obtenidos a intervalos regulares de 1 h después de la irradiación de VM sobre nanocompuestos QTi₃₀ entre 0 y 6 h.

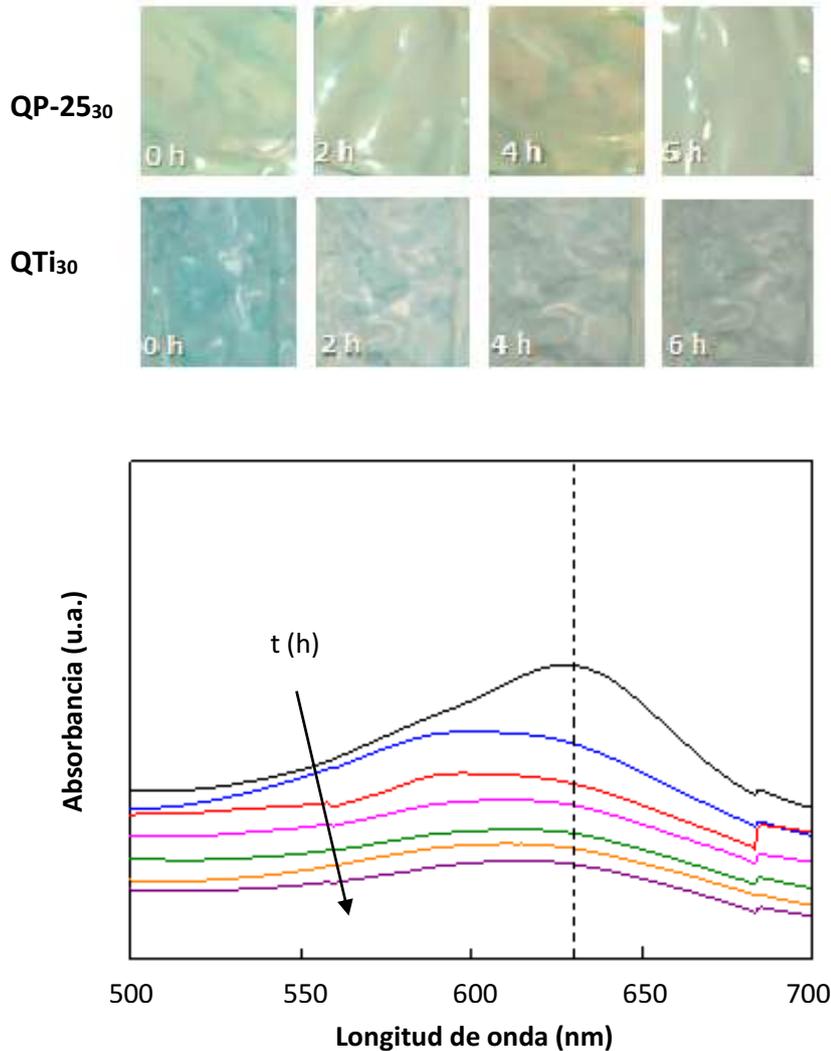


Figura 5.29. (a) Fotografías de fotodegradación de verde de malaquita (VM) bajo irradiación Vis-1 ($\lambda > 450$ nm) de los nanocompuestos QP-25₃₀ y QT₃₀. (b) Espectros de absorción DRS obtenidos después de diferentes tiempos de irradiación de VM sobre nanocompuestos QT₃₀.

Tanto las imágenes como los espectros DRS de las películas QT₃₀ y QP-25₃₀ coloreadas con VM bajo irradiación Vis-1 durante 0, 2, 4 y 6 h (Figura 5.29) revelaron que el nanocompuesto QT₃₀ tuvo mayor actividad de fotodegradación que el QP-25₃₀. El foto-desvanecimiento del colorante VM observado en las películas QP-25₃₀ estuvo relacionado con eventos fotosensibilizados causados por estados excitados del VM. Por otro lado, también bajo este tipo de irradiación, los espectros DRS de verde de malaquita mostraron un desplazamiento hacia el azul de su banda de absorción principal (Figura 5.30).

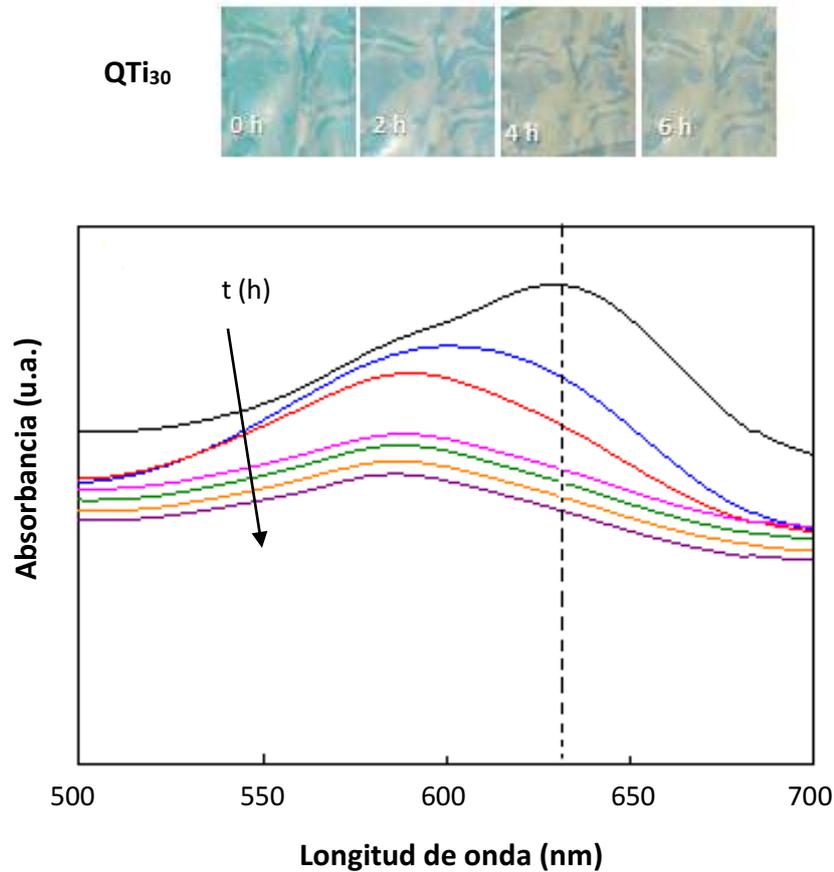


Figura 5.30. (a) Fotografías de fotodegradación de verde de malaquita (VM) bajo irradiación Vis-1 ($\lambda > 450$ nm) de los nanocompuestos QT₃₀. (b) Espectros de absorción DRS obtenidos después de diferentes tiempos de irradiación de VM sobre nanocompuestos QT₃₀.

Finalmente, aunque las imágenes y los espectros DRS de los nanocompuestos QT₃₀ coloreados con VM bajo irradiación de luz visible Vis-2 (Figura 5.30) presentaron características similares a las obtenidas usando Vis-1, se observó un proceso de fotodegradación bastante leve (Figura 5.30).

5.6.2 Evaluación de los ciclos de reutilización

Se evaluó la reutilización de la película con mayor contenido de nanopartículas QT₃₀. La fotodegradación del VM en interfases gas-sólido bajo irradiación (UV-A+ Visible) se llevó a cabo mediante cinco ciclos usando la misma película.

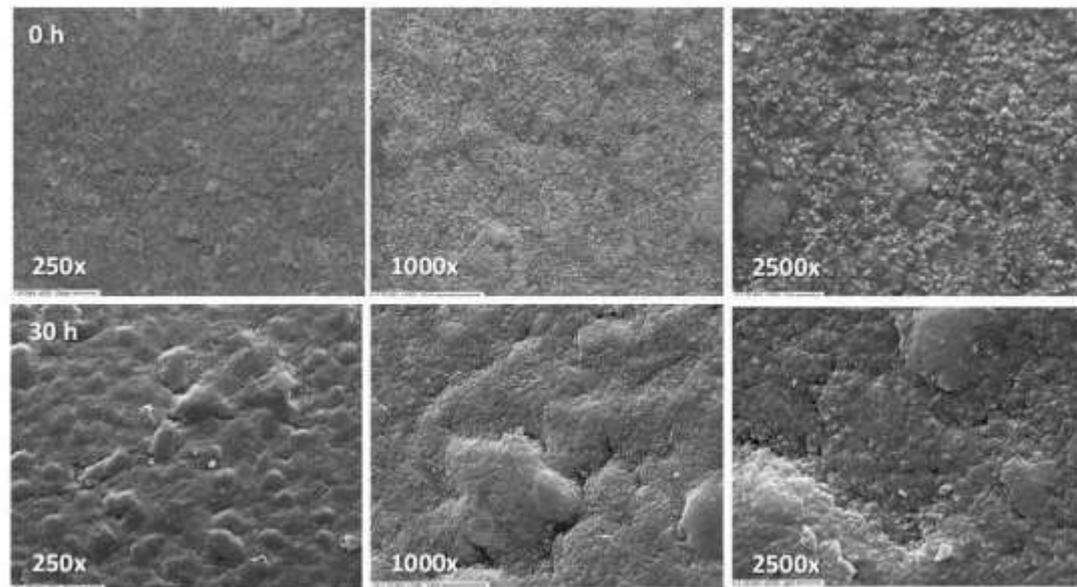


Figura 5.31. Micrográficas obtenidas por SEM de películas QT_{i30} después de 5 ciclos de reutilización (C5).

La [Figura 5.32a](#) muestra que la capacidad de fotodegradación del colorante sobre los nanocompuestos QT_{i30} no sufrió modificaciones al menos después de 5 ciclos de reutilización (30 h de irradiación continua de UV-A+Vis), indicando que estas matrices fueron estables y mantuvieron su capacidad de fotodegradación de VM. Las micrográficas SEM ([Figura 5.31](#)) revelaron que después de 30 h de irradiación con luz UV-A+Vis la morfología de la superficie del nanocompuesto experimentó cambios importantes, con mayor rugosidad en relación al estado inicial.

Con respecto a la reutilización de la película QT_{i30}, se encontró que al aumentar el número de ciclos de utilización, la capacidad de fotodegradación del VM mejoró significativamente. Algunos autores han informado que el pretratamiento con radiación UV fue capaz de mejorar la actividad fotocatalítica de las nanopartículas de TiO₂ sensibles a la luz visible ([Sano y col., 2009](#)). Los autores sugirieron que esta mejora podría estar relacionada con un aumento de los sitios de defectos superficiales, la mejora en la separación de carga y el aumento del número de sitios activos o sitios de adsorción, entre otros. [Mazille y col. \(2009, 2010\)](#) demostraron que las nanopartículas de TiO₂ irradiadas pueden inducir la funcionalización del polímero creando grupos carbonilo por ataque de ROS en la superficie del mismo. La alta rugosidad en los materiales inmovilizados de TiO₂

está estrechamente relacionada con la alta actividad fotocatalítica y la humectabilidad fotoinducida, lo que explicaría que los materiales QTi₃₀ aumentaron su actividad de fotodegradación de VM después de diferentes ciclos de reutilización (Banerjee y col., 2015).

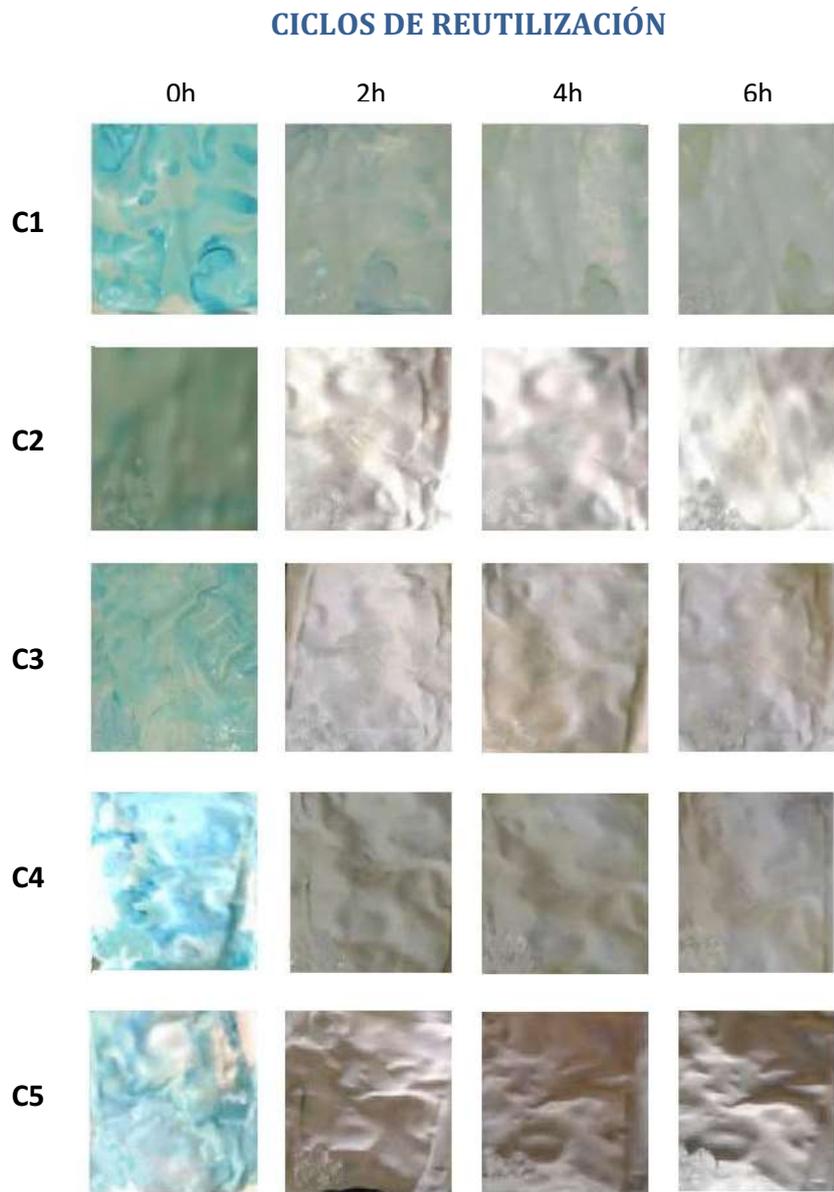


Figura 5.32. Imágenes de verde de malaquita (VM) sobre películas QTi₃₀ fotoblanqueado bajo irradiación con luz UV-A+Vis durante diferentes ciclos de reutilización (Cx, donde x indica el número de ciclo).

5.7 CONCLUSIONES

Se obtuvieron nanoacompuestos combinando una matriz de quitosano con nanopartículas TPA-TiO₂ capaces de absorber en la zona visible del espectro electromagnético. El espectro DRS reveló que estas nanopartículas de TPA-TiO₂ dentro de la película mantuvieron sus características de absorción de luz UV y visible.

La caracterización fisicoquímica mostró que las nanopartículas de titanio modificadas estaban embebidas y bien dispersadas en las películas de quitosano. También se observaron nanopartículas de TPA-TiO₂ cerca de la superficie de la película.

Desde el punto de vista estructural, los estudios por MDSC, SEM, así como el análisis quimiométrico de PCA a partir de los espectros ATR-FTIR, expusieron la existencia de dos fases bien definidas pero afines como también se observó a través del análisis mecánico.

El análisis térmico indicó la mayor estabilidad de la matriz en presencia de NpTi y confirmó la coexistencia de dos fases, una rica en quitosano y la otra en nanopartículas, visible a través de la aparición de dos T_gs.

Con respecto a los experimentos de foto-blanqueo, los nanocompuestos QT_{i30} mostraron el mayor rendimiento de blanqueo de verde de malaquita (VM) fotoinducido tanto con UV-A como con irradiación visible, que fue incluso mayor que el de las películas comerciales QP-25₃₀. Después de 5 ciclos de reutilización (30 h de irradiación continua de UV-A+Vis), QT_{i30} no sufrió modificaciones indicando que estas matrices fueron estables y mantuvieron su capacidad de fotodegradación de VM.

5.8 REFERENCIAS

- Abdou, E. S., Nagy, K. S. A., & Elsabee, M. Z. (2008). Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. *Bioresource Technology*, 99(5), 1359–1367. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.051>
- Afzal, S., Samsudin, E. M., Mun, L. K., Julkapli, N. M., & Hamid, S. B. A. (2017). Room temperature synthesis of TiO₂ supported chitosan photocatalyst: Study on physicochemical and adsorption photo-decolorization properties. *Materials Research Bulletin*, 86, 24–29. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2016.09.028>
- Agrios, A. G., & Pichat, P. (2005). State of the art and perspectives on materials and applications of photocatalysis over TiO₂. *Journal of Applied Electrochemistry*, 35(7–8), 655–663. <https://doi.org/10.1007/s10800-005-1627-6>
- Al-Naamani, L., Dobretsov, S., & Dutta, J. (2016). Chitosan-zinc oxide nanoparticle composite coating for active food packaging applications. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 38, 231–237. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.10.010>
- Al-Sagheer, F. A., & Merchant, S. (2011). Visco-elastic properties of chitosan-titania nanocomposites. *Carbohydrate Polymers*, 85(2), 356–362. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.02.032>
- Al-Sagheer, F., & Muslim, S. (2010). Thermal and mechanical properties of chitosan/SiO₂ hybrid composites. *Journal of Nanomaterials*, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/490679>
- Al-Taweel, S. S., & Saud, H. R. (2016). New route for synthesis of pure anatase TiO₂ nanoparticles via ultrasound-assisted sol-gel method. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8(2), 620–626.
- Al-Taweel, S. S., Saud, H. R., Kadhum, A. A. H., & Takriff, M. S. (2019). The influence of titanium dioxide nanofiller ratio on morphology and surface properties of TiO₂/chitosan nanocomposite. *Results in Physics*, 13, 102296. <https://doi.org/10.1016/j.rinp.2019.102296>
- Alcántara Cobos, A. (2016). *Desarrollo de materiales tio2 modificados con estaño para degradación de fármacos y su efecto toxicológico en especies acuáticas* [Universidad Autónoma del Estado de México]. <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/65695>
- Ali, T., Ahmed, A., Alam, U., Uddin, I., Tripathi, P., & Muneer, M. (2018). Enhanced photocatalytic and antibacterial activities of Ag-doped TiO₂ nanoparticles under visible light. *Materials Chemistry and Physics*, 212, 325–335. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2018.03.052>
- Amin, K. A. M., & in het Panhuis, M. (2012). Reinforced materials based on chitosan, TiO₂ and Ag composites. *Polymers*, 4(1), 590–599. <https://doi.org/10.3390/polym4010590>
- Archana, D., Singh, B. K., Dutta, J., & Dutta, P. K. (2013). In vivo evaluation of chitosan-PVP-titanium dioxide nanocomposite as wound dressing material. *Carbohydrate Polymers*, 95(1), 530–539. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.034>
- Archana, D., Singh, B. K., Dutta, J., & Dutta, P. K. (2015). Chitosan-PVP-nano silver oxide wound dressing: In vitro and in vivo evaluation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 73(1), 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.10.055>

- Asahi, R., Morikawa, T., Ohwaki, T., Aoki, K., & Taga, Y. (2001). Visible-light photocatalysis in nitrogen-doped titanium oxides. *Science*, 293(5528), 269–271. <https://doi.org/10.1126/science.1061051>
- Azizi, S., Ahmad, M. Bin, Hussein, M. Z., Ibrahim, N. A., & Namvar, F. (2014). Preparation and properties of poly(vinyl alcohol)/chitosan blend bionanocomposites reinforced with cellulose nanocrystals/ZnO-Ag multifunctional nanosized filler. *International Journal of Nanomedicine*, 9(1), 1909–1917. <https://doi.org/10.2147/IJN.S60274>
- Ba-Abbad, M. M., K., A. A. H., M., A. B., Takriff, M. S., & Sopian, K. (2012). Synthesis and catalytic activity of TiO₂ nanoparticles for photochemical oxidation of concentrated chlorophenols under direct solar radiation. *International Journal of Electrochemical Science*, 7, 4871–4888. <http://electrochemsci.org/papers/vol7/7064871.pdf>
- Banerjee, S., Dionysiou, D. D., & Pillai, S. C. (2015). Self-cleaning applications of TiO₂ by photo-induced hydrophilicity and photocatalysis. *Applied Catalysis B: Environmental*, 176–177, 396–428. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2015.03.058>
- Boricha, A. G., & Murthy, Z. V. P. (2009). Acrylonitrile butadiene styrene/chitosan blend membranes: Preparation, characterization and performance for the separation of heavy metals. *Journal of Membrane Science*, 339(1–2), 239–249. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2009.04.057>
- Boricha, A. G., & Murthy, Z. V. P. (2010). Preparation of N,O-carboxymethyl chitosan/cellulose acetate blend nanofiltration membrane and testing its performance in treating industrial wastewater. *Chemical Engineering Journal*, 157(2–3), 393–400. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2009.11.025>
- Borrás, A., López, C., Rico, V., Gracia, F., González-Elipe, A. R., Richter, E., Battiston, G., Gerbasi, R., McSparran, N., Sauthier, G., György, E., & Figueras, A. (2007). Effect of visible and UV illumination on the water contact angle of TiO₂ thin films with incorporated nitrogen. *Journal of Physical Chemistry C*, 111(4), 1801–1808. <https://doi.org/10.1021/jp065392w>
- Brammer, K. S., Oh, S., Gallagher, J. O., & Jin, S. (2008). Enhanced cellular mobility guided by TiO₂ nanotube surfaces. *Nano Letters*, 8(3), 786–793. <https://doi.org/10.1021/nl072572o>
- Brinker, C. J., & Scherer, G. W. (2013). Sol-gel science: the physics and chemistry of sol-gel processing. *Academic Press*, . <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-057103-4.50007-6>
- Chang, H., Lv, J., Zhang, H., Zhang, B., Wei, W., & Qiao, Y. (2017). Photoresponsive colorimetric immunoassay based on chitosan modified AgI/TiO₂ heterojunction for highly sensitive chloramphenicol detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 87, 579–586. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.09.002>
- Chang, H. T., Wu, N. M., & Zhu, F. (2000). A kinetic model for photocatalytic degradation of organic contaminants in a thin-film TiO₂ catalyst. *Water Research*, 34(2), 407–416. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(99\)00247-X](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(99)00247-X)
- Chen, X., & Mao, S. S. (2007). Titanium dioxide nanomaterials: Synthesis, properties, modifications and applications. *Chemical Reviews*, 107(7), 2891–2959. <https://doi.org/10.1021/cr0500535>
- Chen, Y., Yan, L., Yuan, T., Zhang, Q., & Fan, H. (2010). Asymmetric Polyurethane Membrane with

- In Situ- Generated Nano-TiO₂ as Wound Dressing. *Journal of Applied Polymer Science*, 119, 1532–1541. <https://doi.org/10.1002/app.32813>
- Chung, Y. C., Kuo, C. L., & Chen, C. C. (2005). Preparation and important functional properties of water-soluble chitosan produced through Maillard reaction. *Bioresource Technology*, 96(13), 1473–1482. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.12.001>
- Damonte, L. C., Taylor, M. A., Desimoni, J., & Runco, J. (2007). PALS study on the defect structure of yttria-stabilized zirconia. *Radiation Physics and Chemistry*, 76(2), 248–251. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2006.03.046>
- de Moura, M. R., Aouada, F. A., Avena-Bustillos, R. J., McHugh, T. H., Krochta, J. M., & Mattoso, L. H. C. (2009). Improved barrier and mechanical properties of novel hydroxypropyl methylcellulose edible films with chitosan/tripolyphosphate nanoparticles. *Journal of Food Engineering*, 92(4), 448–453. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.12.015>
- Devanand Venkatasubbu, G., Ramasamy, S., Ramakrishnan, V., & Kumar, J. (2013). Folate targeted PEGylated titanium dioxide nanoparticles as a nanocarrier for targeted paclitaxel drug delivery. *Advanced Powder Technology*, 24(6), 947–954. <https://doi.org/10.1016/j.appt.2013.01.008>
- Detle, C., Pérez-Osorio, M. A., Mangel, S., Giustino, F., Jung, S. J., & Kern, K. (2018). Atomic structure of water monolayer on anatase TiO₂ (101) surface. *The Journal of Physical Chemistry C*, 122(22), 11954–11960. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b04210>
- Deveci, I., Doğaç, Y. I., Teke, M., & Mercimek, B. (2015). Synthesis and characterization of chitosan/TiO₂ composite beads for improving stability of porcine pancreatic lipase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(2), 1052–1068. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1321-4>
- Dislich, H. (1971). New Routes to Multicomponent Oxide Glasses. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 10(6), 363–370. <https://doi.org/10.1002/anie.197103631>
- Ebraheem, S., & El-Saied, A. (2013). Band Gap Determination from Diffuse Reflectance Measurements of Irradiated Lead Borate Glass System Doped with TiO₂ by Using Diffuse Reflectance Technique. *Materials Sciences and Applications*, 04(05), 324–329. <https://doi.org/10.4236/msa.2013.45042>
- El-Gamal, S., & Elsayed, M. (2020). Synthesis, structural, thermal, mechanical, and nano-scale free volume properties of novel PbO/PVC/PMMA nanocomposites. *Polymer*, 206, 122911. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2020.122911>
- El-Mekkawi, D. M., Labib, A. A., Mousa, H. A., Galal, H. R., & Mohamed, W. A. A. (2017). Preparation and characterization of nano titanium dioxide photocatalysts via sol gel method over narrow ranges of varying parameters. *Oriental Journal of Chemistry*, 33(1), 41–51. <https://doi.org/10.13005/ojc/330105>
- El-Wakil, N. A., Hassan, E. A., Abou-Zeid, R. E., & Dufresne, A. (2015). Development of wheat gluten/nanocellulose/titanium dioxide nanocomposites for active food packaging. *Carbohydrate Polymers*, 124, 337–346. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.01.076>
- Etacheri, V., Di Valentin, C., Schneider, J., Bahnemann, D., & Pillai, S. C. (2015). Visible-light activation of TiO₂ photocatalysts: Advances in theory and experiments. *Journal of*

- Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 25, 1–29. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2015.08.003>
- Fan, X., Chen, K., He, X., Li, N., Huang, J., Tang, K., Li, Y., & Wang, F. (2016). Nano-TiO₂/collagen-chitosan porous scaffold for wound repairing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.05.094>
- Fang, C. S., & Chen, Y. W. (2003). Preparation of titania particles by thermal hydrolysis of TiCl₄ in n-propanol solution. *Materials Chemistry and Physics*, 78(3), 739–745. [https://doi.org/10.1016/S0254-0584\(02\)00416-9](https://doi.org/10.1016/S0254-0584(02)00416-9)
- Fateh, R., Dillert, R., & Bahnemann, D. (2014). Self-cleaning properties, mechanical stability, and adhesion strength of transparent photocatalytic TiO₂-ZnO coatings on polycarbonate. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 6(4), 2270–2278. <https://doi.org/10.1021/am4051876>
- Fuchs, V. M., Soto, E. L., Blanco, M. N., & Pizzio, L. R. (2008). Direct modification with tungstophosphoric acid of mesoporous titania synthesized by urea-templated sol-gel reactions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 327(2), 403–411. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.08.045>
- Fujishima, A., Zhang, X., & Tryk, D. A. (2008). TiO₂ photocatalysis and related surface phenomena. *Surface Science Reports*, 63(12), 515–582. <https://doi.org/10.1016/j.surfrep.2008.10.001>
- Gaminian, H., & Montazer, M. (2015). Enhanced Self-Cleaning Properties on Polyester Fabric under Visible Light Through Single-Step Synthesis of Cuprous Oxide Doped Nano-TiO₂. *Photochemistry and Photobiology*, 91(5), 1078–1087. <https://doi.org/10.1111/php.12478>
- Gaminian, H., & Montazer, M. (2017). Simultaneous nano TiO₂ sensitization, application and stabilization on polyester fabric using madder and NaOH producing enhanced self-cleaning with hydrophilic properties under visible light. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 332, 158–166. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2016.08.022>
- Gao, L., Gan, W., Qiu, Z., Zhan, X., Qiang, T., & Li, J. (2017). Preparation of heterostructured WO₃/TiO₂ catalysts from wood fibers and its versatile photodegradation abilities. *Scientific Reports*, 7(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01244-y>
- Gázquez González, M. (2010). *Caracterización y valorización de residuos generados en la industria de producción de dióxido de titanio*. Universidad de Huelva. Departamento de Física Aplicada
- Grassian, V. H., O’Shaughnessy, P. T., Adamcakova-Dodd, A., Pettibone, J. M., & Thorne, P. S. (2007). Inhalation exposure study of Titanium dioxide nanoparticles with a primary particle size of 2 to 5 nm. *Environmental Health Perspectives*, 115(3), 397–402. <https://doi.org/10.1289/ehp.9469>
- Haldorai, Y., & Shim, J.-J. (2014). Novel Chitosan-TiO₂ Nanohybrid: Preparation, characterization, antibacterial, and photocatalytic properties. *Polymer Composites*, 35, 327-333. <https://doi.org/10.1002/pc.22665>
- Handojo, A., Zhai, Y., Frankel, G., & Pascall, M. A. (2009). Measurement of adhesion strengths between various milk products on glass surfaces using contact angle measurement and atomic force microscopy. *Journal of Food Engineering*, 92(3), 305–311. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.11.018>

- Hashimoto, K., Irie, H., & Fujishima, A. (2005). TiO₂ photocatalysis: A historical overview and future prospects. *Japanese Journal of Applied Physics, Part 1: Regular Papers and Short Notes and Review Papers*, 44(12), 8269–8285. <https://doi.org/10.1143/JJAP.44.8269>
- Hathway, T., Rockafellow, E. M., Oh, Y. C., & Jenks, W. S. (2009). Photocatalytic degradation using tungsten-modified TiO₂ and visible light: Kinetic and mechanistic effects using multiple catalyst doping strategies. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 207(2–3), 197–203. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2009.07.010>
- Homayoonfal, M., Mehrnia, M. R., Mojtahedi, Y. M., & Ismail, A. F. (2013). Effect of metal and metal oxide nanoparticle impregnation route on structure and liquid filtration performance of polymeric nanocomposite membranes: A comprehensive review. *Desalination and Water Treatment*, 51(16–18), 3295–3316. <https://doi.org/10.1080/19443994.2012.749055>
- Ibhadon, A. O., & Fitzpatrick, P. (2013). Heterogeneous photocatalysis: Recent advances and applications. *Catalysts*, 3(1), 189–218. <https://doi.org/10.3390/catal3010189>
- Irie, H., Washizuka, S., Yoshino, N., & Hashimoto, K. (2003). Visible-light induced hydrophilicity on nitrogen-substituted titanium dioxide films. *Chemical Communications*, 3(11), 1298–1299. <https://doi.org/10.1039/b302975a>
- Kamal, T., Anwar, Y., Khan, S. B., Chani, M. T. S., & Asiri, A. M. (2016). Dye adsorption and bactericidal properties of TiO₂/chitosan coating layer. *Carbohydrate Polymers*, 148, 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.042>
- Kamari, Y., & Ghiaci, M. (2016). Preparation and characterization of ibuprofen/modified chitosan/TiO₂ hybrid composite as a controlled drug-delivery system. *Microporous and Mesoporous Materials*, 234, 361–369. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2016.07.030>
- Kimiagar, S., & Mohammadzadeh, M. R. (2013). N-doped TiO₂ nanothin films: Photocatalytic and hydrophilicity properties. *EPJ Applied Physics*, 61(1), 1–5. <https://doi.org/10.1051/epjap/2012120294>
- Kumar, S. G., & Rao, K. S. R. K. (2014). Polymorphic phase transition among the titania crystal structures using a solution-based approach: From precursor chemistry to nucleation process. *Nanoscale*, 6(20), 11574–11632. <https://doi.org/10.1039/c4nr01657b>
- Kumbar, S. M., Shanbhag, G. V., Lefebvre, F., & Halligudi, S. B. (2006). Heteropoly acid supported on titania as solid acid catalyst in alkylation of p-cresol with tert-butanol. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 256(1–2), 324–334. <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2006.05.024>
- Kuo, C. S., Tseng, Y. H., Huang, C. H., & Li, Y. Y. (2007). Carbon-containing nano-titania prepared by chemical vapor deposition and its visible-light-responsive photocatalytic activity. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 270(1–2), 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2007.01.031>
- Kusano, D., Emori, M., & Sakama, H. (2017). Influence of electronic structure on visible light photocatalytic activity of nitrogen-doped TiO₂. *RSC Advances*, 7(4), 1887–1898. <https://doi.org/10.1039/c6ra25238a>
- Lamarra, J., Giannuzzi, L., Rivero, S., & Pinotti, A. (2017). Assembly of chitosan support matrix with gallic acid-functionalized nanoparticles. *Materials Science and Engineering C*, 79, 848–859.

<https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.104>

- Lamarra, Javier andres. (2019). *MATRICES BIODEGRADABLES COMO SOPORTES DE MICRO Y NANOPARTÍCULAS ACTIVAS PARA SU APLICACIÓN COMO SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA* [Universidad Nacional de la Plata]. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/75093>
- Langford, J. I., & Wilson, A. J. C. (1978). Seherrer after Sixty Years: A Survey and Some New Results in the Determination of Crystallite Size. *Journal of Applied Crystallography*, 11(2), 102–113. <https://doi.org/10.1107/S0021889878012844>
- Latt, K. K., & Kobayashi, T. (2008). TiO₂ nanosized powders controlling by ultrasound sol-gel reaction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(4), 484–491. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2007.08.001>
- Lewandowska, K. (2015). Characterization of chitosan composites with synthetic polymers and inorganic additives. *International Journal of Biological Macromolecules*, 81, 159–164. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.08.003>
- Li, D., Zeng, S., He, M., & Gu, A. Z. (2016). Water Disinfection Byproducts Induce Antibiotic Resistance-Role of Environmental Pollutants in Resistance Phenomena. *Environmental Science and Technology*, 50(6), 3193–3201. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05113>
- Li, G., Yue, J., Guo, C., & Ji, Y. (2018). Influences of modified nanoparticles on hydrophobicity of concrete with organic film coating. *Construction and Building Materials*, 169, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2018.02.191>
- Li, Jie, Zheng, J., Zhang, J., & Feng, J. (2016). Fabrication of TiO₂/PU superhydrophobic film by nanoparticle assisted cast micromolding process. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 16(6), 5875–5879. <https://doi.org/10.1166/jnn.2016.11737>
- Li, Jinhuan, Kang, W., Yang, X., Yu, X., Xu, L., Guo, Y., Fang, H., & Zhang, S. (2010). Mesoporous titania-based H3PW12O₄₀ composite by a block copolymer surfactant-assisted templating route: Preparation, characterization, and heterogeneous photocatalytic properties. *Desalination*, 255(1–3), 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2010.01.007>
- Li, L., Deng, J., Deng, H., Liu, Z., & Li, X. (2010). Preparation, characterization and antimicrobial activities of chitosan / Ag / ZnO blend films. *Chemical Engineering Journal*, 160 (1)(March 2010), 378–382. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2010.03.051>
- Li, Q., Su, H., & Tan, T. (2008). Synthesis of ion-imprinted chitosan-TiO₂ adsorbent and its multi-functional performances. *Biochemical Engineering Journal*, 38(2), 212–218. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.07.007>
- Liao, D. L., Wu, G. S., & Liao, B. Q. (2009). Zeta potential of shape-controlled TiO₂ nanoparticles with surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 348(1–3), 270–275. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2009.07.036>
- Lipatov, Y. S., & Alekseeva, T. T. (2007). Phase-separated interpenetrating polymer networks. In *POLYMER* (Issue September, pp. 1–227). https://doi.org/10.1007/12_2007_116
- Liu, A. R., Wang, S. M., Zhao, Y. R., & Zheng, Z. (2006). Low-temperature preparation of nanocrystalline TiO₂ photocatalyst with a very large specific surface area. *Materials Chemistry and Physics*, 99(1), 131–134. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2005.10.003>

- Liu, K., Cao, M., Fujishima, A., & Jiang, L. (2014). Bio-inspired titanium dioxide materials with special wettability and their applications. *Chemical Reviews*, *114*(19), 10044–10094. <https://doi.org/10.1021/cr4006796>
- Liu, R., Zhou, X., Yang, F., & Yu, Y. (2014). Combination study of DFT calculation and experiment for photocatalytic properties of S-doped anatase TiO₂. *Applied Surface Science*, *319*(1), 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.07.132>
- Liu, X., Luo, L., Ding, Y., Xu, Y., & Li, F. (2011). Hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of horseradish peroxidase on γ -Al₂O₃ nanoparticles/chitosan film-modified electrode. *Journal of Solid State Electrochemistry*, *15*(3), 447–453. <https://doi.org/10.1007/s10008-010-1120-y>
- Livraghi, S., Chierotti, M. R., Giamello, E., Magnacca, G., Paganini, M. C., Cappelletti, G., & Bianchi, C. L. (2008). Nitrogen-doped titanium dioxide active in photocatalytic reactions with visible light: A multi-technique characterization of differently prepared materials. *Journal of Physical Chemistry C*, *112*(44), 17244–17252. <https://doi.org/10.1021/jp803806s>
- Livraghi, S., Czoska, A. M., Paganini, M. C., & Giamello, E. (2009). Preparation and spectroscopic characterization of visible light sensitized N doped TiO₂ (rutile). *Journal of Solid State Chemistry*, *182*(1), 160–164. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2008.10.012>
- Livraghi, S., Pelaez, M., Biedrzycki, J., Corazzari, I., Giamello, E., & Dionysiou, D. D. (2013). Influence of the chemical synthesis on the physicochemical properties of N-TiO₂ nanoparticles. *Catalysis Today*, *209*, 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2012.12.020>
- Look, J. -L., & Zukoski, C. F. (1995). Colloidal Stability and Titania Precipitate Morphology: Influence of Short-Range Repulsions. In *Journal of the American Ceramic Society* (Vol. 78, Issue 1, pp. 21–32). <https://doi.org/10.1111/j.1151-2916.1995.tb08356.x>
- Loryuenyong, V., Angamnuaysiri, K., Sukcharoenpong, J., & Suwannasri, A. (2012). Sol-gel derived mesoporous titania nanoparticles: Effects of calcination temperature and alcoholic solvent on the photocatalytic behavior. *Ceramics International*, *38*(3), 2233–2237. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2011.10.072>
- Lu, N., Zhao, Y., Liu, H., Guo, Y., Yuan, X., Xu, H., Peng, H., & Qin, H. (2012). Design of polyoxometallate-titania composite film (H₃PW₁₂O₄₀/TiO₂) for the degradation of an aqueous dye Rhodamine B under the simulated sunlight irradiation. *Journal of Hazardous Materials*, *199–200*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.08.070>
- Luna-Flores, A., Sosa-Sánchez, J. L., Morales-Sánchez, M. A., Agustín-Serrano, R., & Luna-López, J. A. (2017). An easy-made, economical and efficient carbon-doped amorphous TiO₂ photocatalyst obtained by microwave assisted synthesis for the degradation of Rhodamine B. *Materials*, *10*(12). <https://doi.org/10.3390/ma10121447>
- Khan, A., Khan, R. A., Salmieri, S., Le Tien, C., Riedl, B., Bouchard, J., & Lacroix, M. (2012). Mechanical and barrier properties of nanocrystalline cellulose reinforced chitosan based nanocomposite films. *Carbohydrate Polymers*, *90*(4), 1601–1608. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.07.037>
- Mafirad, S., Mehrnia, M. R., Zahedi, P., & Hosseini, S.-N. (2017). Chitosan-Based Nanocomposite Membranes With Improved Properties: Effect of Cellulose Acetate Blending and TiO₂

- Nanoparticles Incorporation. *Polymer Composites*, 39(12), 4452–4466. <https://doi.org/10.1002/pc.24539>
- Mahshid, S., Askari, M., & Ghamsari, M. S. (2007). Synthesis of TiO₂ nanoparticles by hydrolysis and peptization of titanium isopropoxide solution. *Journal of Materials Processing Technology*, 189(1–3), 296–300. <https://doi.org/10.1016/j.jmatprotec.2007.01.040>
- Mallakpour, S., & Madani, M. (2015). Effect of Functionalized TiO₂ on Mechanical, Thermal and Swelling Properties of Chitosan-Based Nanocomposite Films. *Polymer - Plastics Technology and Engineering*, 54(10), 1035–1042. <https://doi.org/10.1080/03602559.2014.974194>
- Marín-Silva, D. A., Rivero, S., & Pinotti, A. (2019). Chitosan-based nanocomposite matrices: Development and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 123, 189–200. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.035>
- Marin, J. M., Montoya, J., Monsalve, E., Granda, C. F., Rios, L. A., & Restrepo, G. (2007). Degradacion de naranja de metilo en un nuevo fotorreactor solar de placa plana con superficie corrugada. *Scientia et Technica*, 2(34), 435–440. <https://doi.org/10.22517/23447214.5667>
- Martínez Sanmartin, R. (2019). *Desarrollo de recubrimientos basados en óxidos metálicos* [Universidad Pública de Navarra]. file:///D:/Users/Core i5/Downloads/Desarrollo de decubrimientos basados en óxidos metálicos.pdf
- Matsunaga, T., Tomoda, R., Nakajima, T., & Wake, H. (1985). Photoelectrochemical sterilization of microbial cells by semiconductor powders (Sterilization; semiconductor; Saccharomyces cereoisiae; coenzyme A). *FEMS Microbiology Letters*, 29, 211–214.
- Mazille, F., Moncayo-Lasso, A., Spuhler, D., Serra, A., Peral, J., Benítez, N. L., & Pulgarin, C. (2010). Comparative evaluation of polymer surface functionalization techniques before iron oxide deposition. Activity of the iron oxide-coated polymer films in the photo-assisted degradation of organic pollutants and inactivation of bacteria. *Chemical Engineering Journal*, 160(1), 176–184. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2010.03.035>
- Mazille, F., Schoettl, T., & Pulgarin, C. (2009). Synergistic effect of TiO₂ and iron oxide supported on fluorocarbon films. Part 1: Effect of preparation parameters on photocatalytic degradation of organic pollutant at neutral pH. *Applied Catalysis B: Environmental*, 89(3–4), 635–644. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2009.01.027>
- Mendoza-Portillo, E. (2018). Evaluación de propiedades fotocatalíticas de dióxido de titanio en la degradación de contaminantes orgánicos. In *Universidad San Agustín de Arequipa*. <http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/6925/EDMcccacm.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- Nadeem, I. M., Treacy, J. P., Selcuk, S., Torrelles, X., Hussain, H., Wilson, A., & Thornton, G. (2018). Water dissociates at the aqueous interface with reduced anatase TiO₂ (101). *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 9(11), 3131–3136. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.8b01182>
- Naghibi, S., Sani, M. A. F., & Hosseini, H. R. M. (2014). Application of the statistical Taguchi method to optimize TiO₂ nanoparticles synthesis by the hydrothermal assisted sol-gel technique. *Ceramics International*, 40(3), 4193–4201. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2013.08.077>

- Nawi, M. A., Jawad, A. H., Sabar, S., & Ngah, W. S. W. (2011). Immobilized bilayer TiO₂/chitosan system for the removal of phenol under irradiation by a 45watt compact fluorescent lamp. *Desalination*, 280(1–3), 288–296. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2011.07.013>
- Németh, Z., Horváth, E., Magrez, A., Réti, B., Berki, P., Forró, L., & Hernádi, K. (2015). Preparation of titania covered multi-walled carbon nanotube thin films. *Materials and Design*, 86, 198–203. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2015.07.048>
- Neto, C. G. T., Giacometti, J. A., Job, A. E., Ferreira, F. C., Fonseca, J. L. C., & Pereira, M. R. (2005). Thermal analysis of chitosan based networks. *Carbohydrate Polymers*, 62(2), 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.02.022>
- Nie, H. L., & Zhu, L. M. (2007). Adsorption of papain with Cibacron Blue F3GA carrying chitosan-coated nylon affinity membranes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 40(3), 261–267. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2006.08.005>
- Norranattrakul, P. (2013). Fabrication of chitosan/titanium dioxide composites film for the photocatalytic degradation of dye. *Journal of Metals, Materials and Minerals*, 23(2), 9–22. <http://www.ojs.materialsconnex.com/index.php/jmmm/article/view/59>
- Ochiai, T., & Fujishima, A. (2012). Photoelectrochemical properties of TiO₂ photocatalyst and its applications for environmental purification. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 13(4), 247–262. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2012.07.001>
- Peng, L., Eltgroth, M. L., LaTempa, T. J., Grimes, C. A., & Desai, T. A. (2009). The effect of TiO₂ nanotubes on endothelial function and smooth muscle proliferation. *Biomaterials*, 30(7), 1268–1272. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.11.012>
- Pérez-Obando, J., Marín-Silva, D. A., Pinotti, A. N., Pizzio, L. R., Osorio-Vargas, P., & Rengifo-Herrera, J. A. (2019). Degradation study of malachite green on chitosan films containing heterojunctions of melon/TiO₂ absorbing visible-light in solid-gas interfaces. *Applied Catalysis B: Environmental*, 244, 773–785. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2018.12.004>
- Powell, M. J., Dunnill, C. W., & Parkin, I. P. (2014). N-doped TiO₂ visible light photocatalyst films via a sol-gel route using TMEDA as the nitrogen source. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 281, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2014.03.003>
- Premkumar, J. (2004). Development of super-hydrophilicity on nitrogen-doped TiO₂ thin film surface by photoelectrochemical method under visible light. *Chemistry of Materials*, 16(21), 3980–3981. <https://doi.org/10.1021/cm049055g>
- Qian, T., Su, H., & Tan, T. (2011). The bactericidal and mildew-proof activity of a TiO₂-chitosan composite. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 218(1), 130–136. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2010.12.012>
- Rabea, E. I., Badawy, M. E. T., Stevens, C. V., Smagghe, G., & Steurbaut, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4(6), 1457–1465. <https://doi.org/10.1021/bm034130m>
- Raut, A. V., Yadav, H. M., Gnanamani, A., Pushpavanam, S., & Pawar, S. H. (2016). Synthesis and characterization of chitosan-TiO₂:Cu nanocomposite and their enhanced antimicrobial activity with visible light. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 148, 566–575.

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.09.028>

- Rengifo-Herrera, J. A., Blanco, M. N., & Pizzio, L. R. (2011). Photocatalytic bleaching of aqueous malachite green solutions by UV-A and blue-light-illuminated TiO₂ spherical nanoparticles modified with tungstophosphoric acid. *Applied Catalysis B: Environmental*, 110, 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2011.08.034>
- Rengifo-Herrera, J.A., Marín-Silva, D. A., Mendoza-Portillo, E., Pinotti, A. N., & Pizzio, L. R. (2018). Chitosan films containing TiO₂ nanoparticles modified with tungstophosphoric acid for the photobleaching of malachite green in solid-gas interfaces upon different wavelengths. *Molecular Catalysis*, 448. <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2018.01.015>
- Rengifo-Herrera, Julián A., Blanco, M. N., & Pizzio, L. R. (2014). Visible light absorption of TiO₂ materials impregnated with tungstophosphoric acid ethanol-aqueous solution at different pH values. Evidence about the formation of a surface complex between Keggin anion and TiO₂ surfaces. *Materials Research Bulletin*, 49(1), 618–624. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2013.09.043>
- Rengifo-Herrera, Julián A., Blanco, M., Wist, J., Florian, P., & Pizzio, L. R. (2016). TiO₂ modified with polyoxotungstates should induce visible-light absorption and high photocatalytic activity through the formation of surface complexes. *Applied Catalysis B: Environmental*, 189, 99–109. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2016.02.033>
- Rengifo-Herrera, Julián A., Marín-Silva, D. A., Mendoza-Portillo, E., Pinotti, A. N., & Pizzio, L. R. (2018a). Chitosan films containing TiO₂ nanoparticles modified with tungstophosphoric acid for the photobleaching of malachite green in solid-gas interfaces upon different wavelengths. *Molecular Catalysis*, 448, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2018.01.015>
- Rengifo-Herrera, Julián A., Marín-Silva, D. A., Mendoza-Portillo, E., Pinotti, A. N., & Pizzio, L. R. (2018b). Chitosan films containing TiO₂ nanoparticles modified with tungstophosphoric acid for the photobleaching of malachite green in solid-gas interfaces upon different wavelengths. *Molecular Catalysis*, 448, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2018.01.015>
- Romero-Bastida, C. A., Tapia-Blácido, D. R., Méndez-Montealvo, G., Bello-Pérez, L. A., Velázquez, G., & Alvarez-Ramirez, J. (2016). Effect of amylose content and nanoclay incorporation order in physicochemical properties of starch/montmorillonite composites. *Carbohydrate Polymers*, 152, 351–360. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.07.009>
- Salehi, E., Madaeni, S. S., Rajabi, L., Vatanpour, V., Derakhshan, A. A., Zinadini, S., Ghorabi, S., & Ahmadi Monfared, H. (2012). Novel chitosan/poly(vinyl) alcohol thin adsorptive membranes modified with amino functionalized multi-walled carbon nanotubes for Cu(II) removal from water: Preparation, characterization, adsorption kinetics and thermodynamics. *Separation and Purification Technology*, 89, 309–319. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2012.02.002>
- Sano, T., Puzenat, E., Guillard, C., Geantet, C., Matsuzawa, S., & Negishi, N. (2009). Improvement of photocatalytic degradation activity of visible-light-responsive TiO₂ by aid of ultraviolet-light pretreatment. *Journal of Physical Chemistry C*, 113(14), 5535–5540. <https://doi.org/10.1021/jp808032y>
- Selvia, R. T., A.P.S.Prasanna, R.Niranjan, M.Kaushik, T.Devasena, J.Kumar, Ramachandran, HellihaDeog-HwanOh, S.Swaminathan, & Venkatasubbu, G. D. (2018). Metal oxide curcumin

- incorporated polymer patches for wound healing. *Applied Surface Science*, 449, 603–609. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.01.143>
- Shen, S. S., Yang, J. J., Liu, C. X., & Bai, R. B. (2017). Immobilization of copper ions on chitosan/cellulose acetate blend hollow fiber membrane for protein adsorption. *RSC Advances*, 7(17), 10424–10431. <https://doi.org/10.1039/c7ra00148g>
- Sivaselvi, K., & Ghosh, P. (2017). Characterization of modified Chitosan thin film. *Materials Today: Proceedings*, 4(2), 442–451. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2017.01.043>
- Sun, J., Wu, L., & Chen, J. (2016). Efficient lysozyme adsorption on chitosan/hydroxyapatite hybrid membrane via in situ synthesis. *Cellulose*, 23(6), 3861–3874. <https://doi.org/10.1007/s10570-016-1062-3>
- Svang-Ariyaskul, A., Huang, R. Y. M., Douglas, P. L., Pal, R., Feng, X., Chen, P., & Liu, L. (2006). Blended chitosan and polyvinyl alcohol membranes for the pervaporation dehydration of isopropanol. *Journal of Membrane Science*, 280(1–2), 815–823. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2006.03.001>
- Tang, C., Chen, N., Zhang, Q., Wang, K., Fu, Q., & Zhang, X. (2009). Preparation and properties of chitosan nanocomposites with nanofillers of different dimensions. *Polymer Degradation and Stability*, 94(1), 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2008.09.008>
- Tasselli, F., Mirmohseni, A., Seyed Dorraji, M. S., & Figoli, A. (2013). Mechanical, swelling and adsorptive properties of dry-wet spun chitosan hollow fibers crosslinked with glutaraldehyde. *Reactive and Functional Polymers*, 73(1), 218–223. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2012.08.007>
- Teoh, W. Y., Scott, J. A., & Amal, R. (2012). Progress in heterogeneous photocatalysis: From classical radical chemistry to engineering nanomaterials and solar reactors. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 3(5), 629–639. <https://doi.org/10.1021/jz3000646>
- Theivasanthi, T., & Alagar, M. (2013). Titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles XRD analyses: an insight. *ArXiv Preprint ArXiv*, 1307–1091. <https://arxiv.org/abs/1307.1091>
- Tong, H., Ouyang, S., Bi, Y., Umezawa, N., Oshikiri, M., & Ye, J. (2012). Nano-photocatalytic materials: Possibilities and challenges. *Advanced Materials*, 24(2), 229–251. <https://doi.org/10.1002/adma.201102752>
- Vaiano, V., Sarno, G., Ciambelli, P., & Sannino, D. (2014). Functionalization of ceramic tiles with N-doped TiO₂ and their photocatalytic function under UV or visible light irradiation. *Journal of Advanced Oxidation Technologies*, 17(2), 193–201. <https://doi.org/10.1515/jaots-2014-0204>
- Vargas-Urbano, M. A., Ochoa-Muñoz, Y. H., Ortegón-Fernández, Y., Páez-Mosquera, P., Rodríguez, J. E., & Camargo-Amado, R. J. (2011). Nanopartículas de TiO₂, fase anatasa, sintetizadas por métodos químicos. *Ingeniería y Desarrollo*, 29(2), 186–201. <https://www.redalyc.org/pdf/852/85220757005.pdf>
- Venkatesan, J., & Kim, S. K. (2010). Chitosan composites for bone tissue engineering - An overview. *Marine Drugs*, 8(8), 2252–2266. <https://doi.org/10.3390/md8082252>
- Verbruggen, S. W., Keulemans, M., Filippousi, M., Flahaut, D., Van Tendeloo, G., Lacombe, S., Martens, J. A., & Lenaerts, S. (2014). Plasmonic gold-silver alloy on TiO₂ photocatalysts with

- tunable visible light activity. *Applied Catalysis B: Environmental*, 156–157(2014), 116–121. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2014.03.027>
- Villarruel, S., Giannuzzi, L., Rivero, S., & Pinotti, A. (2015). Changes induced by UV radiation in the presence of sodium benzoate in films formulated with polyvinyl alcohol and carboxymethyl cellulose. *Materials Science and Engineering C*, 56, 545–554. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.07.003>
- Vorkapic, D., & Matsoukas, T. (1998). Effect of temperature and alcohols in the preparation of titania nanoparticles from alkoxides. *Journal of the American Ceramic Society*, 81(11), 2815–2820. <https://doi.org/10.1111/j.1151-2916.1998.tb02701.x>
- Wang, R., Hashimoto, K., Fujishima, A., Chikuni, M., Kojima, E., Kitamura, A., Shimohigoshi, M., & Watanabe, T. (1997). Light-induced amphiphilic surfaces. *Nature*, 388(6641), 431–432. <https://doi.org/10.1038/41233>
- Wang, S. F., Shen, L., Tong, Y. J., Chen, L., Phang, I. Y., Lim, P. Q., & Liu, T. X. (2005). Biopolymer chitosan/montmorillonite nanocomposites: Preparation and characterization. *Polymer Degradation and Stability*, 90(1), 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2005.03.001>
- Wang, S.J., Liu, L. M., Fang, P.F., Chen, Z., Wang, H.M., & Zhang, S.P. (2007). Microstructure of polymer–clay nanocomposites studied by positrons. *Radiation Physics and Chemistry*, 76(2), 106–111.
- Wang, Y., Wu, Y., Yang, H., Xue, X., & Liu, Z. (2016). Doping TiO₂ with boron or/and cerium elements: Effects on photocatalytic antimicrobial activity. *Vacuum*, 131, 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.vacuum.2016.06.003>
- Watson, S. S., Beydoun, D., Scott, J. A., & Amal, R. (2003). The effect of preparation method on the photoactivity of crystalline titanium dioxide particles. *Chemical Engineering Journal*, 95(1–3), 213–220. [https://doi.org/10.1016/S1385-8947\(03\)00107-4](https://doi.org/10.1016/S1385-8947(03)00107-4)
- Wist, J., Sanabria, J., Dierolf, C., Torres, W., & Pulgarin, C. (2002). Evaluation of photocatalytic disinfection of crude water for drinking-water production. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 147(3), 241–246. [https://doi.org/10.1016/S1010-6030\(01\)00615-3](https://doi.org/10.1016/S1010-6030(01)00615-3)
- Wu, D., Wang, L., Song, X., & Tan, Y. (2013). Enhancing the visible-light-induced photocatalytic activity of the self-cleaning TiO₂-coated cotton by loading Ag/AgCl nanoparticles. *Thin Solid Films*, 540, 36–40. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2013.05.113>
- Wu, L., Yu, Y., & Zhi, J. (2015). Low cost and large-area fabrication of self-cleaning coating on polymeric surface based on electroless-plating-like solution deposition approach. *RSC Advances*, 5(14), 10159–10164. <https://doi.org/10.1039/c4ra10513c>
- Xiao, G., Zhang, X., Zhao, Y., Su, H., & Tan, T. (2014). The behavior of active bactericidal and antifungal coating under visible light irradiation. *Applied Surface Science*, 292, 756–763. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2013.12.044>
- Xu, H. H. K., & Simon, C. G. (2005). Fast setting calcium phosphate-chitosan scaffold: Mechanical properties and biocompatibility. *Biomaterials*, 26(12), 1337–1348. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.04.043>

- Xu, Q. chi, Wellia, D. V., Sk, M. A., Lim, K. H., Loo, J. S. C., Liao, D. W., Amal, R., & Tan, T. T. Y. (2010). Transparent visible light activated C-N-F-codoped TiO₂ films for self-cleaning applications. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 210(2–3), 181–187. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2009.12.017>
- Xu, W., Xie, W., Huang, X., Chen, X., Huang, N., Wang, X., & Liu, J. (2017). The graphene oxide and chitosan biopolymer loads TiO₂ for antibacterial and preservative research. *Food Chemistry*, 221, 267–277. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.054>
- Yahaya, M. Z., Azam, M. A., Teridi, M. A. M., Singh, P. K., & Mohamad, A. A. (2017). Recent Characterisation of Sol-Gel Synthesised TiO₂ Nanoparticles. In *Recent Applications in Sol-Gel Synthesis*. <https://doi.org/10.5772/67822>
- Yang, D., Li, J., Jiang, Z., Lu, L., & Chen, X. (2009). Chitosan/TiO₂ nanocomposite pervaporation membranes for ethanol dehydration. *Chemical Engineering Science*, 64(13), 3130–3137. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2009.03.042>
- Yun, Y. H., Yun, J. W., Yoon, S. Do, & Byun, H. S. (2016). Physical properties and photocatalytic activity of chitosan-based nanocomposites added titanium oxide nanoparticles. *Macromolecular Research*, 24(1), 51–59. <https://doi.org/10.1007/s13233-016-4008-6>
- Zainal, Z., Hui, L. K., Hussein, M. Z., Abdullah, A. H., & Hamadne, I. (Moh d. K. R. (2009). Characterization of TiO₂-Chitosan/Glass photocatalyst for the removal of a monoazo dye via photodegradation-adsorption process. *Journal of Hazardous Materials*, 164(1), 138–145. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.07.154>
- Zemljič, L. F., Tkavc, T., Vesel, A., & Šaupperl, O. (2013). Chitosan coatings onto polyethylene terephthalate for the development of potential active packaging material. *Applied Surface Science*, 265, 697–703. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2012.11.086>
- Zhang, M., Fang, P. F., Zhang, S. P., Wang, B., & Wang, S. J. (2003). Study of structural characteristics of HDPE/CaCO₃ nanocomposites by positrons. *Radiation Physics and Chemistry*, 68(3-4), 565-567. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2006.03.014>
- Zhang, H., Yang, Z., Zhang, X., & Mao, N. (2014). Photocatalytic effects of wool fibers modified with solely TiO₂ nanoparticles and N-doped TiO₂ nanoparticles by using hydrothermal method. *Chemical Engineering Journal*, 254, 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.05.097>
- Zhang, J., Liu, Y., Li, Q., Zhang, X., & Shang, J. K. (2013). Antifungal activity and mechanism of palladium-modified nitrogen-doped titanium oxide photocatalyst on agricultural pathogenic fungi *Fusarium graminearum*. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 5(21), 10953–10959. <https://doi.org/10.1021/am4031196>
- Zhang, X., Xiao, G., Wang, Y., Zhao, Y., Su, H., & Tan, T. (2017). Preparation of chitosan-TiO₂ composite film with efficient antimicrobial activities under visible light for food packaging applications. *Carbohydrate Polymers*, 169, 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.03.073>
- Zhang, X., Liu, Y., Yong, H., Qin, Y., Liu, J., & Liu, J. (2019). Development of multifunctional food packaging films based on chitosan, TiO₂ nanoparticles and anthocyanin-rich black plum peel extract. *Food Hydrocolloids*, 94, 80-92. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.03.009>

- Zhiyong, Y., Laub, D., Bensimon, M., & Kiwi, J. (2008). Flexible polymer TiO₂ modified film photocatalysts active in the photodegradation of azo-dyes in solution. *Inorganica Chimica Acta*, 361(3), 589–594. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2007.05.062>
- Zhou, J. J., Wang, S. Y., & Gunasekaran, S. (2009). Preparation and characterization of whey protein film incorporated with TiO₂ nanoparticles. *Journal of Food Science*, 74(7). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01270.x>
- Zolfi, M., Khodaiyan, F., Mousavi, M., & Hashemi, M. (2014a). The improvement of characteristics of biodegradable films made from kefiran-whey protein by nanoparticle incorporation. *Carbohydrate Polymers*, 109, 118–125. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.03.018>
- Zolfi, M., Khodaiyan, F., Mousavi, M., & Hashemi, M. (2014b). The improvement of characteristics of biodegradable films made from kefiran-whey protein by nanoparticle incorporation. *Carbohydrate Polymers*, 109, 118–125. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.03.018>



Capítulo 6

Propiedades antimicrobianas de las matrices activas

6.1 INTRODUCCIÓN

Las infecciones bacterianas son una causa importante de afecciones crónicas y mortalidad. Los antibióticos han sido el método de tratamiento preferido para las infecciones bacterianas debido a su eficacia en función de los costos y resultados obtenidos (Wang y col., 2017). Sin embargo, varios estudios han proporcionado pruebas directas de que el uso generalizado de antibióticos ha llevado a la aparición de cepas bacterianas multirresistentes. La mayoría de los mecanismos de resistencia a los antibióticos son irrelevantes para las nanopartículas (Np) debido a que su modo de acción es a través del contacto directo con la pared celular bacteriana, sin necesidad de penetrar en la célula.

Esto alimenta/genera la expectativa que las Np podrían ser menos propensas a promover la resistencia en bacterias que los antibióticos. El mecanismo de acción de las Np adhiere generalmente a uno de los tres modelos: inducción de estrés oxidativo, liberación de iones metálicos, o mecanismo no oxidativo (Gurunathan y col., 2012; Leung y col., 2014; Nagy y col., 2011).

De acuerdo a la literatura, los principales procesos subyacentes a los efectos antibacterianos de las Np son: 1) alteración de la membrana celular bacteriana, 2) generación de ROS, 3) penetración de la membrana celular y 4) inducción de efectos antibacterianos intracelulares, incluyendo interacciones con el ADN y las proteínas.

La membrana celular bacteriana es difícil de modificar a través de mutaciones genéticas debido a su naturaleza altamente conservada, que reduce aún más la probabilidad de generar resistencia a los medicamentos. Como ya se dijo, a diferencia de los antibióticos tradicionales, las Np ejercen su acción antimicrobiana a través de múltiples mecanismos simultáneamente activos. La ventaja de estos mecanismos simultáneos es obvia ya que es poco probable que un microbio tenga múltiples genes mutados, por lo que es mucho más difícil desarrollar resistencia a las Np.

Asimismo, los portadores de Np pueden ayudar a dirigir los antibióticos al sitio de la infección y así minimizar los efectos secundarios sistémicos (Wang y col., 2017).

6.1.1. Enfermedades transmitidas por alimentos

La generación de buenas prácticas de seguridad e inocuidad alimentaria es un aspecto importante a nivel mundial dentro de la tecnología de alimentos; con el eficiente desarrollo de estas prácticas se llega a generar productos alimenticios con altos estándares de calidad ya que se controlan todas las líneas productivas incluyendo el almacenamiento y las últimas etapas como la comercialización en góndola y finalmente el consumo humano (Rodríguez-Lázaro y Hernández, 2018).

La preocupación por la seguridad de los productos alimenticios se ha incrementado considerablemente durante las últimas décadas por la rápida globalización del mercado y los profundos cambios en los hábitos de consumo (D'Agostino y col., 2009; Rodríguez-Lázaro y col., 2018). Un aspecto importante en la seguridad e inocuidad alimentaria es el control de las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) que es uno de los problemas más graves de salud pública en todo el mundo y una de las principales causas de enfermedad y muerte (Wallace y col., 2000; Scallan y col., 2011; Rodríguez-Lázaro y col., 2018).

El deterioro microbiano causado por microorganismos patógenos reduce la vida útil de los alimentos y aumenta el riesgo de ETA (Gram y col., 2002; Quintavalla y Vicini 2002; Böhme y col., 2011; Krepker y col., 2017).

En 2015, la Organización Mundial de la Salud (OMS) emitió el último reporte sobre la importancia de generar políticas públicas de salud necesarias para poder controlar las ETA a nivel mundial. Este reporte se titula *Who estimates of the global burden of foodborne diseases* y especifica que existen 31 agentes alimentarios causantes de 32 enfermedades (WHO, 2015).

Las ETA se presentan debido a factores relacionados con la manipulación de los alimentos, las condiciones de almacenamiento/conservación y el transporte. Las patologías persistentes a causa de las ETA son variadas y van desde gastroenteritis leves hasta síndromes gastrointestinales fatales con la posibilidad de complicaciones crónicas (Mead y col., 2000; Rodríguez-Lázaro y col., 2018). Más del 90% de los casos confirmados y las muertes causadas por estos patógenos han sido atribuidos a bacterias. Entre las bacterias causantes de ETA más comunes se encuentran: *E.coli* spp., *Salmonella* spp., *S.*

Capítulo 6: Propiedades antimicrobianas de las matrices activas

aureus spp., *Listeria monocytogenes*, virus como el norovirus o el virus de la hepatitis A, y los protozoos como *Toxoplasma gondii*, *Candida albicans* spp. o *Cryptosporidium* spp.

Asimismo, la salmonelosis causada por *Salmonella* no tifoidea (NTS) es una de las enfermedades transmitidas por alimentos más frecuentes en los Estados Unidos, Canadá y la Comunidad Europea (EFSA, 2012; OMS, 2017). La *E. coli* puede encontrarse en alimentos de origen animal y vegetal. Un informe reciente mostró que se encontraron cepas de *E. coli* que albergan genes de virulencia y resistencia a los antibióticos en la producción de pollo, lo que representa un riesgo para la salud pública (Koga y col., 2015; Nakazato y col., 2017).

El principal representante de las bacterias Gram-positivas es el *Staphylococcus aureus*. Es una bacteria ubicua, cuya transmisión está relacionada con la ingestión de alimentos preparados o manipulados inapropiadamente. El *S. aureus* causa enfermedades graves; además las cepas pueden ser resistentes a múltiples fármacos, como meticilina (MRSA) y vancomicina (VRSA).

Las micotoxinas son producidas por hongos filamentosos, compuestos tóxicos que pueden contaminar los alimentos (por ejemplo, cereales, frijoles, guisantes y cacahuetes) durante la producción, procesamiento, transporte o almacenamiento de estos productos. Tres géneros principales de hongos filamentosos producen micotoxinas: *Penicillium*, *Aspergillus* y *Fusarium* (Nakazato y col., 2017). Otro agente causante de patologías son las levaduras del género *Candida*. La candidiasis es una de las infecciones más comunes en todo el mundo. Estas enfermedades se generan por *Candida albicans*.

Candida albicans es una levadura oportunista, hésped en los tractos gastrointestinal, respiratorio y genitourinario. Normalmente es un organismo inofensivo que puede convertirse en un oportunista en individuos inmuno-comprometidos o inmunológicamente deficientes (Kumamoto y col., 2020; Lee y col., 2021).

La presencia de microorganismos específicos y sus metabolismos en los alimentos por causa directa o contaminación cruzada representa un riesgo para la salud pública, por eso deben evitarse en cualquier etapa de procesamiento, incluido el envasado (Nakazato y col., 2017).

6.1.2 Materiales activos: una estrategia de control microbiológico

El desarrollo y la optimización de alternativas novedosas para la conservación de alimentos es uno de los aspectos claves en el campo de la investigación alimentaria.

Los materiales antimicrobianos proporcionan una barrera adicional que puede prevenir el crecimiento de patógenos transmitidos por los alimentos (Quintavalla y Vicini, 2002; Vermeiren y col., 2002; Suppakul y col., 2003a; Coma 2008; Guarda y col., 2011; Irkin y Esmer, 2015). Los materiales antimicrobianos no pretenden ser un sustituto de las prácticas de fabricación y manipulación, sino que sirven como un obstáculo adicional para el control microbiológico (Cooksey 2005; Irkin y Esmer, 2015).

Dentro de los agentes antimicrobianos se encuentran sustancias de naturaleza sintética como los antibióticos, o sustancias naturales las cuales son biocompatibles y/o biodegradables. La película puede ser una matriz compuesta de una fase polimérica y un compuesto con actividad antimicrobiana, el cual mediante la migración lenta genera el efecto antimicrobiano (Irkin y Esmer, 2015). Los materiales no migratorios pueden ser efectivos contra el crecimiento superficial de microorganismos sin que se produzca un proceso de migración (Suppakul y col., 2003a; Kuorwel y col., 2011; Muriel-Galet y col., 2012; Irkin y Esmer, 2015).

Dentro de los materiales antimicrobianos se puede encontrar los llamados activos, usados para extender la vida útil, mantener la seguridad alimentaria, reducir el desperdicio y minimizar los riesgos de enfermedades transmitidas por los alimentos (Han 2005; Malhotra y col., 2015; Krepker y col., 2017).

El uso del quitosano en las matrices compuestas ha sido estudiado debido a que este biopolímero es un reconocido compuesto antimicrobiano (Pérez-Obando y col., 2019; Vélez-Peña y col., 2020).

Cada sustancia antimicrobiana exhibe un mecanismo de acción único que es específico para una gama particular de alimentos y microorganismos. Algunos antimicrobianos bloquean o inhiben los procesos metabólicos y reproductivos de los microorganismos, mientras que otros modifican la conformación de la pared celular, lo que lleva a la pérdida de materiales internos vitales (Bastarrachea y col., 2011)

Los materiales antimicrobianos disponibles comercialmente contienen principalmente plata (Ag). En el primer caso, los cationes Ag se unen con grupos ricos en electrones que azufre, nitrógeno u oxígeno, que se pueden encontrar en las cadenas de ADN de los microorganismos bloqueando procesos biológicos vitales para la supervivencia y reproducción microbiana (Vermeiren y col., 2002; Bastarrachea y col., 2011). Las empresas que actualmente ofrecen materiales antimicrobianos que contienen Ag son DuPont (EE. UU.), Milliken Co. (EE. UU.), Surfacing Development Company (EE.UU.), Elshizuka Glass Co. (Japón). La aplicación de estos materiales antimicrobianos en la industria del envasado de alimentos es limitada, principalmente debido a los reparos sobre su aplicabilidad y seguridad (Vermeiren y col., 2002; BPF 2003; Bastarrachea y col., 2011).

6.1.3 Nanopartículas metálicas en el diseño de materiales activos

Actualmente las aplicaciones de nanopartículas (Np) metálicas y sus materiales nanocompuestos han sido informadas principalmente en función de sus características estructurales y superficiales (Kwon y col., 2018; Zhou y col., 2018). Por lo general, las Np con un tamaño unidimensional promedio de ≤ 100 nm se han examinado para diversas aplicaciones, tales como la fabricación biológica, farmacéutica, química, catálisis, tecnología ambiental y almacenamiento y conversión de energía (Hu y col., 2015; Zhou y col., 2018; Amini S., 2019; Chen y col., 2019; Liu y col., 2019). El gran interés en el campo del cuidado de heridas y control antimicrobiano generado por las Np ha estimulado la síntesis e investigación de matrices nanoestructuradas (Li y col., 2017; Hu y col., 2018; Krishnan y col., 2018; Shi y col., 2019; Jayaramudu y col., 2020). La inhibición del crecimiento bacteriano es una de las propiedades más notables de estos materiales, que depende de la ruta de síntesis, forma originada y tamaño de la Np (Raghavendra y col., 2013; Jayaramudu y col., 2016, 2020).

Se ha informado sobre una gran variedad de Np y materiales compuestos con excelente actividad antimicrobiana, específicamente de cobre, plata, oro, óxido de titanio, óxido de zinc, platino, entre otros que han sido caracterizados por Raghavendra y col. (2013), Jayaramudu y col. (2017, 2019, 2020). Como ya se ha expresado, estos compuestos son una alternativa a inhibidores microbianos de origen sintético como los antibióticos que

Capítulo 6: Propiedades antimicrobianas de las matrices activas

pueden desarrollar resistencia de los microorganismos a estos compuestos (Currie y col., 2011, de Krakery col., 2016; Mutalik y col., 2020).

Las nanopartículas pueden mostrar actividad antimicrobiana o controlar la liberación de sustancias antimicrobianas; con bajas concentraciones han demostrado una alta inhibición de microorganismos, como bacterias, hongos y protozoos (Nakazato y col., 2017). Las nanopartículas poliméricas y metálicas son una excelente alternativa a los antimicrobianos convencionales como la nisina y la natamicina, que muestran algunas desventajas, como los efectos secundarios, la genotoxicidad y la inducción de resistencia (cepas resistentes a la nisina y la natamicina) (Luo y col., 2018; Nakazato y col., 2017; Sharma y col., 2009; Verma y col., 2018). Las NpAg promueven la destrucción de la estructura de la membrana (Dai y col., 2018) e inhiben la actividad enzimática para prevenir eficazmente la resistencia bacteriana a los medicamentos (Chen y col., 2018).

Otro tipo de nanopartículas que se han estudiado son las de arcilla y óxidos metálicos como el zinc o titanio (Bradley y col., 2011). En el caso del óxido de titanio se han realizados nanorecubrimientos para generar nanosensores capaces de detectar alteraciones en los alimentos (Kreyling y col., 2010).

En la literatura se ha descrito que los materiales con presencia de nanopartículas de dióxido de titanio (NpTiO₂) presentan buena actividad antibacteriana (Chen y col., 2011; Hyde y col., 2011; Lee y col., 2015; Sivaranjani y col., 2016; Yang y col., 2016; Jatoi y col., 2019; Mutalik y col., 2020; Vélez-Peña y col., 2020) además de ser altamente biocompatibles mostrando toxicidad celular baja. Muñoz-bonilla y col. (2019) mencionan que se han formulado matrices nanocompuestas de quitosano-TiO₂ demostrando gran eficiencia antimicrobiana frente a *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* y *A. niger*.

Los materiales nanocompuestos basados en Cu han atraído considerable interés debido a sus aplicaciones potenciales en varios campos industriales y tecnológicos (Jayaramudu y col., 2020; Rafique y col., 2017; N. Verma y Kumar, 2019). Debido a los tres estados de oxidación del Cu, muchas investigaciones se han centrado en la síntesis de materiales basados en Cu para diversas aplicaciones en alimentos, usos biomédicos y cuidado de heridas (Gawande y col., 2016; Raghavendra y col., 2017; Kruk y col., 2019; Jayaramudu y col., 2020).

Jayaramudu y col. (2020) reportaron la elaboración de materiales nanocompuestos de quitosano/NpCu. Estos autores indicaron que se puede usar eficazmente en aplicaciones que impliquen alta biocompatibilidad. Otros materiales a nanoescala con actividad antimicrobiana incluyen óxido de magnesio, óxido de cobre, óxido de zinc, seleniuro/teluro de cadmio, quitosano y nanotubos de carbono (Duncan 2011; Nakazato y col., 2017).

6.1.4. Aplicaciones emergentes de matrices poliméricas con nanopartículas metálicas: apósitos para piel

La piel es el órgano más grande del cuerpo pero también la capa más externa. Su función principal es mantener el equilibrio y prevenir la infección y la pérdida excesiva de líquidos (Delavary y col., 2011; Ye y col., 2019). Los traumas, las quemaduras y varios tipos de úlceras cutáneas crónicas pueden dañar la piel. Después de una lesión, la integridad de la piel debe restaurarse rápidamente y la homeostasis debe restablecerse (Greaves y col., 2013; Hu y col., 2018). En consecuencia, el tratamiento de heridas es particularmente importante. Una cubierta, llamada apósito, debe usarse en el proceso de cicatrización de la herida para reconstruir la función de barrera de la piel, acelerar la cicatrización de la herida y reducir el riesgo de infección.

Las formulaciones antimicrobianas, principalmente para la cicatrización de la herida o incluso para el control de inflamaciones difunden a través de la capa de la piel en los tratamientos terapéuticos (Bala y col., 2014). El estrato córneo (SC) forma la capa más externa de la epidermis y se expone al entorno. Cuando el fármaco llega a la piel intacta entra en contacto con los desechos celulares, la flora normal de los microorganismos, sebo y otros materiales. La molécula entonces puede penetrar la barra de piel por tres vías: i- conductos sudoríparos, ii- folículos pilosos y iii- glándulas sebáceas.

Diversos aceites, ungüentos, geles y moléculas orgánicas e inorgánicas se han utilizado para hacer parches transdérmicos para el alivio del dolor y la curación de heridas. Los sistemas transdérmicos se introdujeron en el mercado en la década de 1970 contra la sífilis seguido de parches de nicotina. Actualmente se usan para medicamentos como estradiol, fentanilo, lidocaína y testosterona, parches combinados que contienen más de un medicamento para la anticoncepción y hormonas de reemplazo; y sistemas de

administración iontoforética y ultrasónica como analgésicos. Desde 2007, el mercado mundial ha sido testigo de enormes avances en tales parches, que incluye formulaciones complicadas y sistemas de liberación para enfermedades neurológicas como la enfermedad de Parkinson, Alzheimer, depresión, ansiedad, trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH) y cáncer, llegando a ser alternativas populares a las formulaciones orales (Goswami y col., 2013; Hye Kim y col., 2013).

Las NpAg se han usado como apósito en piel con excelentes resultados. Las estrategias de vendaje para heridas han recibido mucha atención. El apósito ideal para heridas debe tener las siguientes características: buena biocompatibilidad, actividad antibacteriana, absorción de agua, retención de agua, no ser citotóxico y ser biodegradable (Kumar y col., 2010; Li y col., 2017; Ye y col., 2019).

En la elaboración de materiales no citotóxicos los apósitos de biopolímeros como el quitosano con presencia de NpAg han sido estudiados. Ye y col. (2019) analizaron las propiedades de apósitos de Q/Ag. Microbiológicamente, el apósito gelatina/Q/Ag presentó un efecto antibacteriano significativo permitiendo que la herida permaneciera en un ambiente limpio y estéril sin infección.

Gopal y col., (2014) reportaron la eficacia que de matrices nanocompuestas de Q/Cu para el tratamiento de heridas. Realizaron análisis de cortes histológicos de piel de ratas heridas las cuales fueron tratadas con la matriz nanocompuesta, observando la proliferación de fibroblastos, deposición de colágeno y generación de células epiteliales. Los autores informaron que los apósitos mejoraron eficientemente la curación de las heridas cutáneas en diferentes fases del proceso.

6.2 OBJETIVOS

6.2.1 Objetivo general

Analizar la capacidad antimicrobiana de las soluciones y matrices nanocompuestas de quitosano funcionalizadas con nanopartículas de Ag, Cu y TiO₂ así como sus mezclas con alcohol polivinílico (PVA)

6.2.2 Objetivos específicos

- Establecer el efecto antimicrobiano de los diferentes componentes de la solución constituida por una fase polimérica fija (quitosano) y una fase dispersa de nanopartículas metálicas de plata (NpAg), cobre (NpCu) o dióxido de titanio (NpTi), calculando la concentración mínima inhibitoria contra cepas bacterianas de *E. coli*, *Salmonella spp.*, *S. epidermidis*, *S. aureus* y *Candida albicans*.
- Evaluar la capacidad antimicrobiana de las matrices nanocompuestas mediante el método de difusión en agar empleando discos de (i) matrices biopoliméricas de quitosano con presencia de nanopartículas metálicas; (ii) matrices poliméricas de quitosano y PVA con agregados de las nanopartículas metálicas
- Identificar el daño celular causado por incubación de los microorganismos en presencia de las matrices desarrolladas a partir de microscopía TEM y SEM, espectroscopía ATR-FTIR y potencial-zeta.

6.3 MATERIALES y MÉTODOS

En este capítulo se evaluó la actividad antimicrobiana de las matrices cuya preparación y caracterización se describieron en los *Capítulos 3, 4 y 5*.

6.3.1 Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB): Prueba de dilución en caldo

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se define como la mínima concentración de antimicrobiano (en $\mu\text{g/mL}$) que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de 24 horas de incubación a 37°C en caldo de cultivo. Para la determinación de la CMI se realizaron diluciones seriadas del antimicrobiano en el caldo Müller-Hinton cuya composición es: 2.0 g de extracto de carne, 17.5 g de hidrolizado de caseína, 1.5 g de almidón, 17.0 g de agar, 1 g de agua destilada, pH ajustado a 7.3 ± 0.1 a 25°C.

Se emplearon dos controles: control positivo (caldo al que se añadió la suspensión bacteriana) y control negativo (caldo sin antimicrobiano y sin suspensión bacteriana).

Los agentes antimicrobianos usados fueron la solución control (Q), el aislado de las nanopartículas de Ag, Cu y TiO_2 y las soluciones de Q con el agregado de nanopartículas.

Preparación de los inóculo

A partir de un cultivo puro de cada microorganismo en agar nutritivo se preparó una suspensión en solución fisiológica ajustando la turbidez a 0.5 de la escala de McFarland. Seguidamente se diluyó esta suspensión 1/100 en caldo Muller–Hinton

Preparación de las diluciones

Se tomaron 9 tubos y se marcó cada uno con el nombre de la bacteria, el agente antimicrobiano y la concentración final del agente.

Se prepararon diferentes diluciones de QAg_4 , QCu_4 , QT_{30} y suspensiones de nanopartículas de Ag, Cu y TiO_2 . Diluciones seriadas de muestras (500 μl) se incorporaron a 500 μl caldo de cultivo (Muller-Hinton) y se inocularon con 500 μl del inóculo correspondiente. Los tubos se incubaron a 37°C durante 24-48 horas. La menor concentración de las soluciones así como de las suspensiones de nanopartículas que produjeron una inhibición completa del desarrollo visible en el tubo de ensayo fue considerada como la CMI.

Capítulo 6: Propiedades antimicrobianas de las matrices activas

Desde un punto de vista microbiológico, una cepa solo se considera susceptible a un antimicrobiano dado si el organismo se inhibe con las concentraciones utilizadas como se ilustra en la [Figura 6.1](#).

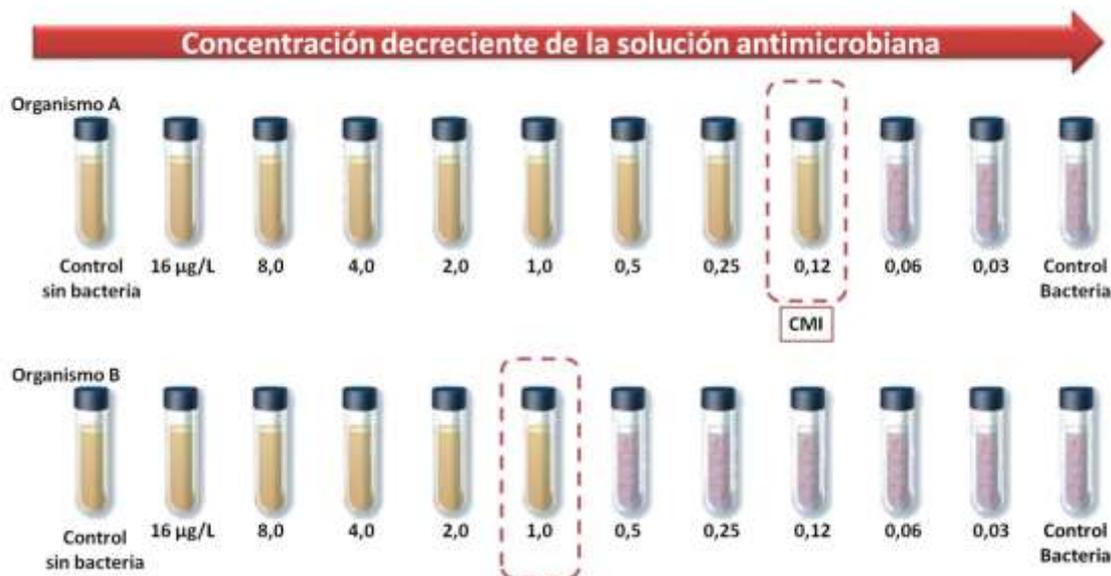


Figura 6.1. Esquema de la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CMI) de un antimicrobiano para diferentes microorganismos. Adaptado de [Anderson y col. \(2016\)](#).

Se debe tener en cuenta que la CMI solo indica la concentración de agentes antimicrobianos necesaria para inhibir un organismo *in vitro*. El procedimiento que se describe a continuación determina si el agente es bactericida o bacteriostático.

La concentración bactericida mínima (CMB) es la concentración más baja de un agente antimicrobiano específico que mata el 99.9% de las células de una determinada cepa bacteriana *in vitro*. El CMB se determina mediante la observación del crecimiento de los microorganismos vivos que permanecen en los tubos del experimento para determinar la CMI que no mostraron crecimiento. Una ansada de cada uno de esos tubos se transfiere a una placa que contiene un medio de agar libre de antibióticos (agar nutritivo), se incuba a 37°C durante 24-48 hs. Transcurrido ese tiempo se realiza la observación de la placa. Si no se observan colonias en la placa, ninguna célula de la muestra sobrevivió a esa concentración antimicrobiana particular. Si se forman colonias, indica que las células sobrevivieron en ese tubo como se observa en la [Figura 6.2](#).

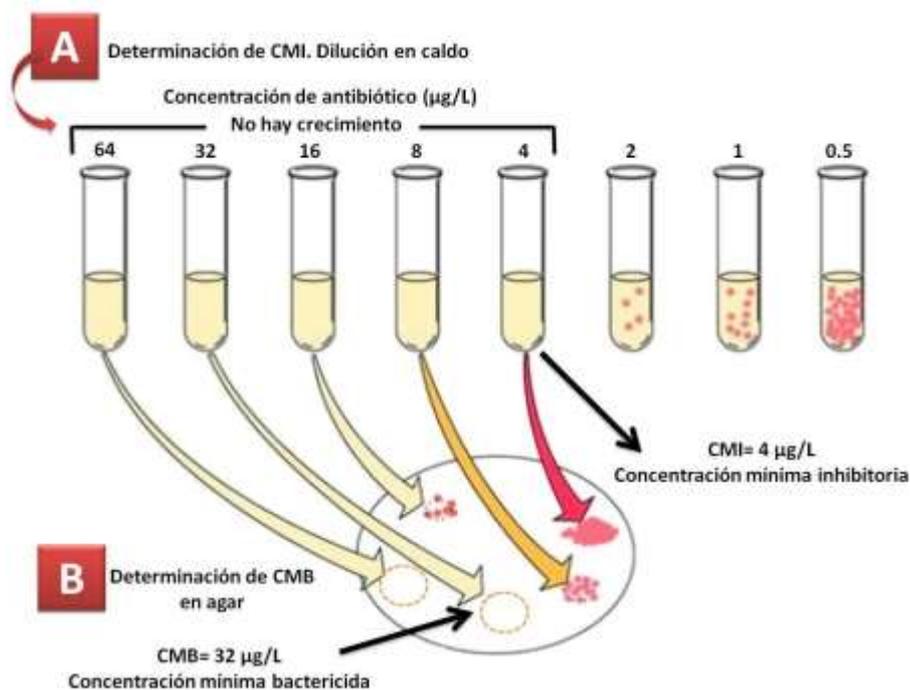


Figura 6.2. A) Concentración mínima inhibitoria (CMI) y B) concentración mínima bactericida (CMB) usando la prueba de difusión en disco de Kirby-Bauer. Adaptado de Anderson y col. (2016).

La determinación de la CMI y la CMB proporciona información precisa sobre la susceptibilidad *in vitro* de un microorganismo. De esta manera se puede establecer si el agente es bacteriostático o bactericida.

6.3.2 Método convencional de difusión de disco

La prueba de difusión de disco de Kirby-Bauer es un método que se usa habitualmente para determinar la susceptibilidad de una cepa bacteriana a un agente antimicrobiano. Un inóculo estándar de la cepa (100 μL) se extiende uniformemente sobre la superficie de una placa con agar. Luego, se colocan discos con una cantidad conocida de un antimicrobiano en la superficie del medio. Durante la incubación, los antimicrobianos difunden desde los discos, formando un gradiente de concentración alrededor de cada disco. Mientras tanto, las células bacterianas se multiplican y finalmente forman una película de crecimiento en la placa, excepto en las regiones alrededor de los discos donde las bacterias fueron destruidas o su crecimiento inhibido. Esta área clara en la que no se produce un crecimiento visible se denomina zona de inhibición. El tamaño de la zona de

inhibición alrededor de un disco antimicrobiano refleja, en parte, el grado de susceptibilidad del organismo al compuesto.

Actividad antimicrobiana

Para determinar la capacidad antimicrobiana se seleccionaron microorganismos patógenos característicos por su frecuente contagio en humanos tanto Gram-positivos (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 2559xx), como Gram-negativos (*Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella* spp.), además de *Candida albicans*. Todos los microorganismos ensayados procedieron de la cátedra de microbiología (Universidad Nacional de La Plata). *Candida albicans* se cultivó en un medio conteniendo extracto de malta (1% Biokar, Francia), extracto de levadura (2% Biokar, Francia) y glucosa (1% Merck, Alemania). Las bacterias *S. aureus*, *E. coli*, y *Salmonella* spp. fueron cultivadas en caldo Müller-Hinton (Merck, Alemania).

Todos los microorganismos evaluados se incubaron a 37°C durante 12 horas hasta llegar a una concentración de 10^8 - 10^9 UFC ml⁻¹ determinado por la densidad óptica de la suspensión (DO). A partir de este inóculo se prepararon diluciones de 1:10 con agua de peptona al 0.1% (Oxoid) para obtener una concentración de microorganismos del orden de 10^7 - 10^8 UFC ml⁻¹. La inoculación de los medios de cultivo se realizó por incorporación de 100 µl de inóculo sobre la superficie del medio, esparciendo cuidadosamente el líquido usando la técnica del plato extendido.

Los ensayos se realizaron empleando discos de películas de 1.5 cm de diámetro, los cuales se colocaron presionándolos de forma que se asegurara el contacto con la superficie del agar mediante el uso de pinzas estériles. Los discos se depositaron sobre cajas de Petri previamente sembradas con el inóculo correspondiente sobre PCA (Merck) para los ensayos con bacterias y Agar Malta para hongos. Se evaluó la capacidad antimicrobiana de las películas Q y los nanocompuestos (QAg_x, QCu_x, QT_i_x, y QAg+PVA, QCu+PVA con distintas proporciones de nanopartículas).

Todas las muestras se incubaron a 37°C. Los ensayos se efectuaron por triplicado para asegurar la reproducibilidad de los resultados. En todos los casos se realizaron observaciones visuales, se tomaron fotografías y se midieron las zonas de inhibición de las películas a las 24 y 48 horas de incubación.

Las fotografías fueron procesadas con un software específico de análisis de imágenes Image J (NIH, USA). A partir del análisis de las placas, se determinaron el diámetro total de inhibición (Dti), el área del halo de inhibición (Ahi) considerada como el área de inhibición adyacente a la película y el porcentaje de inhibición del patógeno determinado a partir del cociente entre la suma de áreas de inhibición total correspondiente a los 3 discos dispuestos sobre la placa de Petri y el área de crecimiento del patógeno sobre la placa (63.6 cm²) (Padgett y col., 1998).

6.3.3 Análisis de muestras de suspensiones de microorganismos patógenos mediante diferentes métodos

Para las determinaciones, la preparación de las muestras se realizó siguiendo un protocolo como se muestra en la Figura 6.3. El principal objetivo fue confirmar el deterioro celular del microorganismo al estar en contacto directo con las matrices estudiadas midiendo la carga superficial de la suspensión de microorganismos, a través del potencial zeta. Asimismo los efectos sobre las estructuras químicas de las células se analizaron a través de ATR-FTIR.

Potencial zeta y ATR-FTIR de las suspensiones de bacterias

Se realizaron mediciones del potencial zeta según el procedimiento descrito por Soon y col. (2011). Brevemente, las células fueron colectadas por centrifugación a 10000 g por 10 min a temperatura ambiente hasta lograr una concentración de 1×10^9 UFC/ml. En los Eppendorf de 2 ml las bacterias se pusieron en contacto con un 1 cm² de película de quitosano o quitosano con nanopartículas (Q, QAg₄, QCu₄, QT₃₀) durante 15 min, 1 y 3 h. Después de ese tiempo de contacto, se retiró la película y la suspensión se centrifugó nuevamente y se lavó con agua Milli-Q. Se realizaron diluciones de las suspensiones para lo cual 500 µl de suspensión de cada bacteria se añadieron a 10 ml de agua Milli-Q. Las suspensiones resultantes fueron utilizadas para llenar los capilares (Horiba, Reino Unido). Posteriormente, los microorganismos se estabilizaron a 25°C durante 10 s y las determinaciones de potencial zeta se hicieron por quintuplicado.

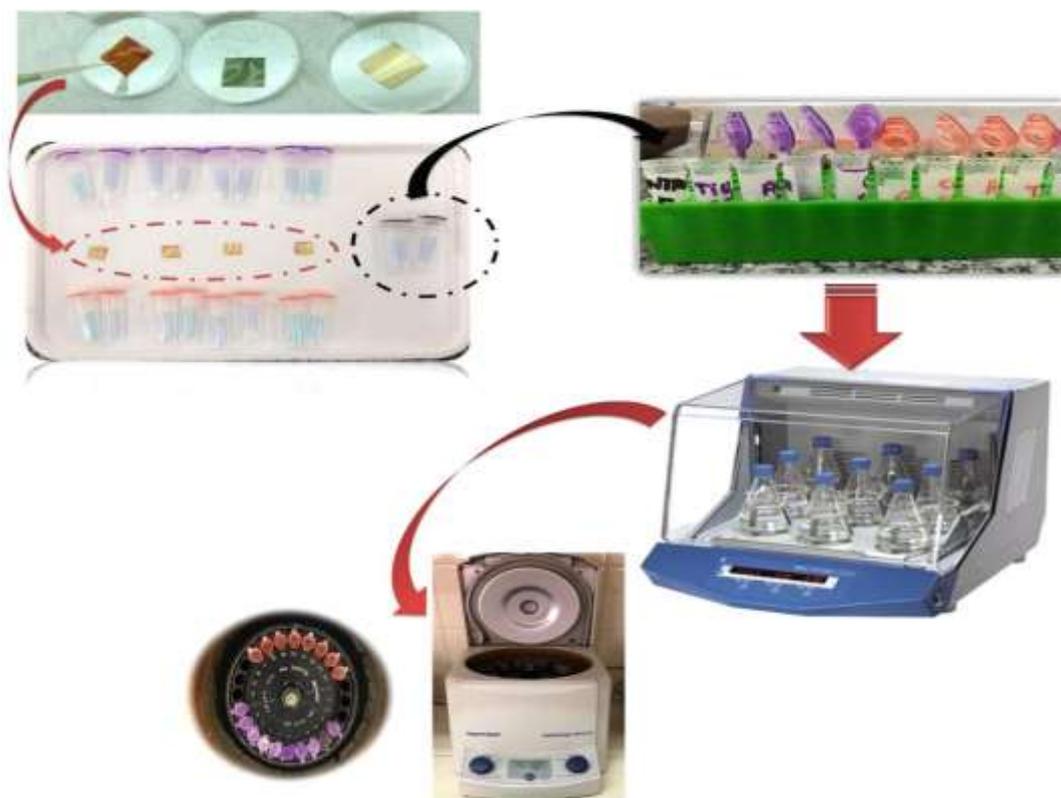


Figura 6.3. Preparación de las muestras de microorganismos para la medición de PZ o ATR-FTIR después de 0.25, 1 o 3 h de contacto con la matriz antimicrobiana.

Dado que la técnica ATR-FTIR fue presentada en el **Capítulo 1** solo se describirán los detalles adicionales para el análisis de los espectros obtenidos de las suspensiones de los diferentes microorganismos luego de estar en contacto con las matrices estudiadas.

Las determinaciones por ATR-FTIR se realizaron aplicando la técnica descrita por varios autores (DieterHelm y col., 1991; Naumann, 2006; Wenning y Scherer, 2013). Se procedió a centrifugar hasta obtener una concentración significativa para llevar a cabo el ensayo y observar a través del espectro ATR-FTIR los cambios a nivel molecular del microorganismo que había estado en contacto con las matrices antimicrobianas. Las células se resuspendieron en agua grado milli-Q y alícuotas de 100 μ l la suspensión concentrada de bacterias se extendieron sobre el cristal ATR y se dejaron secar hasta formar una película transparente. Los espectros se adquirieron como se describió en el **Capítulo 1**. El software OMNIC se usó para realizar el análisis corrigiendo la línea de base de las curvas.

Preparación de los cortes ultrafinos para TEM

Para obtener secciones ultrafinas de los cultivos de bacterias control y de las incubadas en contacto con la película, se recogieron las bacterias, se transfirieron a tubos *Eppendorf* y se lavaron tres veces con agua milli-Q estéril. Finalmente, las bacterias se resuspendieron en 1 ml de agua milli-Q. Las fracciones de la suspensión bacteriana descritas anteriormente se fijaron a 4°C durante 90 min con glutaraldehído al 3% en buffer fosfato 0.1M. Las células se fijaron posteriormente en OsO₄ al 1% durante 90 min a 4°C y se tiñeron con acetato de uranilo al 0.25% a 4°C durante 1 h. las muestras se centrifugaron y los pellets se deshidrataron. Finalmente, las células se incrustaron en resina epoxi. Las resinas se seccionaron cortando una película de 80 nm a 25°C usando un ultramicrotomo Sorvall MT 5000 (Dupont, Boston, MA) equipado con un cuchillo de diamante. Se montó una sección delgada sobre rejillas de cobre cubiertas con una película de carbono y se observó usando un TEM JEOL-JEM 1200 EX II (JeolTechnicsLtd, Tokio, Japón) a un voltaje de 80 kV.

Preparación de las suspensiones para microscopía electrónica SEM y TEM

Para observar los cultivos que habían estado en contacto con películas durante 15 min, 1 y 3 h, las colonias se centrifugaron, y los pellets se deshidrataron en un tren de alcoholes. Las muestras se colocaron sobre tacos de bronce y se examinaron con un detector de electrones de alto vacío con un recubrimiento de oro a un voltaje de 12.5 kV.

Una gota de la suspensión bacteriana se colocó en una malla de cobre recubierto con colodión durante 5 min. El exceso se eliminó con papel de filtro. Las bacterias adheridas a la malla fueron observadas con el microscopio TEM.

6.4 DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

6.4.1 Concentración mínima inhibitoria

La concentración mínima inhibitoria (CMI) de la solución de quitosano y de las suspensiones de nanopartículas metálicas en quitosano (QAg, QCu, QTi) y en agua milli-Q (NpAg, NpCu y NpTiO₂) se determinó frente a *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. Por ello se utilizó la técnica modificada descrita por Anderson y col. (2016). En la Tabla 6.1 y Tabla 6.2 se detallan los resultados obtenidos para la determinación de la CMI y en la Tabla 6.3 en mg/ ml

Tabla 6.1 Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp y *Staphylococcus aureus* por sembrado en placa

Microorganismo	Muestra	TC	-1	-2	-3	-4	-5
<i>Escherichia coli</i>	NpAg	-	+	+	+	+	+
	NpCu	-	+	+	+	+	+
	NpTiO ₂	-	-	+	+	+	+
	Solución Q*	-	-	-	+	+	+
	Suspensión QAg	-	-	-	-	+	+
	Suspensión QCu	-	-	-	+	+	+
	Suspensión QTi	-	-	-	-	-	+
<i>Salmonella</i> spp	NpAg	-	-	-	+	+	+
	NpCu	-	+	+	+	+	+
	NpTiO ₂	-	+	+	+	+	+
	Solución Q*	-	-	-	+	+	+
	Suspensión QAg	-	-	-	+	+	+
	Suspensión QCu	-	-	-	+	+	+
	Suspensión QTi	-	-	-	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	NpAg	-	-	+	+	+	+
	NpCu	-	+	+	+	+	+
	NpTiO ₂	-	+	+	+	+	+
	Solución Q*	-	-	-	+	+	+
	Suspensión QAg	-	-	-	-	-	+
	Suspensión QCu	-	-	-	-	+	+
	Suspensión QTi	-	-	-	-	+	+

Tabla 6.2 Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de *Staphylococcus epidermidis* y *Candida albicans* por sembrado en placa

<i>Microorganismo</i>	<i>Muestra</i>	<i>TC</i>	<i>-1</i>	<i>-2</i>	<i>-3</i>	<i>-4</i>	<i>-5</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	NpAg	-	-	-	+	+	+
	NpCu	-	-	+	+	+	+
	NpTiO ₂	-	+	+	+	+	+
	Solución Q*	-	-	-	-	-	+
	Suspensión QAg	-	-	-	-	-	+
	Suspensión QCu	-	-	-	+	+	+
	Suspensión QTi	-	-	-	+	+	+
<i>Candida albicans</i>	NpAg	-	-	-	+	+	+
	NpCu	-	-	+	+	+	+
	NpTiO ₂	+	+	+	+	+	+
	Solución Q*	-	-	+	+	+	+
	Suspensión QAg	-	-	-	+	+	+
	Suspensión QCu	-	-	-	+	+	+
	Suspensión QTi	-	+	+	+	+	+

Tabla 6.3. Concentración de los agentes antimicrobianos usados y sus diluciones expresada en mg/ml

Agente	TC	-1	-2	-3
Q (mg/ml)	3.3	3.3 10 ⁻¹	3.3 10 ⁻²	3.3 10 ⁻³
QTi	3.3+1.0	(3.3+1.0) 10 ⁻¹	(3.3+1.0) 10 ⁻²	(3.3+1.0) 10 ⁻³
QAg	3.3+0.31	(3.3+0.31) 10 ⁻¹	(3.3+0.31) 10 ⁻²	(3.3+0.31) 10 ⁻³
QCu	3.3+0.25	(3.3+0.25) 10 ⁻¹	(3.3+0.25) 10 ⁻²	(3.3+0.25) 10 ⁻³
NpTiO₂	1.0	1.0 10 ⁻¹	1.0 10 ⁻²	1.0 10 ⁻³
NpAg	0.31	0.31 10 ⁻¹	0.31 10 ⁻²	0.31 10 ⁻³
NpCu	0.25	0.25 10 ⁻¹	0.25 10 ⁻²	0.25 10 ⁻³

En general, se observó un efecto sinérgico de las nanopartículas en presencia de quitosano. *Candida albicans* resultó el microorganismo menos susceptible al tratamiento con los agentes antimicrobianos ensayados.

6.4.2 Propiedades antimicrobianas de las películas nanocompuestas

Los resultados de las matrices nanocompuestas expuestas a diferentes microorganismos muestran el efecto antimicrobiano de las matrices a base de Q y Q-PVA con agregados de nanopartículas de Ag, Cu y TiO₂ frente a microorganismos frecuentes como: *E.coli*, *Salmonella* spp, *S. aureus*, *S. epidermidis* y *Candida albicans*.

Para comprender los resultados, un factor importante es conocer el mecanismo antimicrobiano del quitosano. El modo de acción del quitosano ha sido descrito por Kravanja y col. (2019). En la Tabla 6.4 describe las hipótesis más aceptadas y encontradas en publicaciones recientes.

1) las moléculas de quitosano cargadas positivamente interfieren con los residuos cargados negativamente en la superficie bacteriana. El quitosano interactúa con la membrana de las bacterias para alterar la permeabilidad celular provocando una fuga de componentes intracelulares que da como resultado la muerte celular (Chien y col., 2015; Li y col., 2015; Severino y col., 2015; Yang y col., 2015). Li y col. (2015) demostraron que el mecanismo antibacteriano del derivado del quitosano (O-amonio cuaternario N-acil tiourea quitosano) se debe a las interacciones de los grupos catiónicos NH₃⁺ con las membranas celulares cargadas negativamente que, en consecuencia, aumentan la permeabilidad y la lisis de la membrana. 2) la interacción de los productos de hidrólisis difusos con el ADN microbiano, que conduce a la inhibición del ARNm y la síntesis de proteínas (Devlieghere y col., 2004; El-tahlawy y col., 2005; Hosseinnejad y Jafari, 2016; Yuan y col., 2016) Liu y col. (2001) publicaron un estudio de la inhibición de *Echerichia coli* donde sugieren que el Q está presente dentro de la célula y probablemente impide la transcripción del ADN. 3) el quitosano también inhibe el crecimiento microbiano mediante la quelación de nutrientes y metales esenciales inhibiendo el crecimiento microbiano (Chien y col., 2015; Yuan y col., 2016). Es bien sabido que el Q tiene excelente capacidad de unión a metales por interacción con los iones cargados del grupo amino (Varma y col., 2004). La interacción entre los grupos amino e iones divalentes como Ca²⁺ y Mg²⁺ presentes en la pared celular del microorganismo inhiben el crecimiento bacteriano. 4) en la superficie de la célula el quitosano puede formar una membrana de polímero que evita que los nutrientes ingresen a la misma (El-tahlawy y col., 2005; Helander y col.,

2001; H. Liu y col., 2004) o actúa como una barrera al oxígeno que puede inhibir el crecimiento de bacterias aeróbicas (Devlieghere y col., 2004; Yuan y col., 2016).

Sin embargo, antes de que el quitosano pueda desencadenar estas respuestas intracelulares particulares, tiene que penetrar la membrana plasmática, que depende en gran medida del tipo de microorganismo y del peso molecular.

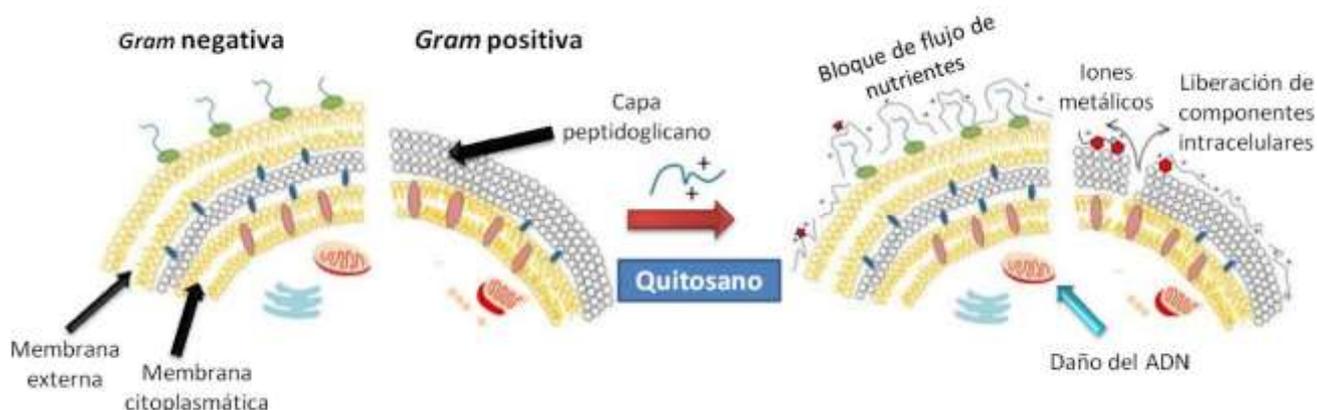


Figura 6.4. Cuatro modelos propuestos para la acción del quitosano en bacterias Gram positivas y negativas: La naturaleza policatiónica del quitosano provoca la liberación de componentes intracelulares, la unión al ADN bacteriano (inhibición del ARNm), el bloqueo del flujo de nutrientes y/o la quelación de metales esenciales. Adaptado de Kravanja y col. (2019).

Dado que el modo de acción del quitosano está influenciado por diferentes factores (Kong y col., 2010) es difícil comprender el mecanismo exacto detrás de la actividad antimicrobiana. Es un proceso muy complejo que varía entre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, basado en diferencias estructurales a nivel celular (Figura 6.4).

Distintos mecanismos han sido propuestos por diversos autores (Romainor y col., 2014) para explicar las diferencias en la actividad antimicrobiana, considerando que la interacción electrostática del quitosano se produciría: (i) con grupos cargados negativamente presentes en los componentes de la membrana celular (fosfolípidos y proteínas), (ii) con aminoácidos localizados en la pared celular de las bacterias Gram-positivas, o (iii) con los lipopolisacáridos presentes en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, afectando la integridad y la permeabilidad de la membrana.

Para las bacterias Gram-positivas, el quitosano se une de forma no covalente con los ácidos teicoicos incorporados en la capa de peptidoglicano (Raafat y col., 2008) (Figura 6.5). Estos ácidos teicoicos en la superficie celular son importantes para la división celular

y otros aspectos fundamentales de la fisiología de las bacterias Gram-positivas (Brown y col., 2013). Algunos investigadores creen que es poco probable que el quitosano afecte la membrana celular ya que su diámetro hidrodinámico es mayor que los poros esperados en la estructura del peptidoglicano (Raafat y col., 2008). Las funciones de los ácidos teicoicos se pueden dividir aproximadamente en tres grupos principales: protección contra el estrés ambiental, control de la actividad enzimática y concentración catiónica en la envoltura celular y unión de la célula a receptores y superficies (Xia y col., 2011). Otros bactericidas catiónicos también han mostrado actividad hacia bacterias Gram-positivas debido a estos ácidos teicoicos aniónicos (Neuhaus y Baddiley, 2003).

La diferencia entre los hongos quitosensibles y resistentes es menos pronunciada que en el caso de las bacterias. Primero, el quitosano afecta la membrana celular a través de interacciones electrostáticas con los fosfolípidos cargados negativamente (Palma-Guerrero y col., 2010). Una vez que se rompe la membrana celular, el quitosano es capaz de ingresar a la célula (Palma-Guerrero y col., 2009, 2010; Park y col., 2011). Esto podría conducir a la inhibición de la síntesis de ADN / ARN (Goy y col., 2009) la interrupción de la síntesis de proteínas (Galván Márquez y col., 2013). Sin embargo, para los hongos resistentes al polielectrolito, el quitosano es incapaz de permeabilizar la membrana celular y permanece en la superficie exterior (Palma-Guerrero y col., 2010).

Esto contrasta con los hongos sensibles al quitosano, donde se observa la rotura de la membrana celular junto con la fuga de material intracelular (Palma-Guerrero y col., 2010). La razón por la cual el quitosano no puede alterar la membrana celular para los hongos resistentes se debe a la diferencia en la fluidez de la misma. Un estudio de la composición de ácidos grasos fosfolípidos de la membrana celular de hongos resistentes y sensibles al quitosano mostró que un aumento en la actividad del quitosano estaba relacionado con una mayor cantidad de ácidos grasos insaturados en la membrana (Palma-Guerrero y col., 2009).

Muchos estudios, con algunas excepciones, sugieren que se puede encontrar un mayor efecto inhibitorio en bacterias Gram-negativas. Chung y col. (2005) y Devlieghere y col. (2004) informaron que el quitosano mostró efectos antimicrobianos más fuertes contra bacterias Gram-negativas que contra las contrapartes Gram-positivas.

El quitosano inhibe el crecimiento de una amplia variedad de hongos, levaduras y bacterias (Dehnad y col., 2014; Fernández-Pan y col., 2015; Lekjing, 2016; Severino y col.,

2015; Yang y col., 2015; Yuan y col., 2016), aunque se ha demostrado que la actividad contra los hongos es menos eficiente en comparación con su actividad contra las bacterias (Tsai y col., 2004; Ziani y col., 2009).

Se supone que la actividad del quitosano es fungistática en lugar de fungicida (Goy y col., 2009). La razón de la actividad antifúngica del quitosano es su naturaleza policatiónica. La formación de quelatos con los oligoelementos los torna inaccesibles para el crecimiento normal de hongos (Plapied y col., 2010). En la búsqueda de nuevos agentes con actividad antifúngica contra *Candida*, el quitosano obtenido de *Pleurotus* spp. mostró efectividad para aplicaciones biomédicas (Ing y col., 2012; Kong y col., 2010).

6.4.3 Actividad antimicrobiana de nanopartículas metálicas

Los ensayos de capacidad inhibitoria de las películas a base de quitosano confirmaron que en general los nanocompuestos con incorporación de nanopartículas representaron una mejoría en las propiedades antimicrobianas con respecto a las películas de un solo componente.

La actividad antibacteriana del quitosano es compleja y difiere entre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas debido a la diferencia en la composición de la superficie celular de ambos tipos de bacterias. Distintos mecanismos han sido propuestos por diversos autores. Romainor y col, (2014) explican la actividad antimicrobiana, considerando que la interacción electrostática del quitosano se produciría: (i) con grupos cargados negativamente presentes en los componentes de la membrana celular (fosfolípidos y proteínas), (ii) con aminoácidos localizados en la pared celular de las bacterias Gram-positivas, o (iii) con los lipopolisacáridos presentes en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, afectando la integridad y la permeabilidad de la membrana.

Las nanopartículas metálicas o los iones metálicos son potencialmente tóxicos para los patógenos. Las nanopartículas metálicas ya sean por sus iones que dañan los microorganismos directamente o mediante la generación de ROS al destruir el ácido ribonucleico, las proteínas, los orgánulos intracelulares o la pared celular y la membrana celular (Cioffi y Rai, 2012). La actividad de generación de ROS de las nanopartículas metálicas podría incrementarse mediante una combinación de luz (Amini, 2019) o irradiación ionizante (Ghaemi y col., 2018). Ayaz Ahmed y col., (2016) enfatizaron la

inhibición de enzimas por nanopartículas metálicas. Entre las nanopartículas metálicas, las nanopartículas de plata (NpAg) son las nanopartículas antimicrobianas más destacadas, pero sus posibles problemas de toxicidad dieron lugar a muchas aplicaciones (Amiri y col., 2018; Marambio-Jones y Hoek, 2010). Las nanopartículas de cobre y selenio también se enfrentan a un destino similar (Amini y Mahabadi, 2018; Ingle y col., 2014).

Las NpAg son un agente antimicrobiano muy activo que se ha aplicado para inhibir una variedad de microorganismos (Amini, 2019; Ayaz Ahmed y col., 2016).

Se observó la actividad antifúngica del quitosano frente a diferentes hongos. La concentración mínima inhibitoria (MIC) de quitosano varía de 0.01 a 7.75 mg / ml. A pesar de la cantidad de investigaciones publicadas sobre la actividad antimicrobiana, es difícil comparar estos estudios debido a las diferencias en los factores ambientales y una caracterización muy ambigua del quitosano.

6.4.4 Capacidad antimicrobiana para matrices estudiadas por método de difusión en agar

Microorganismo: Candida albicans

Candida albicans es la levadura más común que se encuentran en las membranas mucosas de los seres humanos, incluyendo cavidad oral, esófago, tracto gastrointestinal, urinario-vejiga y genitales.). Puede entrar en el torrente sanguíneo y extenderse por todo el cuerpo (Mantica y col., 2019). Se ha convertido en una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo entre las personas inmunocomprometidas (Ansari y col. 2013

La capacidad antimicrobiana de las matrices desarrolladas se evaluó a través del método de difusión en agar. En las Figuras 6.5-6.8 se visualizan los valores de los halos de inhibición correspondientes a un inóculo de 10^9 UFC ml⁻¹ de *Candida albicans*. Cada uno de estos valores representa el promedio de las concentraciones de nanopartículas en los nanocompuestos: QX₁, QX₂, QX₃, QX₄ (X=Ag o Cu) y 10, 20 y 30 en el caso de NpTiO₂.

Todas las formulaciones resultaron ser efectivas para la inhibición del crecimiento celular de las colonias de *Candida albicans* por contacto con las matrices.

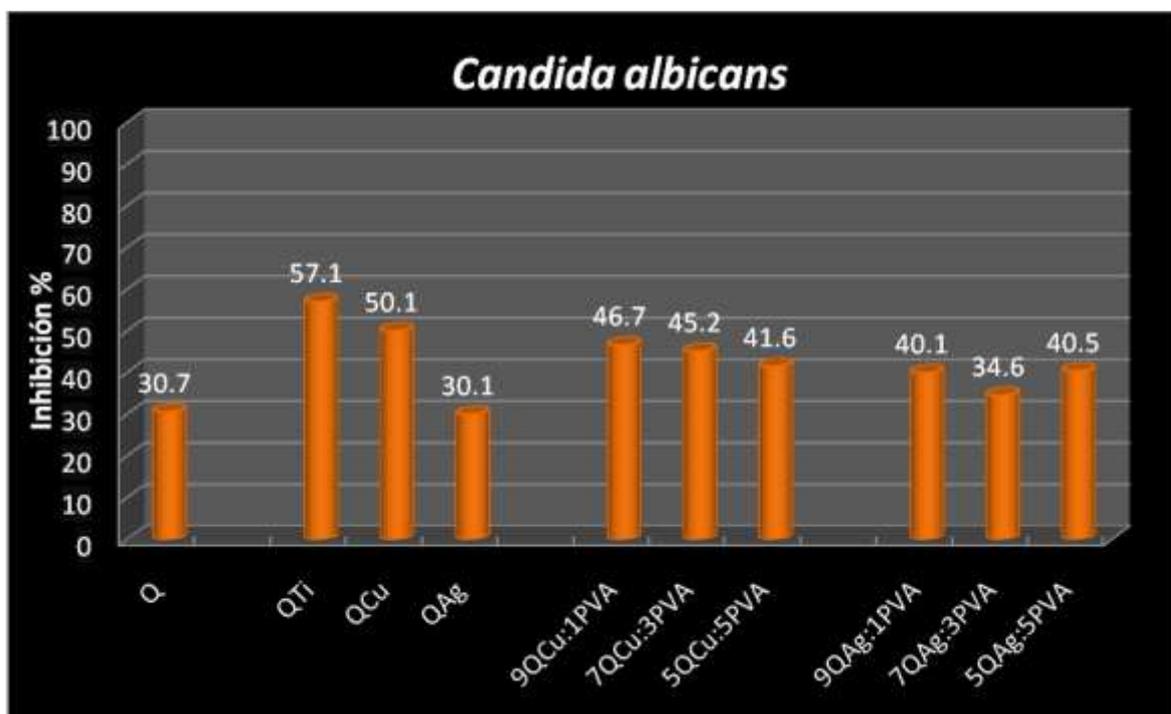


Figura 6.5. Porcentaje de inhibición de *Candida albicans* obtenido por el método de difusión de disco para las distintas formulaciones ensayadas

El porcentaje de inhibición (PI) de *Candida albicans* fue superior al 30% para todas las formulaciones ensayadas. Las matrices que contenían NpTiO_2 y NpCu produjeron los mayores halos de inhibición.

En la Figura 6.6 se pueden ver los halos de inhibición de los nanocompuestos funcionalizados con nanopartículas de Ag, TiO_2 y Cu cuyas concentraciones se explicitaron en los Capítulos 2, 3 y 5. Asimismo Las Figuras 6.7-6.8 muestran los halos generados por los nanocompuestos formulados con mezclas de quitosano y PVA en distintas proporciones (Capítulo 4).

El quitosano ejerce un efecto antifúngico por supresión de la esporulación y de la germinación de esporas (Hernández-Lauzardo y col., 2008). De acuerdo con Rabea y col., (2003) el contacto directo del quitosano con los hongos produce el debilitamiento y el hinchamiento de las hifas. Los autores atribuyeron su acción fungistática a su capacidad para inducir cambios morfológicos en la pared celular, así como su efecto en la reducción

en el tamaño de las hifas y ramificaciones. [Ing y col. \(2012\)](#) reportaron el efecto de las nanopartículas de quitosano sobre microorganismos fúngicos, relacionándolo con el tamaño y el potencial zeta de las partículas.

[Kim y col. \(2009\)](#) estudiaron la actividad antifúngica de las nanopartículas de plata e informaron que las células de *C. albicans* mostraron cambios significativos en sus membranas, con formación de fisuras que finalmente resultaron en la formación de poros y muerte celular.

[El-Rafie y col. \(2010\)](#) y [Kulatunga y col. \(2017\)](#) demostraron el efecto antimicrobiano de las nanopartículas de plata y de nanocompuestos de QAg sobre *C. albicans* por afectación de las funciones fisiológicas y bioquímicas. Asimismo, [Panwar y col. \(2016\)](#) mostraron el efecto inhibitorio de las nanopartículas de quitosano sobre la biopelícula de *C. albicans* por reducción de la actividad metabólica e interferencia con la producción de la bio-matriz de la levadura. Los resultados obtenidos por [Ashrafi y col. \(2020\)](#) demostraron que las NpCu:Q y NpAg:Q tuvieron individualmente menores efectos inhibidores y antifúngicos que la combinación de NpAg/QCu.

Según [Fernandez-Saiz y col., \(2009\)](#), el tratamiento de la matriz de quitosano conduce a modificaciones químicas y estructurales, reduciendo la solubilidad del material en el medio de cultivo y en consecuencia las propiedades biocidas del mismo. Sin embargo, las mezclas de QAg y QCu con PVA en distintas proporciones también mantuvieron su carácter antimicrobiano.

Candida albicans

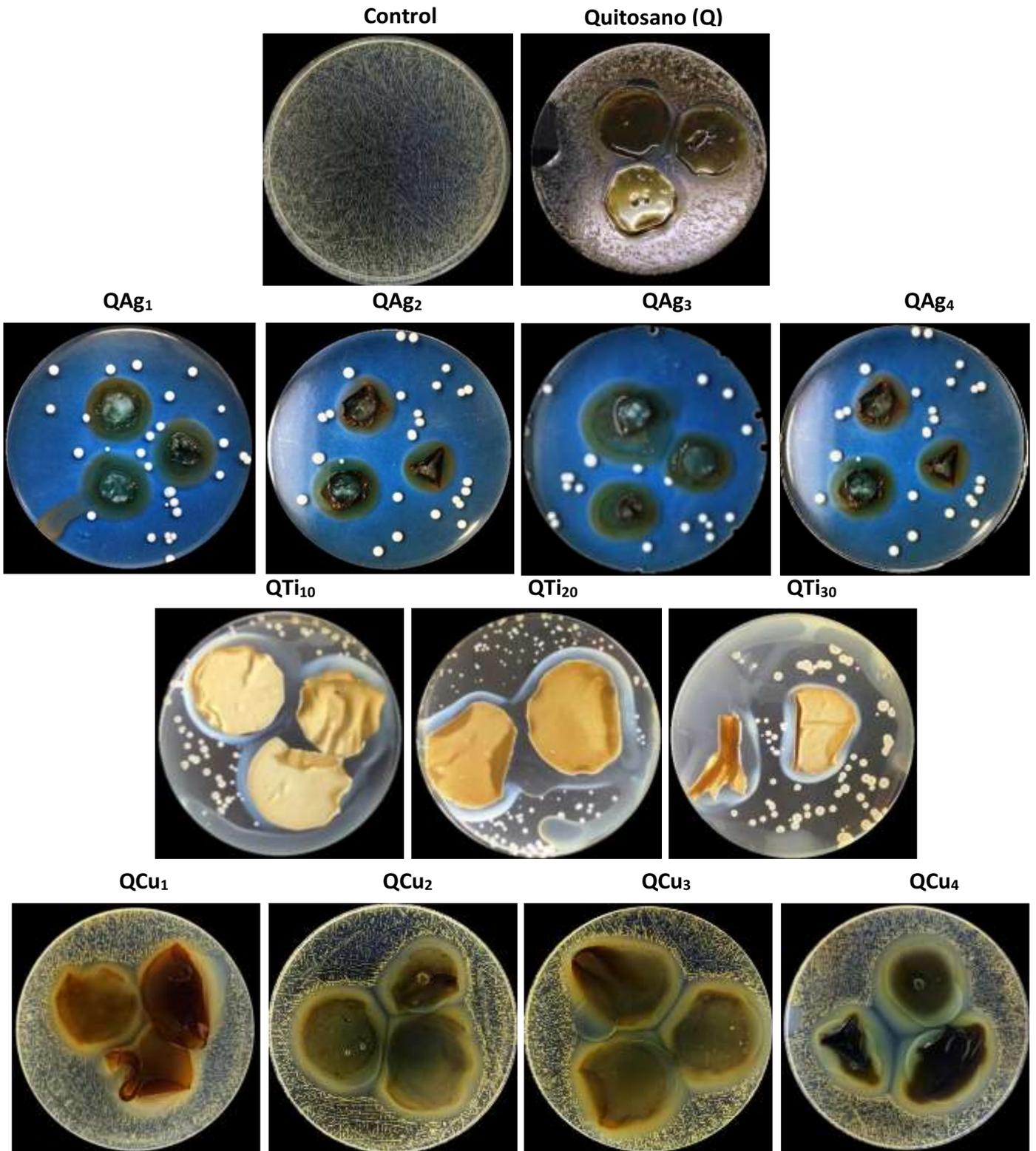
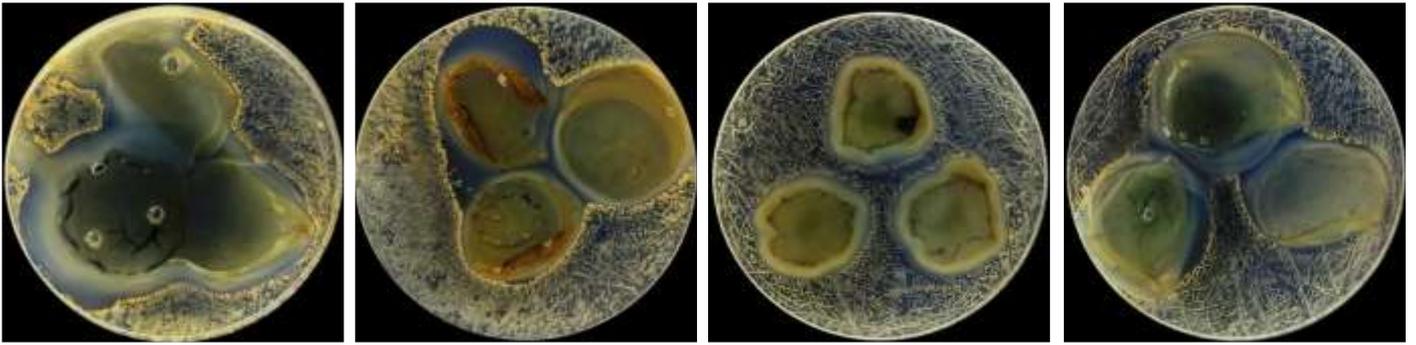
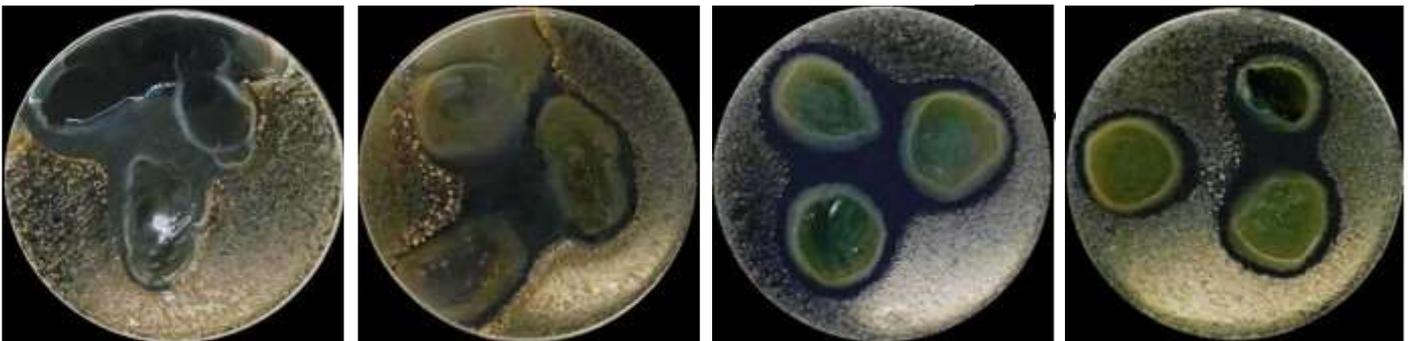


Figura 6.6. Fotografías de placas de Petri mostrando el crecimiento de *Candida albicans* control y los halos de inhibición generados por los discos de quitosano (Q) y los nanocompuestos a base de quitosano (Q) con incorporación de nanopartículas de Ag, TiO₂ o Cu.

9QCu-1PVA



7QCu-3PVA



5QCu-5PVA



Figura 6.7. Fotografías de placas de Petri sembradas con *Candida albicans* mostrando los halos de inhibición generados por los discos de nanocompuestos de mezclas de quitosano (Q) con incorporación de nanopartículas de Cu y PVA en distintas proporciones QCu:PVA, 90:10, 70:30 y 50:50 (v/v). Las formulaciones QCu_x-PVA, con x=1, 2, 3, 4 que forman parte de los nanocompuestos se muestran de izquierda a derecha.

9QAg-1PVA



7QAg-3PVA



5QAg-5PVA



Figura 6.8. Fotografías de placas de Petri sembradas con *Candida albicans* mostrando los halos de inhibición generados por los discos de nanocompuestos de mezclas de quitosano (Q) con incorporación de nanopartículas de Cu y PVA en distintas proporciones QCu:PVA, 90:10, 70:30 y 50:50 (v/v). Las formulaciones QAg_x-PVA, con x=1, 2, 3, 4 que forman parte de los nanocompuestos se muestran de izquierda a derecha.

Microorganismo: Salmonella

Salmonella, de nombre común salmonela, es un género bacteriano perteneciente a la familia Enterobacteriaceae constituido por bacilos Gram-negativo intracelulares anaerobios facultativos con flagelos peritricos. Constituye un grupo importante de patógenos que pueden causar diarrea y, en ocasiones, una infección llamada fiebre tifoidea.

Puesta en contacto con matrices nanocompuestas funcionalizadas, estas demostraron ser capaces de inhibir su desarrollo. Se observaron valores significativamente altos del PI ($p < 0.05$) de *Salmonella* con los grupos de película QCu:PVA (Figura 6.9). En las Figuras 6.10-6.12 se exhiben los halos de inhibición causados por el contacto del cultivo de *Salmonella* con las matrices nanocompuestas QTi, QAg, QCu y las mezclas con PVA.

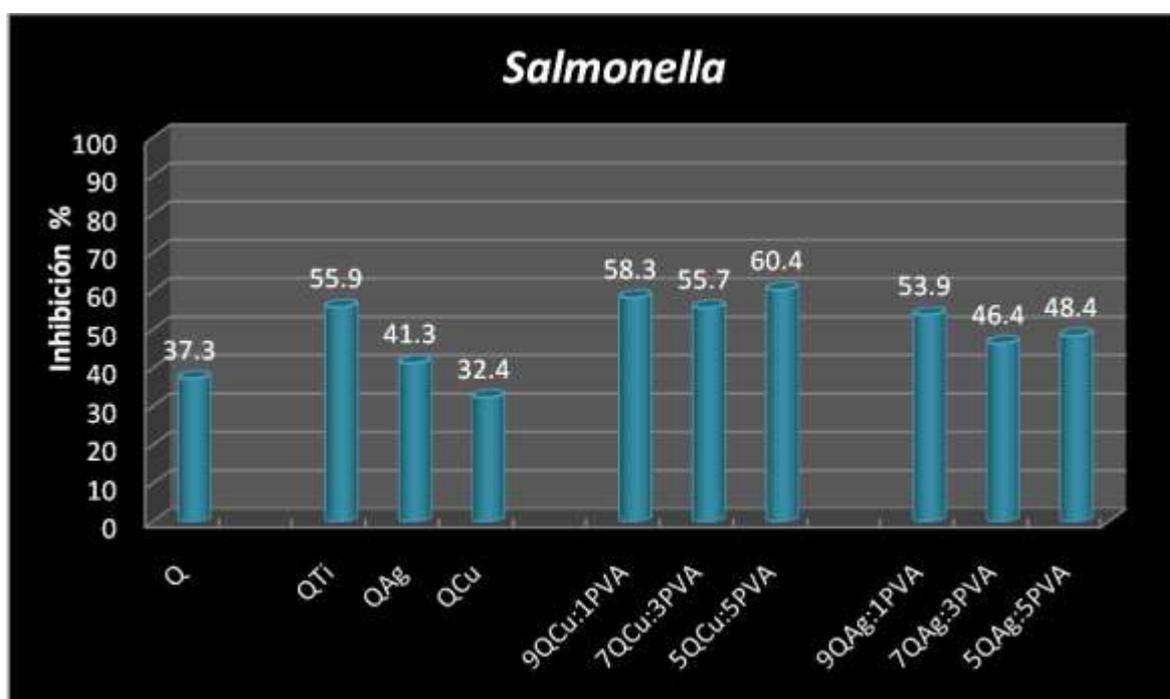


Figura 6.9. Porcentaje de inhibición de *Salmonella* obtenido por el método de difusión de disco para las distintas formulaciones ensayadas.

Salmonella

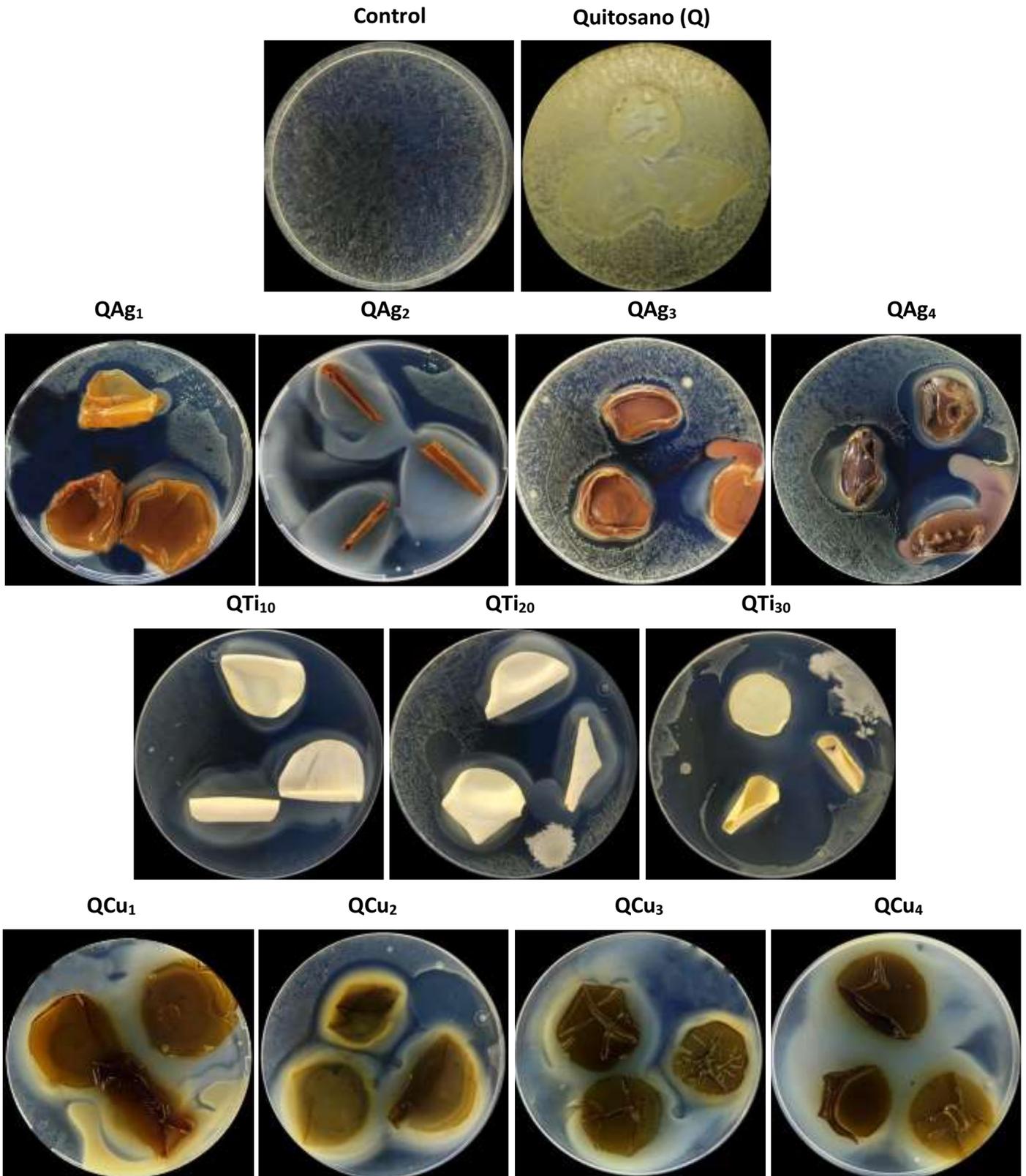


Figura 6.10. Fotografías de placas de Petri mostrando el crecimiento de *Salmonella* control y los halos de inhibición generados por los discos de quitosano (Q) y los nanocompuestos a base de quitosano (Q) con incorporación de nanopartículas de Ag, TiO₂ y Cu.

9QAg-1PVA



7QAg-3PVA

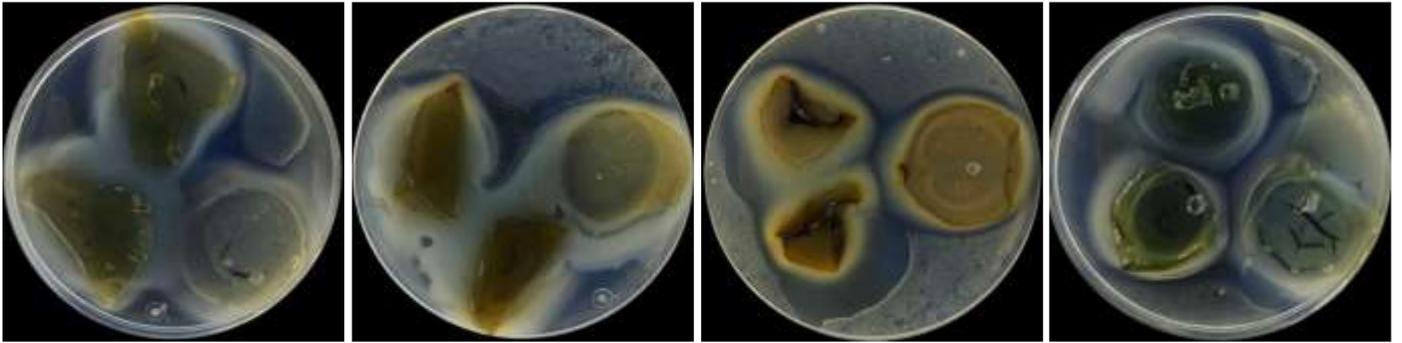


5QAg-5PVA

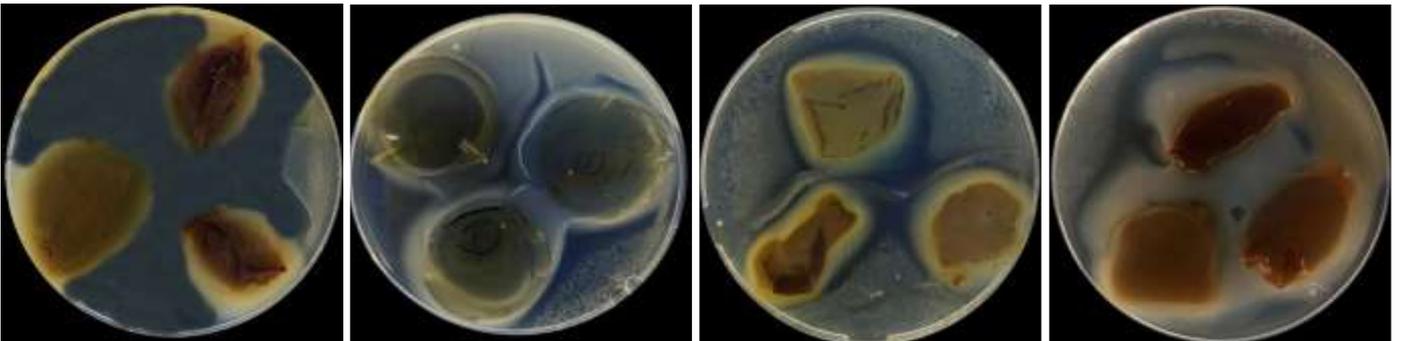


Figura 6.11. Fotografías de placas de Petri sembradas con *Salmonella* mostrando los halos de inhibición generados por los discos de nanocompuestos de mezclas de quitosano (Q) con incorporación de nanopartículas de Ag y PVA en distintas proporciones QAg:PVA, 90:10, 70:30 y 50:50 (v/v). Las formulaciones QAg_x-PVA, con x=1, 2, 3, 4 que forman parte de los nanocompuestos se muestran de izquierda a derecha.

9QCu-1PVA



7QCu-3PVA



5QCu-5PVA

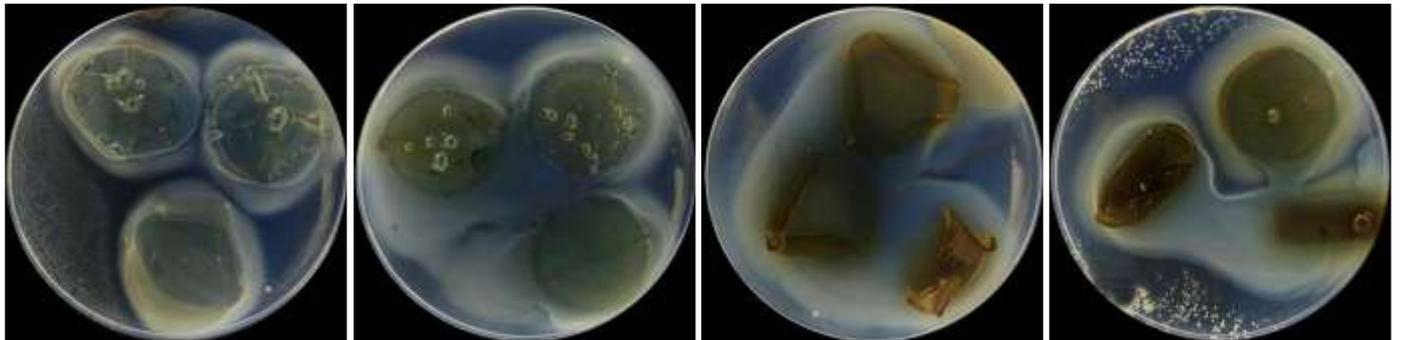


Figura 6.12. Fotografías de placas de Petri sembradas con *Salmonella* mostrando los halos de inhibición generados por los discos de nanocompuestos de mezclas de quitosano (Q) con incorporación de nanopartículas de Cu y PVA en distintas proporciones QCu:PVA, 90:10, 70:30 y 50:50 (v/v). Las formulaciones QCu_x-PVA, con x=1, 2, 3, 4 que forman parte de los nanocompuestos se muestran de izquierda a derecha.

Microorganismo: *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) es un grupo de bacterias Gram-negativas que residen habitualmente en el intestino de personas sanas, pero algunas de sus cepas pueden provocar infección del tubo digestivo, las vías urinarias o muchas otras partes del organismo.

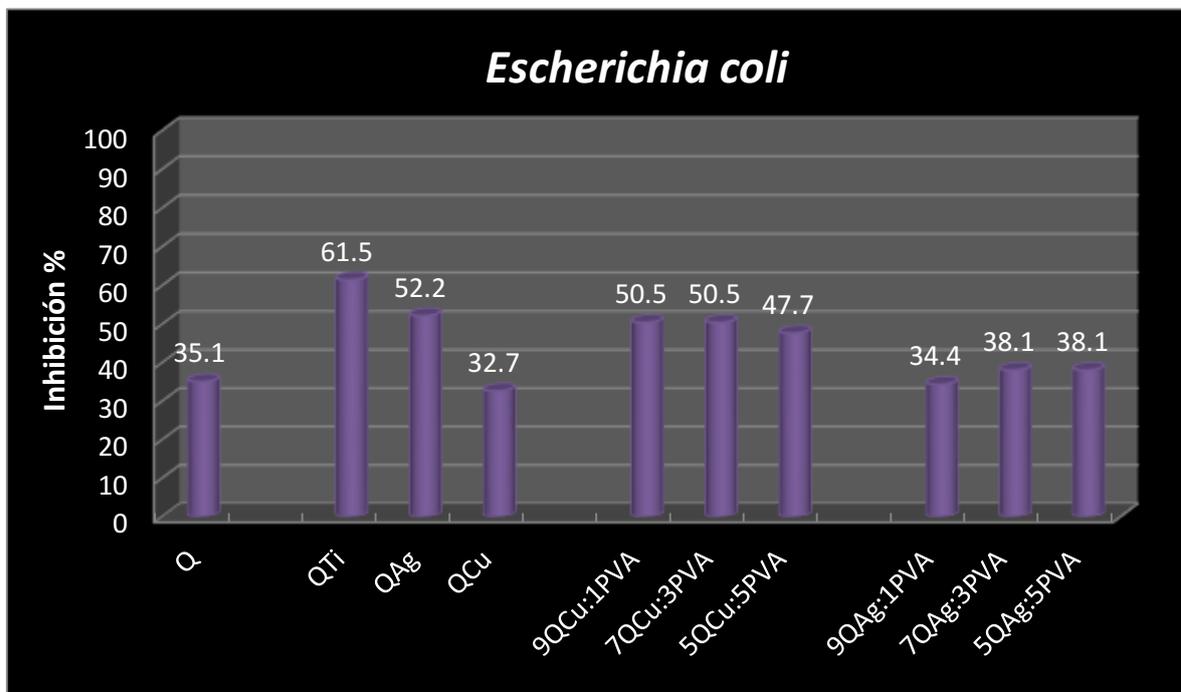


Figura 6.13. Porcentaje de inhibición de *E. coli* obtenido por el método de difusión de disco para las distintas formulaciones ensayadas.

Las propiedades antimicrobianas de los compuestos que incluyen nanopartículas de TiO₂ y Ag fueron superiores a las de Cu. En ese sentido, Lin y col., (2020) incorporaron nanopartículas de TiO₂ y Ag en películas de gelatina y quitosano demostrando excelentes propiedades antimicrobianas contra *E. coli*, *Staphylococcus aureus* y *Botrytis cinerea*.

Sin embargo, en presencia de PVA las propiedades antimicrobianas de los nanocompuestos funcionalizados con Ag se deterioraron y no mostraron diferencias significativas con respecto a la película Q ($p \geq 0.05$).

Las Figuras 6.14-6.16 muestran los halos de inhibición debido a los agentes antimicrobianos presentes en los nanocompuestos en contacto con *E. coli*.

Escherichia coli

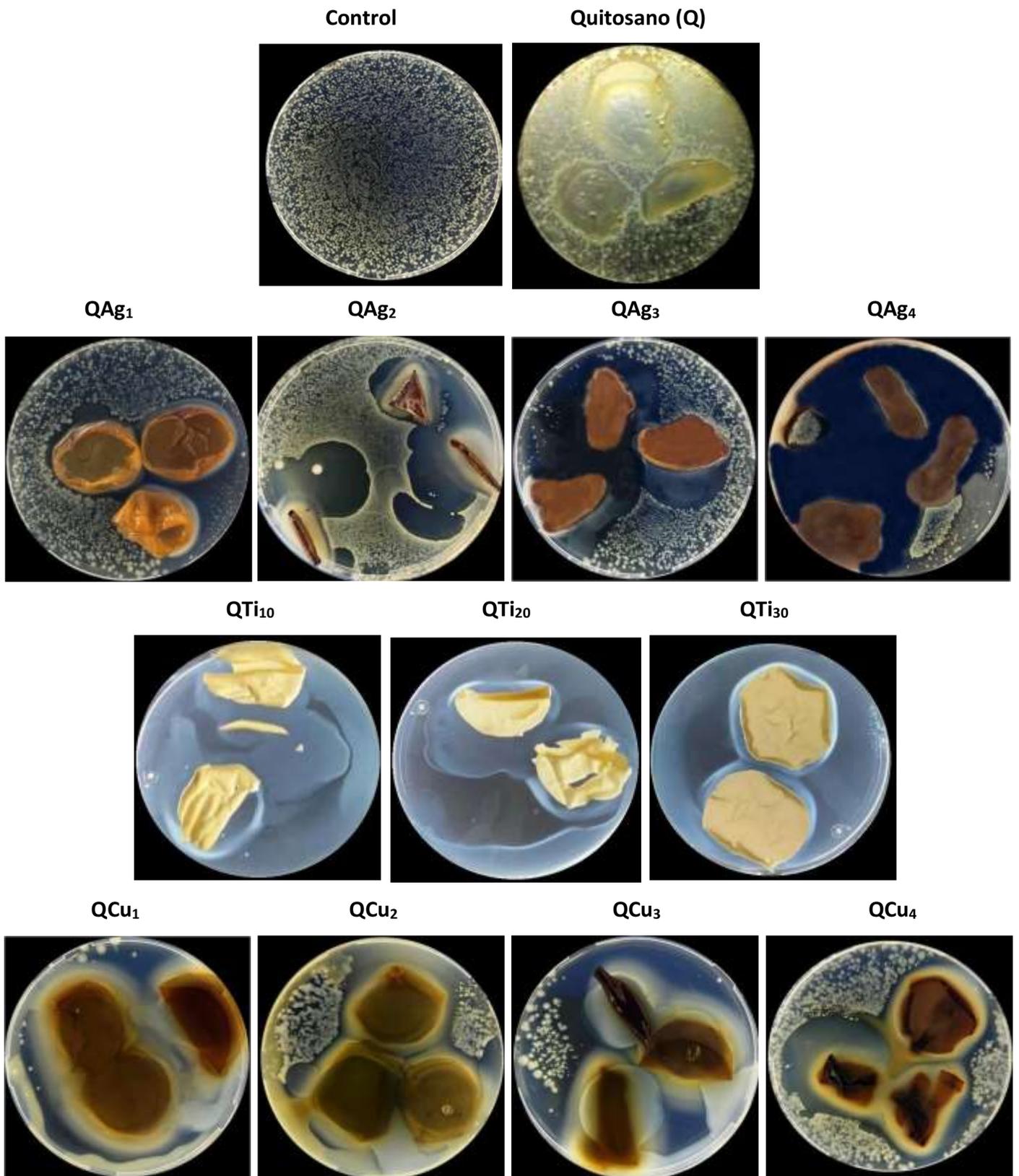


Figura 6.14. Fotografías de placas de Petri mostrando el crecimiento de *Escherichia coli* control y los halos de inhibición generados por los discos de quitosano (Q) y los nanocompuestos a base de quitosano (Q) con incorporación de nanopartículas de Ag, TiO₂ y Cu.

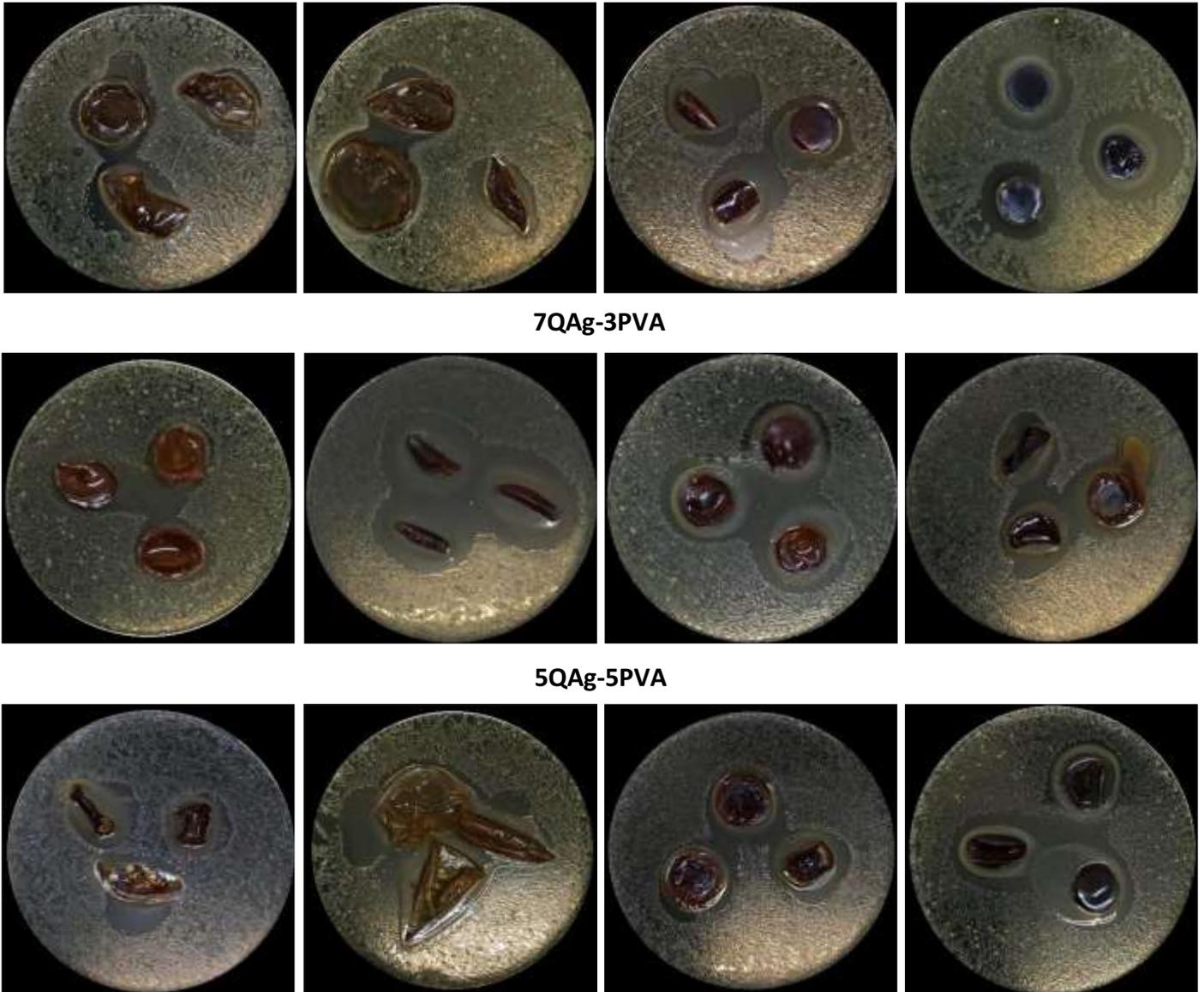
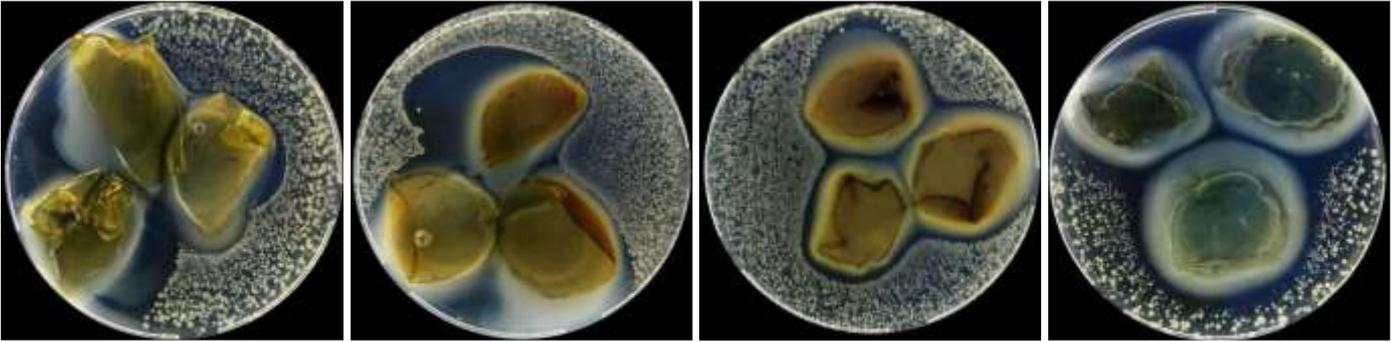
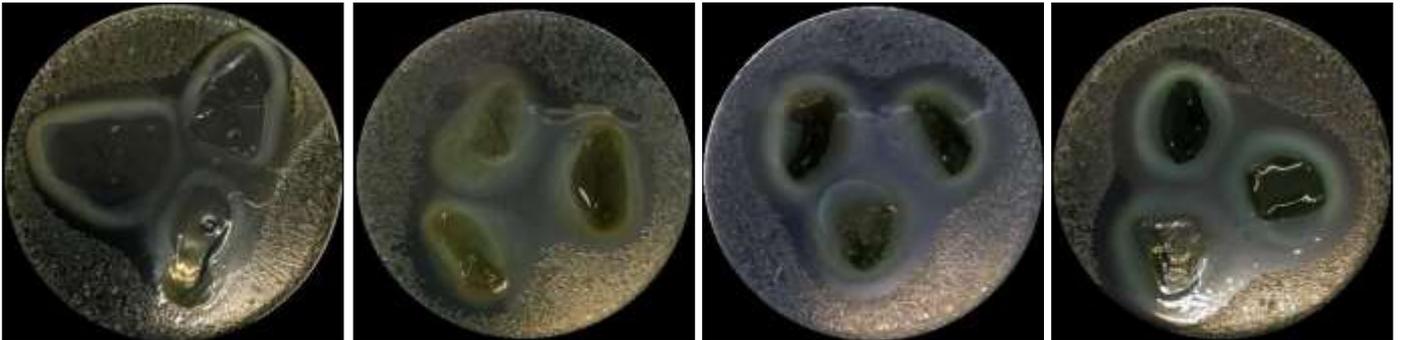


Figura 6.15. Fotografías de placas de Petri sembradas con *Escherichia coli* mostrando los halos de inhibición generados por los discos de nanocompuestos de mezclas de quitosano (Q) con incorporación de nanopartículas de Ag y PVA en distintas proporciones QAg:PVA, 90:10, 70:30 y 50:50 (v/v). Las formulaciones QAg_x-PVA, con x=1, 2, 3, 4 que forman parte de los nanocompuestos se muestran de izquierda a derecha.

9QCu-1PVA



7QCu-3PVA



5QCu-5PVA



Figura 6.16. Fotografías de placas de Petri sembradas con *Escherichia coli* mostrando los halos de inhibición generados por los discos de nanocompuestos de mezclas de quitosano (Q) con incorporación de nanopartículas de Cu y PVA en distintas proporciones QCu:PVA, 90:10, 70:30 y 50:50 (v/v). Las formulaciones QCu_x-PVA, con x=1, 2, 3, 4 que forman parte de los nanocompuestos se muestran de izquierda a derecha.

Microorganismo: *Staphylococcus aureus*

Como puede observarse en las Figuras 6.13 y 6.17 tanto *E. coli* como *S. aureus* presentaron mayor sensibilidad a las nanopartículas de plata que a las nanopartículas de cobre en presencia de quitosano. Sin embargo, la presencia de una proporción de PVA causó un menor efecto inhibitorio de las NpAg posiblemente relacionada con el entrecruzamiento producido por este polímero.

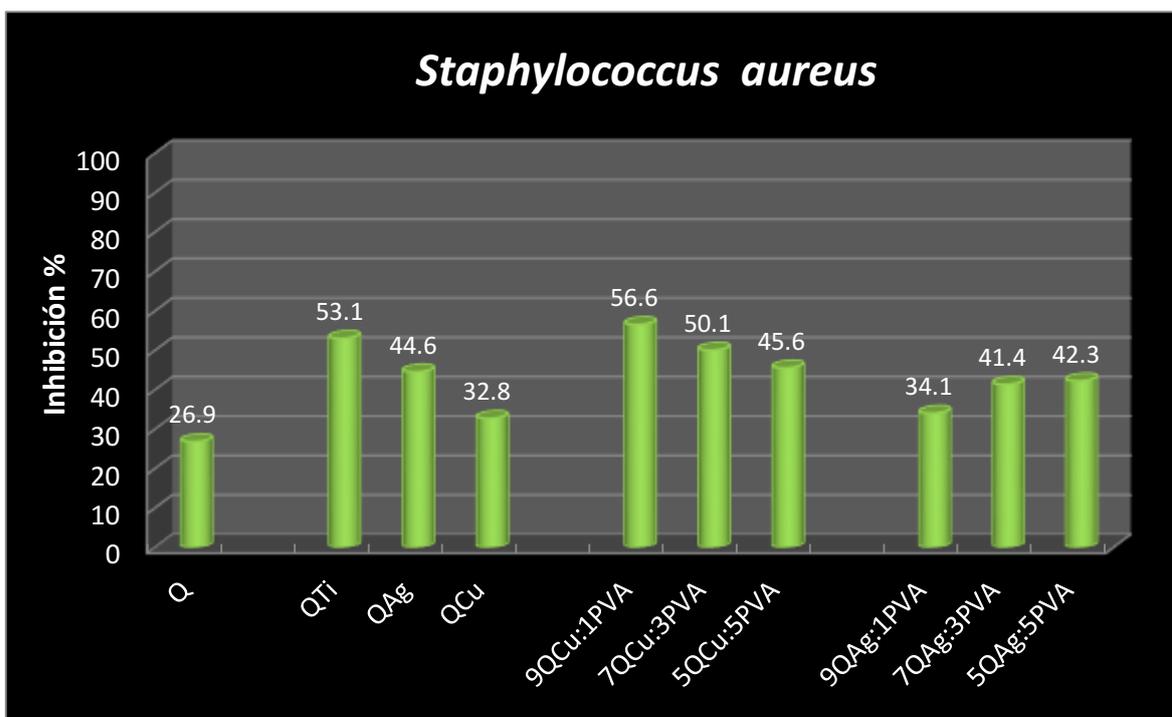


Figura 6.17. Porcentaje de inhibición de *S. aureus* obtenido por el método de difusión de disco para las distintas formulaciones ensayadas.

Kim y col. (2000) informaron que *S. aureus* fue más resistente a las nanopartículas de plata en comparación con *E. coli*, basados en estudios con cepas individuales de cada cultivo. Resultados similares fueron informados por Ruparelia y col. (2008).

Ruparelia y col. (2008) analizando las propiedades antimicrobianas de nanopartículas de Cu y Ag en suspensión sobre *S. aureus* y *E. coli* encontraron que el medio nutritivo facilitó la liberación de iones Ag^+ y Cu^{2+} posiblemente debido a la reacción con los constituyentes del medio. Los autores explicaron que la mayor liberación de iones Cu^{2+} en el medio nutritivo fue posiblemente debido a la presencia de la capa de óxido en las nanopartículas

Capítulo 6: Propiedades antimicrobianas de las matrices activas

de cobre y la reacción con iones cloruro en el medio. Además del efecto directo de las nanopartículas sobre la membrana bacteriana, los efectos bactericidas observados también se vieron afectados por la liberación de iones $\text{Ag}^+/\text{Cu}^{2+}$ en solución. La presencia de nanopartículas en suspensión garantizaría la liberación continua de iones en los medios nutritivos. Los iones de plata o cobre liberados por las nanopartículas pueden adherirse a la pared celular bacteriana cargada negativamente y romperla, lo que conduce a la desnaturalización de proteínas y a la muerte celular.

Anaya y col. (2013) trabajando con películas de quitosano encontraron resultados similares. Manikandan y Sathiyabama (2015) sintetizaron nanopartículas de cobre en presencia de quitosano las que exhibieron actividad antimicrobiana contra bacterias Gram negativas y Gram positivas (*E.coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus*).

En la Figura 6.18 se observan los halos debidos a los nanocompuestos a base de quitosano. Las Figura 6.19-6.20 exhiben los halos de inhibición de *S. aureus* generados por la presencia de los nanocompuestos QNp-PVA funcionalizados con NpAg y NpCu.

Capítulo 6: Propiedades antimicrobianas de las matrices activas

Staphylococcus aureus

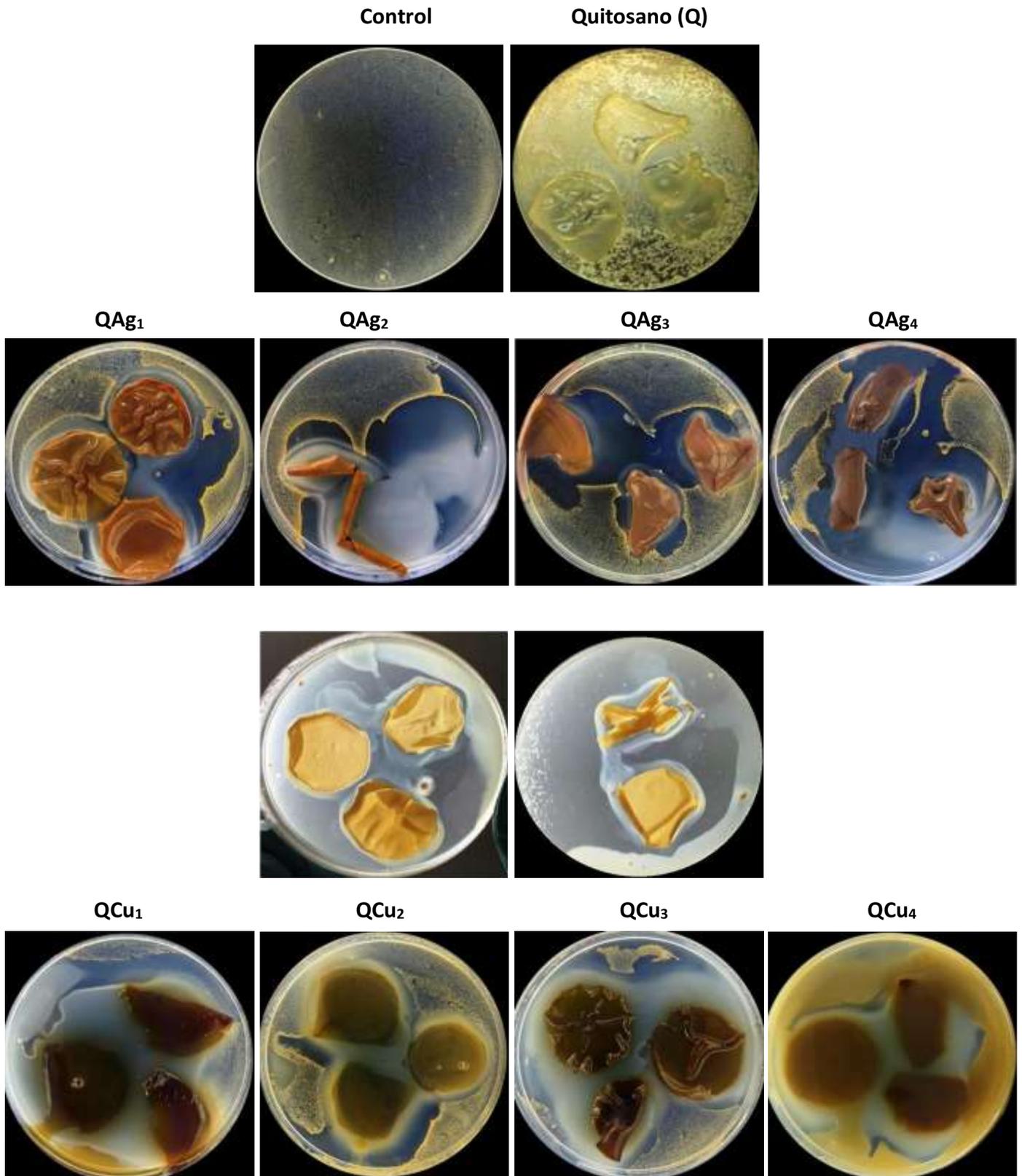
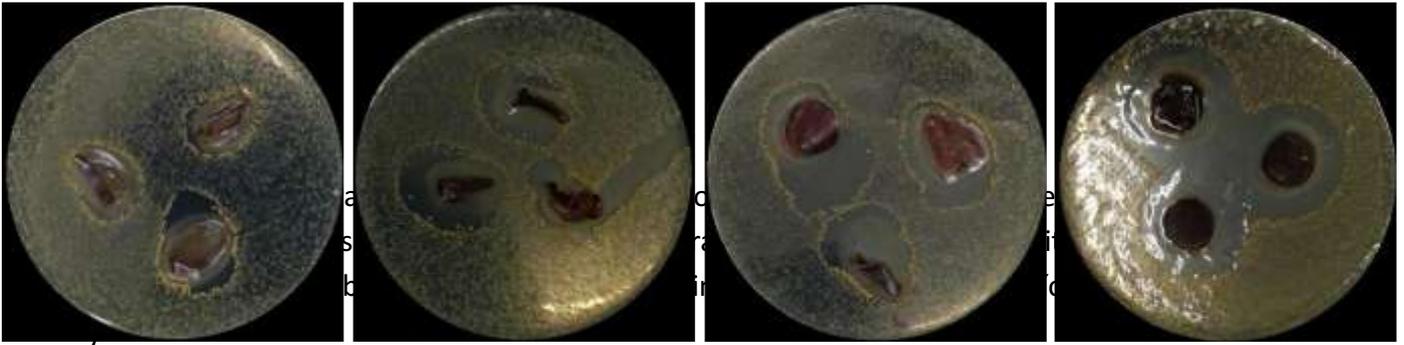
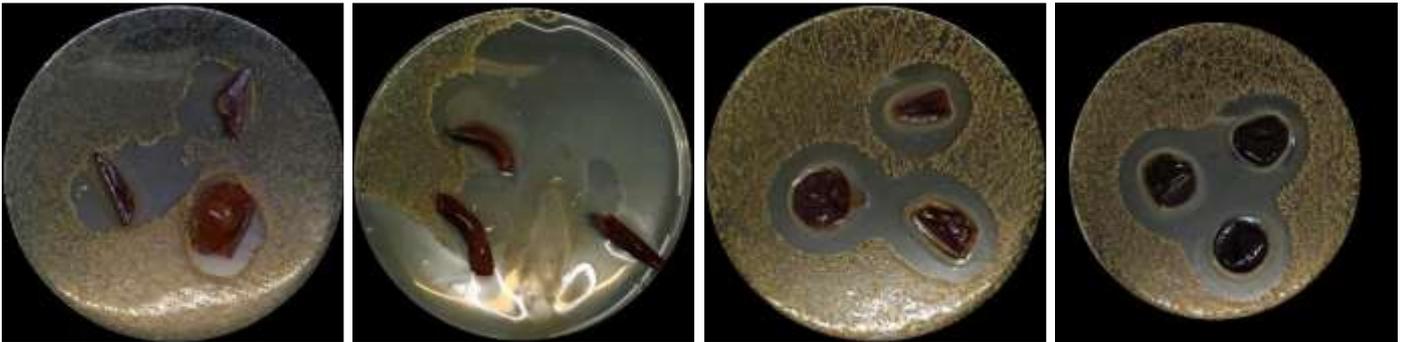


Figura 6.18. Fotografías de placas de Petri mostrando el crecimiento de *Staphylococcus aureus* control y los halos de inhibición generados por los discos de quitosano (Q) y los nanocompuestos a base de quitosano (Q) con incorporación de nanopartículas de Ag, TiO₂ y Cu.

9QAg-1PVA



7QAg-3PVA



5QAg-5PVA

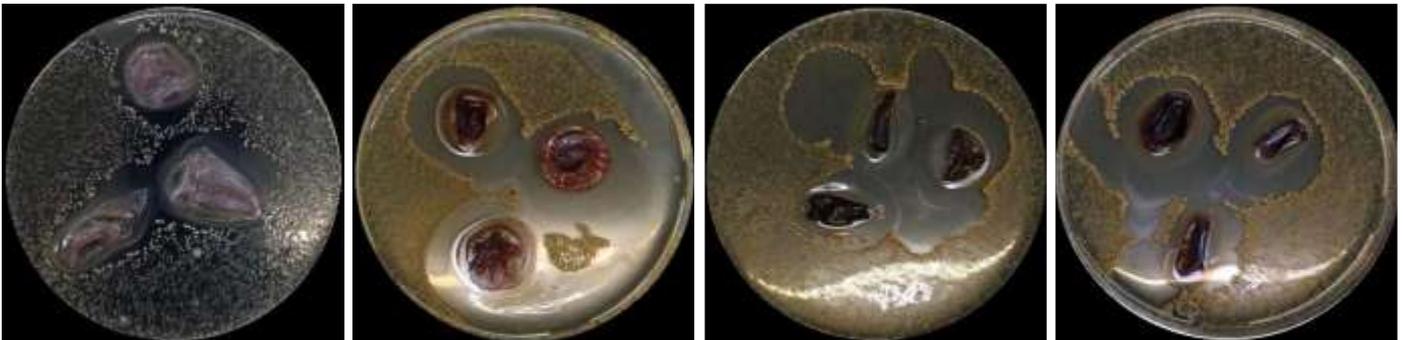
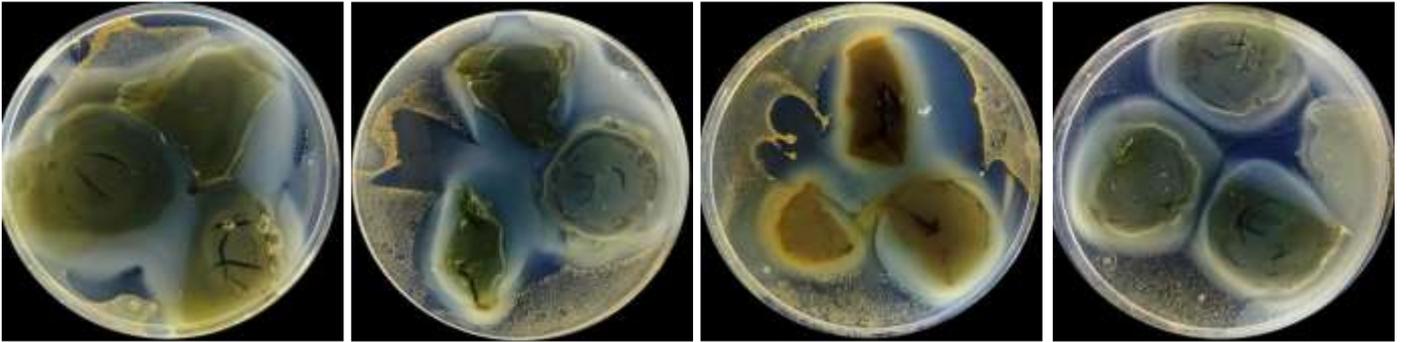
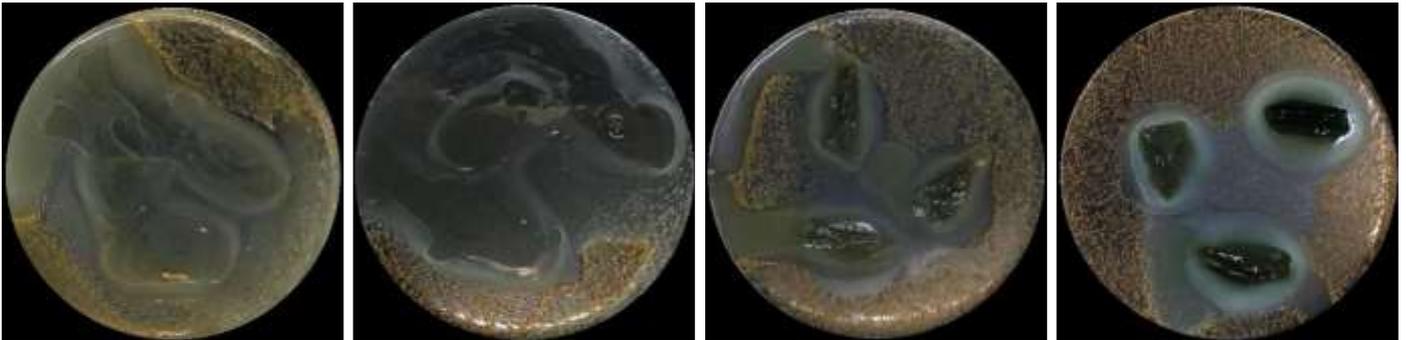


Figura 6.19. Fotografías de placas de Petri sembradas con *Staphylococcus aureus* mostrando los halos de inhibición generados por los discos de nanocompuestos de mezclas de quitosano (Q) con incorporación de nanopartículas de Ag y PVA en distintas proporciones QAg:PVA, 90:10, 70:30 y 50:50 (v/v). Las formulaciones QAg_x-PVA, con x=1, 2, 3, 4 que forman parte de los nanocompuestos se muestran de izquierda a derecha.

9QCu-1PVA



7QCu-3PVA



5QCu-5PVA

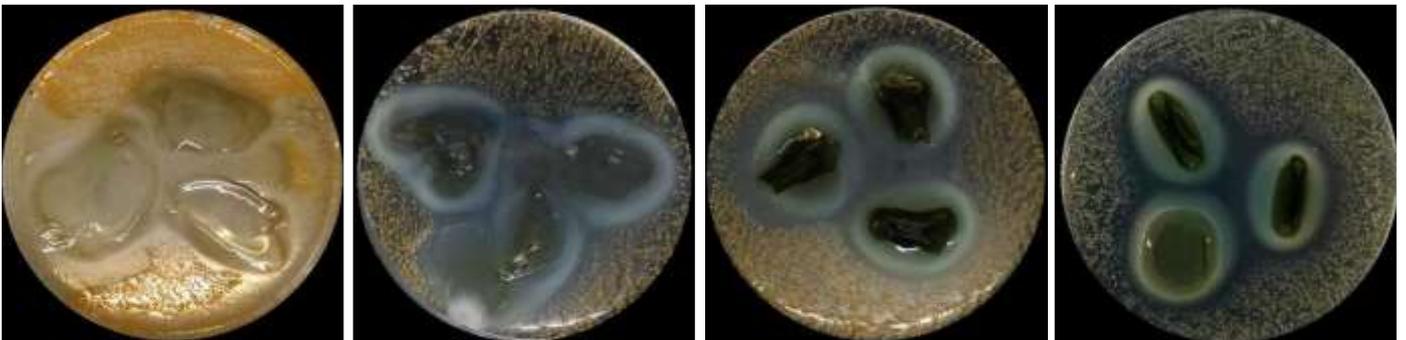


Figura 6.20. Fotografías de placas de Petri sembradas con *Staphylococcus aureus* mostrando los halos de inhibición generados por los discos de nanocompuestos de mezclas de quitosano (Q) con incorporación de nanopartículas de Cu y PVA en distintas proporciones QCu:PVA, 90:10, 70:30 y 50:50 (v/v). Las formulaciones QCu_x-PVA, con x=1, 2, 3, 4 que forman parte de los nanocompuestos se muestran de izquierda a derecha.

Microorganismo: *Staphylococcus epidermidis*

S. epidermidis es el agente causal de diferentes entidades clínicas, infecciones urinarias intrahospitalarias, osteomielitis, endocarditis de válvula nativa, bacteremia en pacientes inmunosuprimidos, endoftalmitis después de cirugía ocular, infecciones de dispositivos médicos o cuerpos extraños (catéteres endovenosos, fístulas para hemodiálisis, catéteres de diálisis peritoneal, marcapasos, articulaciones protésicas, injertos vasculares, válvulas cardíacas protésicas e implantes de mama), entre otras.

La Figura 6.21 muestra el porcentaje de inhibición calculado a partir de los halos de inhibición en cultivos de *S. epidermidis* tratados con los nanocompuestos desarrollados (Figuras 6.22-6.24). Todas las matrices nanocompuestas demostraron capacidad antimicrobiana frente a *S. epidermidis*.

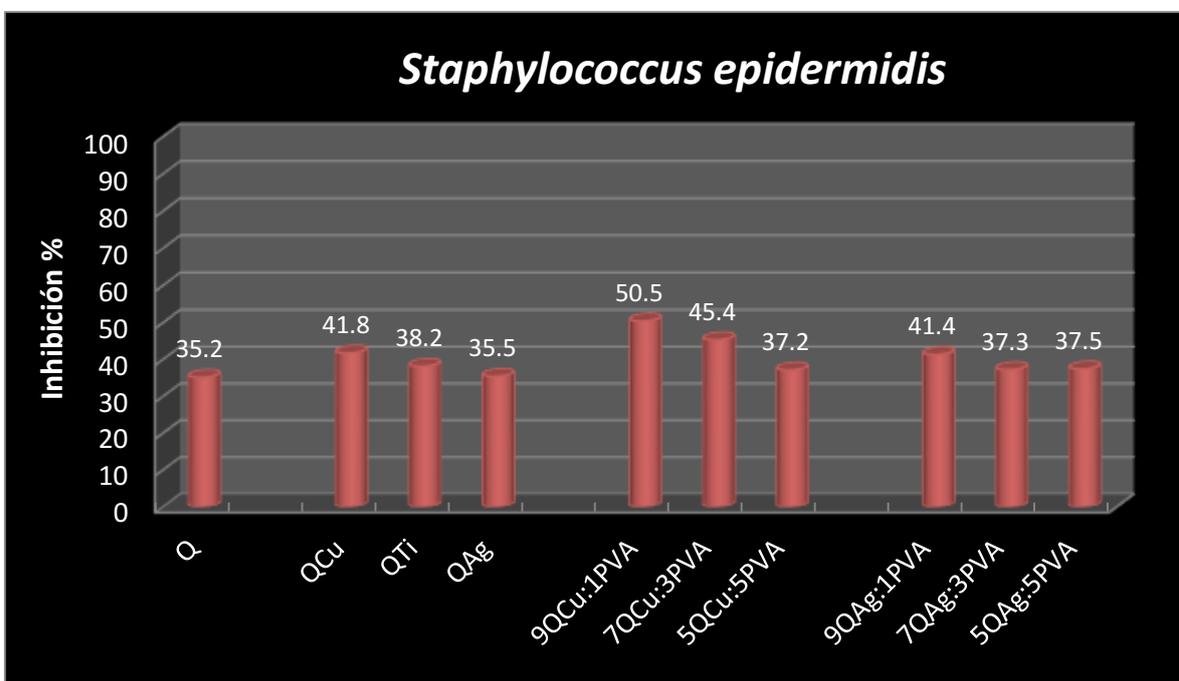


Figura 6.21. Porcentaje de inhibición de *S. epidermidis* obtenido por el método de difusión de disco para las distintas formulaciones ensayadas.

Capítulo 6: Propiedades antimicrobianas de las matrices activas

Staphylococcus epidermidis

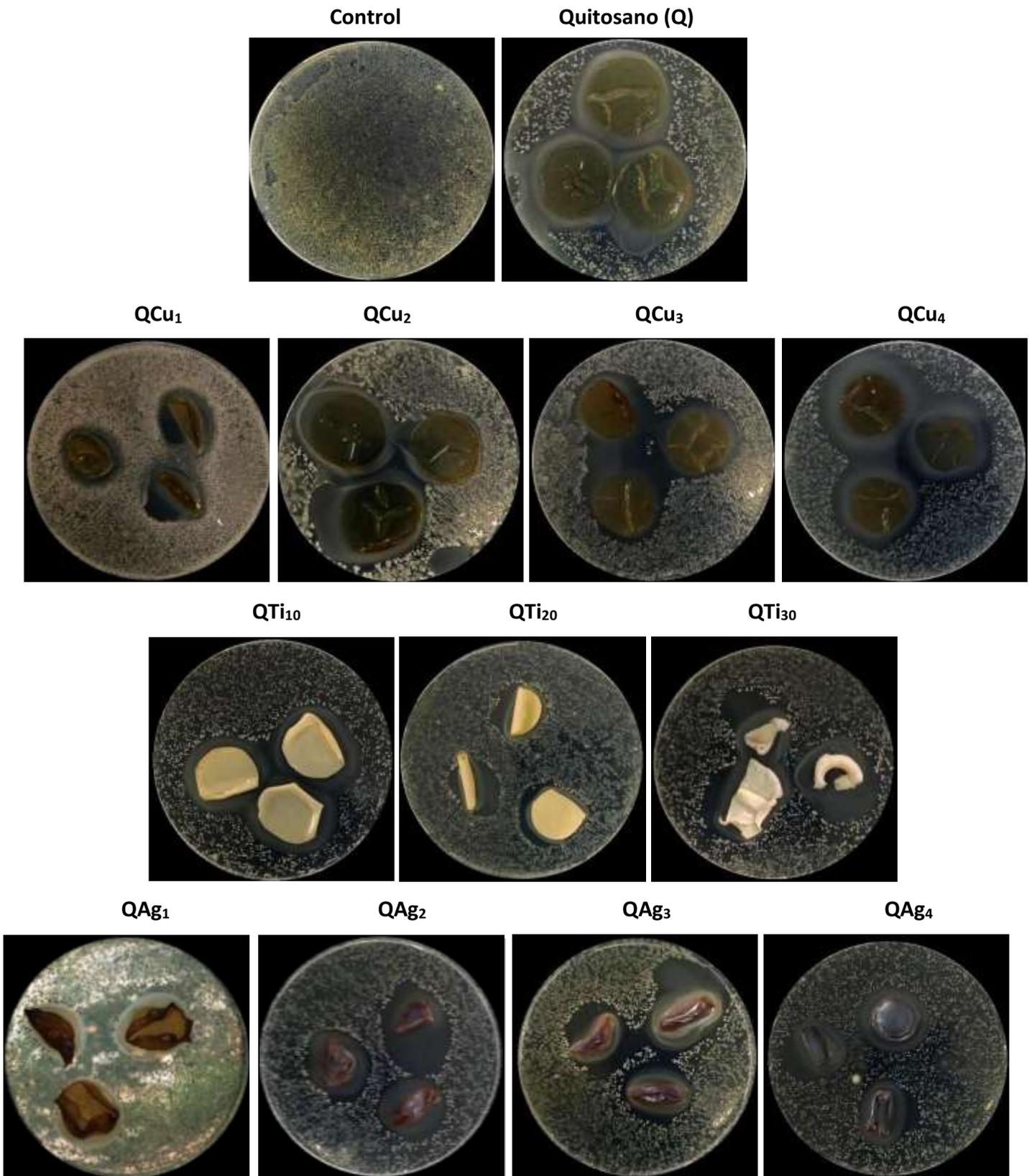


Figura 6.22. Fotografías de placas de Petri mostrando el crecimiento de *Staphylococcus epidermidis* control y los halos de inhibición generados por los discos de quitosano (Q) y los nanocompuestos a base de quitosano (Q) con incorporación de nanopartículas de Ag, TiO₂ y Cu.

9QAg-1PVA



7QAg-3PVA

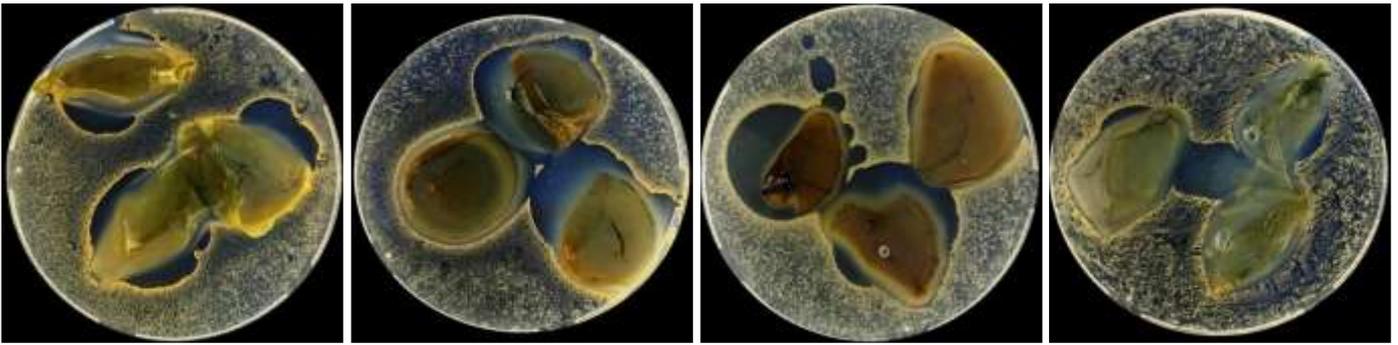


5QAg-5PVA



Figura 6.23. Fotografías de placas de Petri sembradas con *Staphylococcus epidermidis* mostrando los halos de inhibición generados por los discos de nanocompuestos de mezclas de quitosano (Q) con incorporación de nanopartículas de Ag y PVA en distintas proporciones QAg:PVA, 90:10, 70:30 y 50:50 (v/v). Las formulaciones QAg_x-PVA, con x=1, 2, 3, 4 que forman parte de los nanocompuestos se muestran de izquierda a derecha.

9QCu-1PVA



7QCu-3PVA



5QCu-5PVA

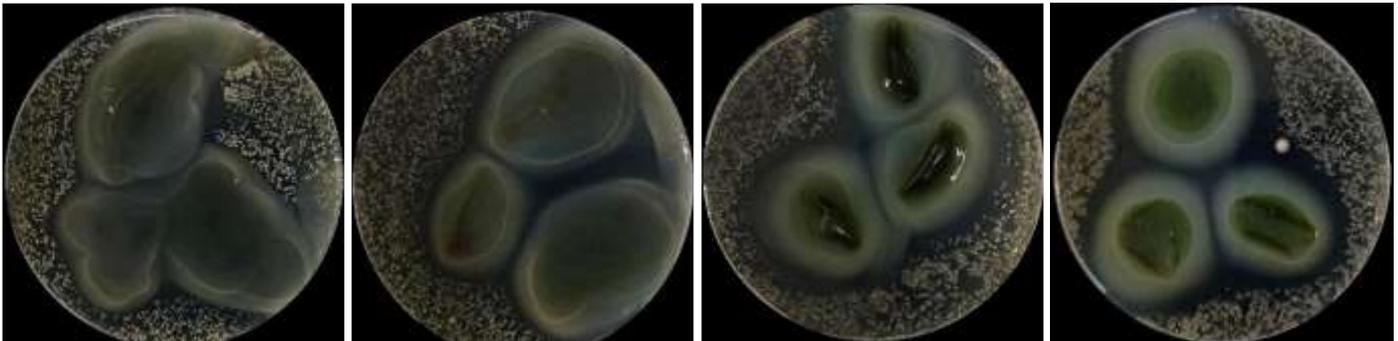


Figura 6.24. Fotografías de placas de Petri sembradas con *Staphylococcus epidermidis* mostrando los halos de inhibición generados por los discos de nanocompuestos de mezclas de quitosano (Q) con incorporación de nanopartículas de Cu y PVA en distintas proporciones QCu:PVA, 90:10, 70:30 y 50:50 (v/v). Las formulaciones QCu_x-PVA, con x=1, 2, 3, 4 que forman parte de los nanocompuestos se muestran de izquierda a derecha.

6.4.5 Potencial zeta

Las Figuras 6.25 y 6.26 muestran los valores de potencial zeta (PZ) de las cepas *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *Salmonella* spp y *Candida albicans*. La pared celular de las bacterias Gram-positivas involucra capas de peptidoglicanos que son ricas en grupos de ácido teicoico. El valor negativo medido del potencial zeta para *S. aureus* y *S. epidermidis* (-34.5 y -33.9 mV) estuvo asociado a la existencia de grupos de fosfato aniónico en las unidades de repetición de fosfato glicerol de ácidos teicoicos. En el caso de *E. coli* y *Salmonella* spp. el potencial zeta negativo de -13.4 mV y -10.3 mV se atribuyó a los grupos fosfato e hidroxilo (Cheng y col., 2020; Oh y col., 2018). La capa externa de bacterias Gram-negativas contiene principalmente lipopolisacáridos, que incluyen grupos fosfatados en el núcleo interno y grupos polares hidroxilos en las unidades de repetición de azúcar (N-acetil-D-perosamina, L-fucosa, D-glucosa y N-acetil-D-galactosa).

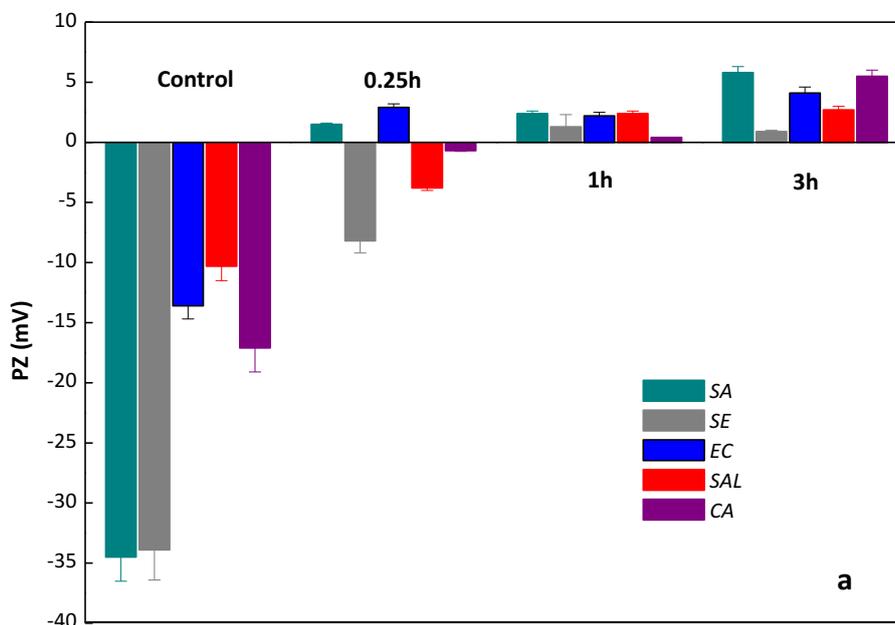
Los nanocompuestos a base de quitosano exhibieron una carga superficial neta positiva que llevó a interacciones con las membranas de las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, cargadas negativamente, llevando la carga superficial de negativa a positiva. Es decir, las bacterias fueron absorbidas físicamente en las películas basadas en quitosano cargadas positivamente por interacción electrostática. Resultados similares fueron obtenidos por Korupalli y col. (2017).

El conocimiento de las propiedades electroquímicas de los microorganismos es beneficioso para explicar los procesos de adsorción de bacterias y la formación de biofilms (Jastrzebska y col., 2015). También es muy importante en la detección de viabilidad y cambios morfológicos de las células bacterianas y actualmente emerge como una herramienta de diagnóstico para determinar sus características fenotípicas o incluso viabilidad (Brunelle, 1978; Kłodzińska y col., 2010).

Existen diferencias en las propiedades electrocinéticas entre bacterias Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*) y bacterias Gram-negativa (*Escherichia coli*). Kłodzińska y col. (2010) encontraron que la medición de la movilidad electroforética se puede utilizar para detectar la diferencia en la estructura de la superficie entre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

POTENCIAL ZETA

Incubación de microorganismos con películas Q



Incubación de microorganismos con nanocompuestos QAg

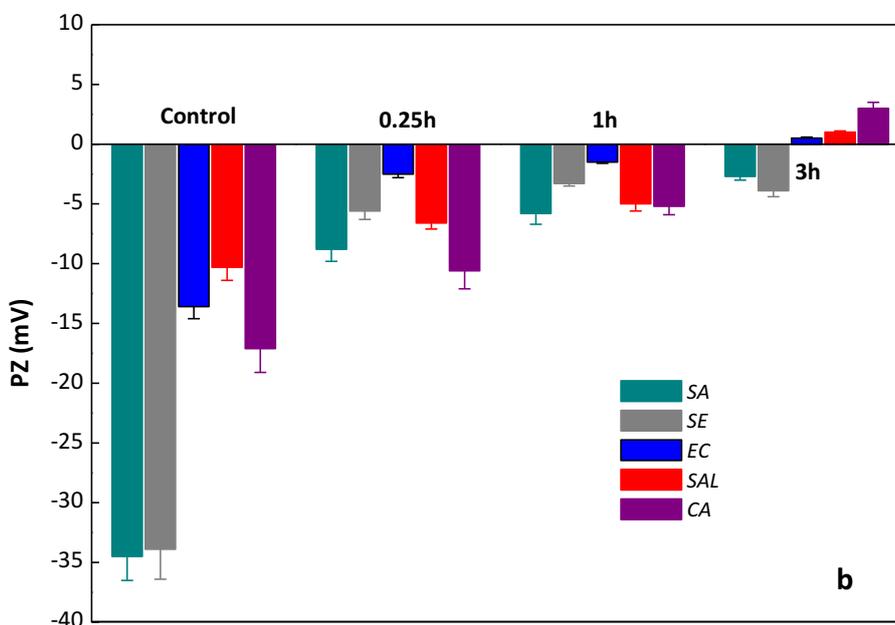
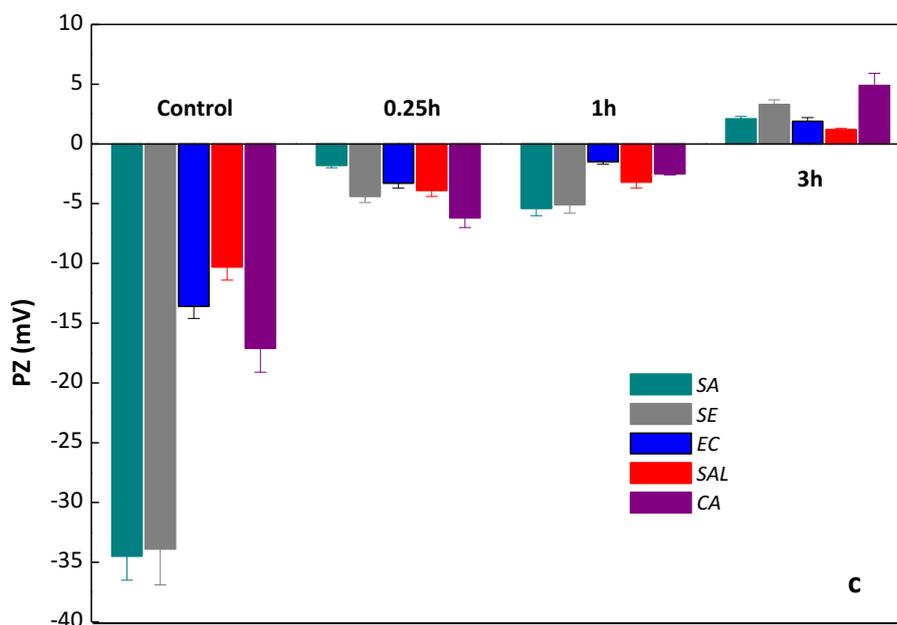


Figura 6.25. Potencial zeta expresado en mV de suspensiones de bacterias Gram-positivas (*S. aureus* y *S. epidermidis*), Gram-negativas (*E. coli*. y *Salmonella*) y *Candida albicans* incubadas durante 0.25, 1 y 3 h en presencia de (a) películas de quitosano (Q) y (b) nanocompuestos QAg.

POTENCIAL ZETA

Incubación de microorganismos con nanocompuestos QCu



Incubación de microorganismos con nanocompuestos QT_iO₂

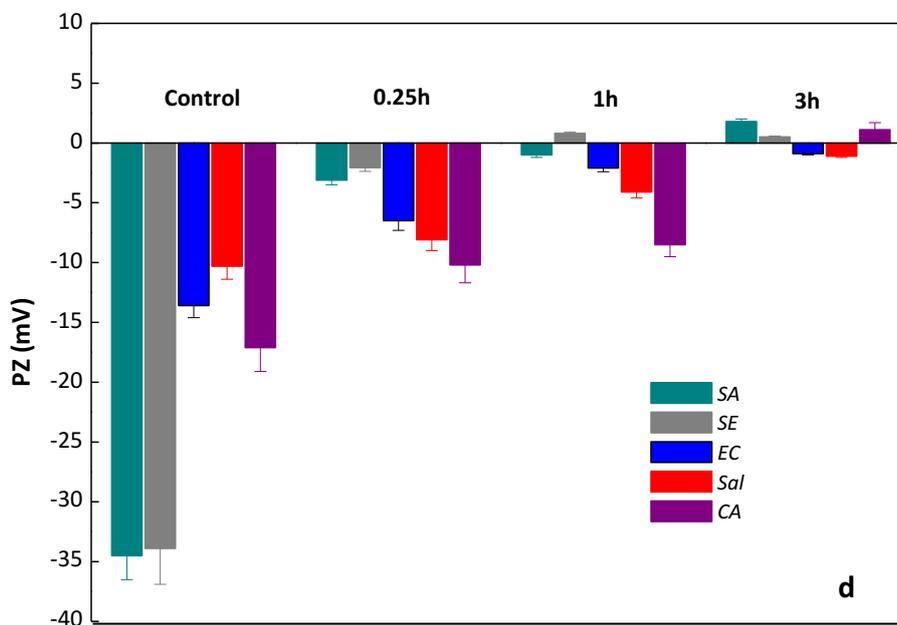


Figura 6.26. Potencial zeta expresado en mV de suspensiones de bacterias Gram-positivas (*S. aureus* y *S. epidermidis*), Gram-negativas (*E. coli* y *Salmonella*) y *Candida albicans* incubadas durante 0.25, 1 y 3 h en presencia de (c) nanocompuestos QCu y (d) nanocompuestos QT_i.

Capítulo 6: Propiedades antimicrobianas de las matrices activas

La composición química del medio acuoso tuvo una influencia significativa en el valor del potencial zeta de las bacterias analizadas y el signo de la carga de la superficie celular fue negativo observándose el punto isoeléctrico entre 1 y 3 h de incubación, rango en el que la carga tomó valores positivos (Figuras 6.25 y 6.26). Estos resultados están de acuerdo con los datos científicos de otros autores, mostrando que las propiedades eléctricas de las células bacterianas pueden ser caracterizadas por medio del potencial zeta (Wilson y col., 2001). Sin embargo, se debe tener en cuenta que la estructura de la superficie bacteriana es mucho más complicada y diversa que la superficie de una partícula inerte haciendo que la adhesión bacteriana a superficies sólidas sea un problema relativamente complicado.

Interacción con células fúngicas

Como muestran muchos estudios, el quitosano puede inhibir el crecimiento de las células bacterianas e incluso matarlas, pero en lo que respecta a las células de levadura, solo altas concentraciones de quitosano pueden tener un efecto antifúngico e inhibir el crecimiento de las células (Lopez-Moya y col., 2019; Matica y col., 2019). Dado que la naturaleza catiónica del quitosano es el resultado de la presencia de grupos amino reactivos en su estructura, si estos grupos se bloquean, la actividad antimicótica se reducirá drásticamente. La pared celular de los hongos es una estructura única y sus componentes son glicoproteínas y polisacáridos, principalmente glucano y quitina. Estas estructuras están fuertemente reticuladas para formar un ensamblaje resistente que protegerá a la célula fúngica del estrés ambiental pero al mismo tiempo permitirá que la célula interactúe con su entorno. Los grupos fosfato, ubicados en las cadenas laterales de carbohidratos de las proteínas de la pared celular altamente glicosiladas, dan la carga negativa en la superficie de la célula fúngica (Tronchin y col., 2008). Los estudios han demostrado la presencia de ácido siálico en la superficie de las paredes celulares de *Candida albicans* (Matica y col., 2019). Soares y col. (2000) demostraron que los ácidos siálicos contribuían a la carga eléctrica negativa de la superficie celular al facilitar la adherencia de las células fúngicas a un sustrato catiónico (poli-L-lisina). El mecanismo por el cual el quitosano inhibe el crecimiento de hongos aún no se comprende completamente, pero algunas teorías propuestas se describen a continuación y se representan en la Figura 6.4x: (a) El quitosano es un polímero catiónico que interactuará

Capítulo 6: Propiedades antimicrobianas de las matrices activas

con la superficie celular cargada negativamente (debido a la presencia de ácido siálico) y puede desestabilizar la carga eléctrica de la pared celular; (b) Una vez que se reduce la carga negativa, la concentración de cationes en la superficie también se ve afectada (principalmente K^+), y la diferencia entre la concentración interna y externa conduce a la salida de cationes; (c) Este flujo de cationes provocará además la hiperpolarización de la membrana plasmática, provocando por tanto un aumento de la captación de Ca^{2+} y la pérdida de moléculas cargadas negativamente (nucleótidos, fosfatos, sustratos para la reacción enzimática), afectando el metabolismo de la célula y alterando importantes vías metabólicas (Peña y col., 2013).

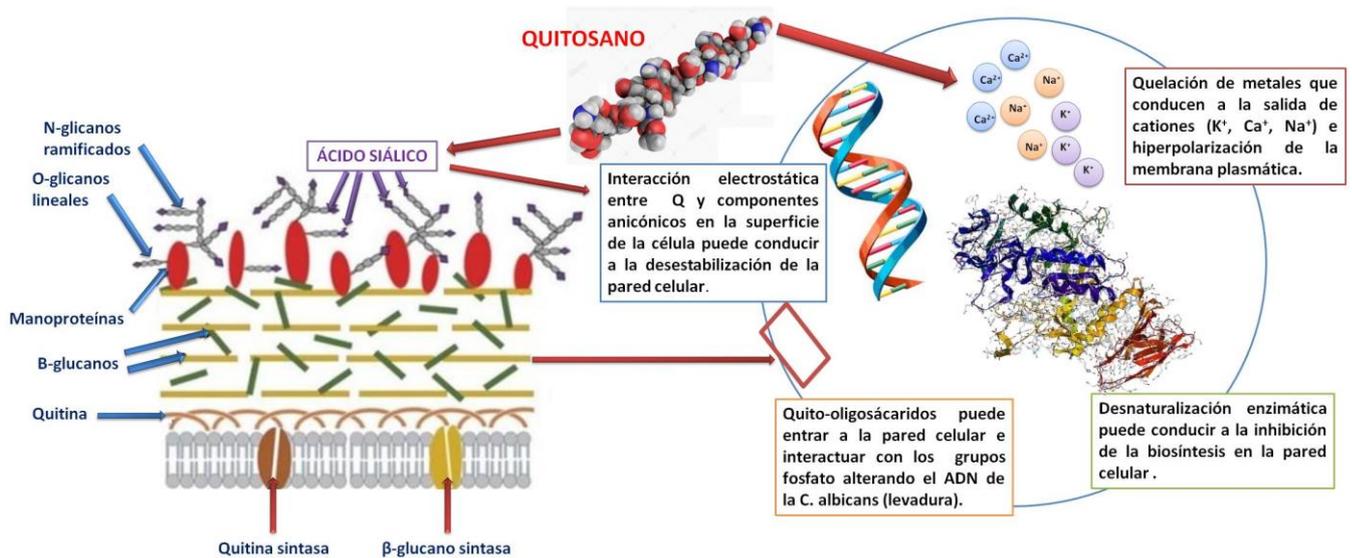


Figura 6.27. Representación esquemática del modo de acción del Q en una célula de *Candida albicans* o levadura. Adaptado de Matica y col. (2019).

Además, el quitosano puede formar una película densa en la superficie celular, que puede interferir con el crecimiento de hongos y activar varios mecanismos de defensa como la acumulación de quitinasa, la síntesis de callos y la síntesis y lignificación del inhibidor de proteínasa (Matica y col., 2019).

6.4.6 Espectroscopía infrarroja aplicada al estudio de sistemas biológicos

La espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) aplicada a materiales biológicos proporciona un reflejo de la composición química y estructural de los mismos. Los espectros de absorción de los materiales biológicos complejos están representados por bandas constituidas por una superposición de picos originados por la absorción de sus constituyentes (proteínas, carbohidratos, lípidos y otros compuestos de bajo peso molecular), representando *huellas digitales* altamente específicas de los mismos (Naumann, 2000). La técnica FTIR ha sido empleada a nivel mundial en el análisis de fluidos humanos (sangre, suero, orina, líquido sinovial, líquido amniótico, etc.), bacterias, hongos, virus, células individuales, tejidos, secciones de tejidos, lo que ha permitido el diagnóstico de diversas enfermedades infecciosas, procesos oncológicos y odontología (Naumann, 2000, 2008).

En el caso del estudio de microorganismos los espectros FTIR revelan una imagen de la composición química de la pared celular, membranas plasmáticas, citoplasma, biopolímeros y moléculas pequeñas intracelulares. Estos constituyen entonces, una representación del fenotipo, el cual resulta altamente específico y reproducible bajo las mismas condiciones de operación. Para facilitar la interpretación de los espectros de materiales biológicos complejos se puede hacer una división de los mismos en lo que se denominan ventanas espectrales (W_i). La Figura 6.28 muestra un espectro típico de una suspensión microbiana formando un film sobre una celda ATR en el cual se indican las ventanas espectrales y las correspondientes asignaciones a macromoléculas y grupos funcionales más importantes. Se indican las seis ventanas espectrales (W_1 a W_6) en las que es posible dividir un espectro IR para facilitar su análisis. Los grupos funcionales y las principales macromoléculas que es posible identificar en cada una de las ventanas espectrales son: **W_1** .- región entre 3500 y 3000 cm^{-1} . Está dominada principalmente por una banda muy ancha debida al grupo O-H (3300 cm^{-1}) y a la absorción de dos modos vibracionales del estiramiento de N-H.

W_2 .- región 3000 a 2800 cm^{-1} . Exhibe las vibraciones correspondientes a los estiramientos y balanceos de C-H en los grupos funcionales CH_3 y CH_2 . Aunque la región es atribuida a la absorción de las cadenas de ácidos grasos de membranas y a fosfolípidos, también se le puede atribuir a vibraciones de cadenas laterales de algunos

Capítulo 6: Propiedades antimicrobianas de las matrices activas

aminoácidos y carbohidratos (Maquelin y col., 2000; Naumann, 2001). **W3.-** región entre 1800 y 1500 cm^{-1} , denominada amida I y II. Se distinguen 3 bandas principales, 1745, 1650 y 1542 cm^{-1} , correspondientes a ésteres, amida I y amida II, respectivamente. La banda amida I (1700-1600 cm^{-1}) corresponde al estiramiento del grupo $>\text{C}=\text{O}$ del enlace peptídico. Esta es la banda más intensa, por lo general, en los espectros de microorganismos (por ser las proteínas un componente importante en la biomasa celular). En esta ventana se observa la banda correspondiente al estiramiento del grupo $>\text{C}=\text{O}$ de ésteres ($\sim 1740 \text{ cm}^{-1}$) presente en lípidos y otras moléculas, y también aunque de mucha menor intensidad, las bandas debidas a los estiramientos de los enlaces $>\text{C}=\text{O}$, $>\text{C}=\text{N}$, $>\text{C}=\text{C}<$ presentes en las bases heterocíclicas de los ácidos nucleicos, ADN y ARN. **W4.-** región correspondiente al intervalo 1300 y 1500 cm^{-1} es la región mixta ya que involucra grupos funcionales presentes en lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos. En la región de mayor energía de esta ventana, cercana a 1450-1460 cm^{-1} se encuentran, como se mencionó previamente, los estados vibracionales de balanceo del C-H correspondientes al CH_2 y CH_3 . En 1400 cm^{-1} es posible observar una banda típica correspondiente al estiramiento simétrico del $-\text{COO}-$. Este grupo funcional puede ser indicativo de la presencia de carbohidratos ácidos, así como también a ácidos grasos libres, o cadenas laterales de aminoácidos. Por último en la zona de menor energía de esta ventana, cercana a 1240 cm^{-1} , se encuentra una banda ancha debido al estiramiento asimétrico del enlace $>\text{P}=\text{O}$, que constituye una superposición de bandas típicas que podrían provenir de fosfodiésteres, monoésteres y fosfatos libres. **W5.-** región espectral entre 1200 y 900 cm^{-1} , generalmente dominada por el estiramiento simétrico del grupo PO_2^- correspondiente a ácidos nucleicos (1080 cm^{-1}) y fosfolípidos y por una secuencia compleja de picos debidos principalmente a un acoplamiento de los estiramientos C-C y C-O y de las deformaciones C-O-C y C-O-H de diversos oligo y polisacáridos (Naumann, 2001). **W6.-** intervalo de frecuencias entre 900 y 750 cm^{-1} , región de la *huella digital* o *fingerprint*, exhibe una gran variedad de picos de relativa baja intensidad. Sólo se puede asignar con certeza el pico correspondiente a 720 cm^{-1} por tratarse de una frecuencia de vibración característica de los modos de vibración torsionales del $>\text{CH}_2$ de ácidos grasos.

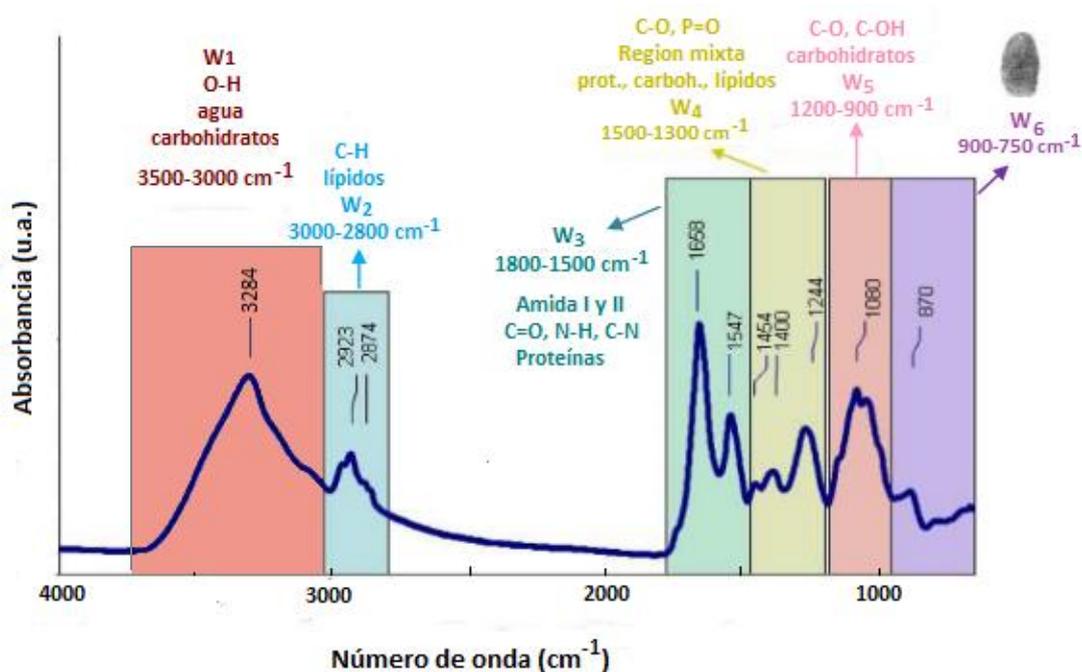


Figura 6.28. Asignación de los principales grupos funcionales y macromoléculas encontrados en espectros FTIR de microorganismos. Se indican las seis ventanas espectrales (W_1 a W_6) para facilitar su análisis.

Las Figuras 6.29-6.31 representan los espectros de las bacterias control y después de incubaciones durante 1 y 3 hs con nanocompuestos a base de quitosano funcionalizados con nanopartículas. Tanto en las muestras incubadas con la película de quitosano como con los nanocompuestos se detectaron cambios significativos en todas las ventanas espectrales (Figuras 6.29-6.31).

Se pudo observar un cambio significativo en la forma del pico correspondiente a las vibraciones del grupo OH en la región 3500-3000 cm^{-1} . Además, los picos correspondientes a las vibraciones de CH_2 y CH_3 , en general, se tornaron menos pronunciados excepto para *S. epidermidis* y *Salmonella* tratadas con QAg. Otros cambios se produjeron en las regiones correspondientes a la amida I, amida II y amida III y finalmente también una modificación significativa en la forma del pico a 1080 cm^{-1} correspondiente a las vibraciones PO_2 . Todos los cambios fueron más marcados en el caso de las bacterias Gram-negativas, *E. coli* y *Salmonella*, después de 3 h de tratamiento con Q o QCu.

Capítulo 6: Propiedades antimicrobianas de las matrices activas

Similares resultados fueron informados por [Leung y col. \(2016\)](#) analizando la toxicidad de nanopartículas de ZnO y TiO₂ sobre células de *E. coli*.

Por otra parte, en el caso de *Candida albicans* los cambios fueron menos marcados en presencia de la película Q en consonancia con los resultados obtenidos para la CMI.

Varios mecanismos antimicrobianos posibles han sido detectadas mediante FTIR: (1) las nanopartículas pueden cambiar la fluidez de los lípidos de la pared celular por la unión con grupos de la membrana ([Fang y col., 2007](#); [Hu y col., 2007](#); [Nadtochenko y col., 2005](#)) medida a 3000-2800 cm⁻¹; (2) la unión de nanopartículas, o iones liberados de las nanopartículas con aminoácidos de proteínas y enzimas ([Eckhardt y col., 2013](#)) que modifica las estructuras proteicas detectables a 1800-1500 cm⁻¹ ([Burgula y col., 2006](#)); (3) nanopartículas unidas a grupos fosfato de ácidos nucleicos del ADN o ARN alterando sus estructuras, que se detectan en el rango 1200-600 cm⁻¹ ([Alvarez-Ordóñez y col., 2010](#); [Eckhardt y col., 2013](#); [Jiang y col., 2010](#)); y (4) mecanismos de oxidación catalizada por nanopartículas y generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) ([Eckhardt y col., 2013](#)), que pueden causar alteraciones en las estructuras de polisacáridos medidas en el rango 1200-900 cm⁻¹ ([Jiang y col., 2010](#)).

[Hu y col. \(2007\)](#) informaron de que la principal alteración en la región de los ácidos grasos incluyó la reducción en la intensidad de los picos de las bandas a 2872 y 2852 cm⁻¹ en bacterias expuestas a nanopartículas Ag/TiO₂ durante 6 h. Además, [Fang y col. \(2012\)](#) observaron cambios similares después de la exposición de *E. coli* a diferentes tamaños de nanopartículas de punto cuántico de telurio de cadmio.

Incubación de microorganismos con películas Q

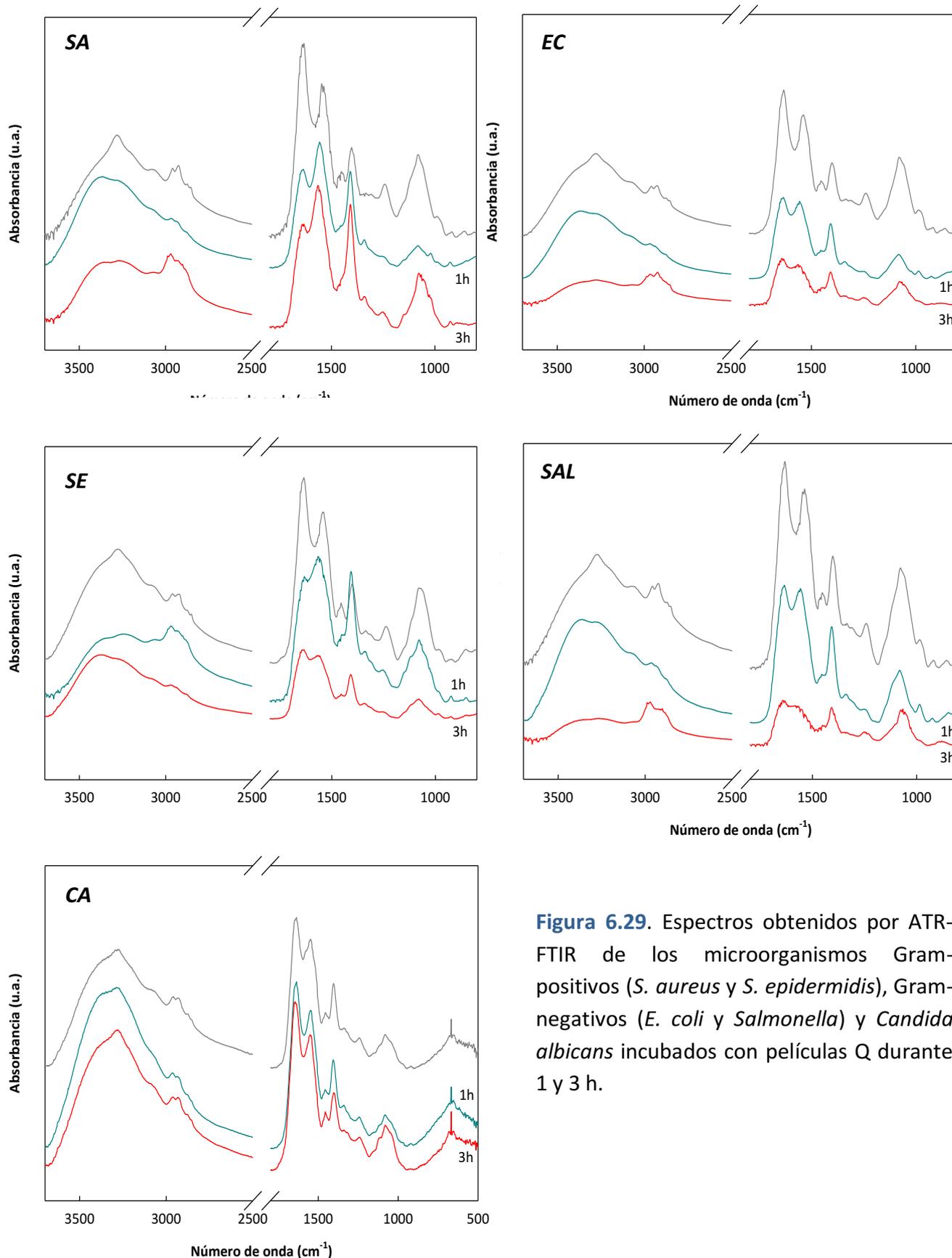


Figura 6.29. Espectros obtenidos por ATR-FTIR de los microorganismos Gram-positivos (*S. aureus* y *S. epidermidis*), Gram-negativos (*E. coli* y *Salmonella*) y *Candida albicans* incubados con películas Q durante 1 y 3 h.

Incubación de microorganismos con nanocompuestos QAg

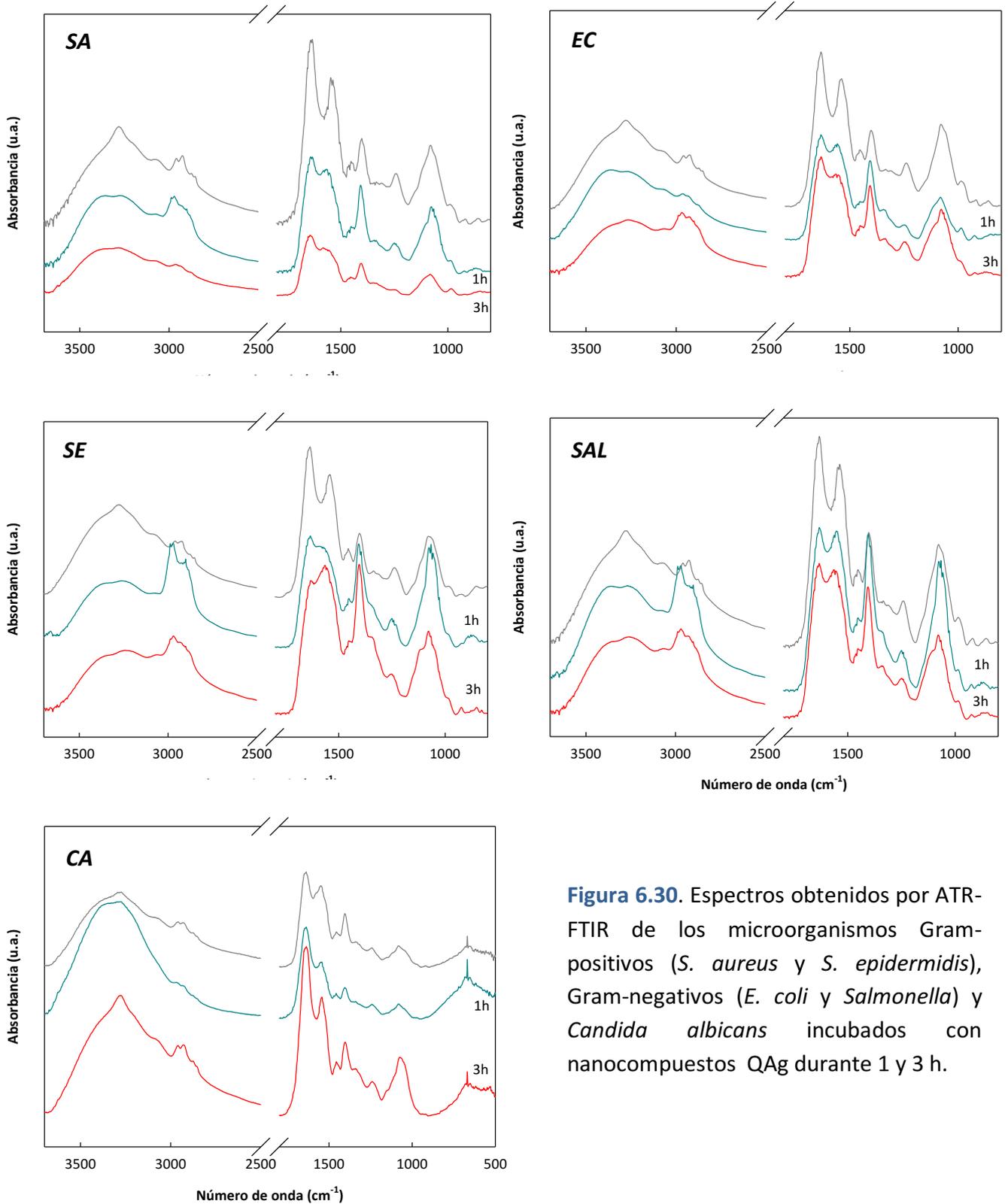


Figura 6.30. Espectros obtenidos por ATR-FTIR de los microorganismos Gram-positivos (*S. aureus* y *S. epidermidis*), Gram-negativos (*E. coli* y *Salmonella*) y *Candida albicans* incubados con nanocompuestos QAg durante 1 y 3 h.

Incubación de microorganismos con películas QCu

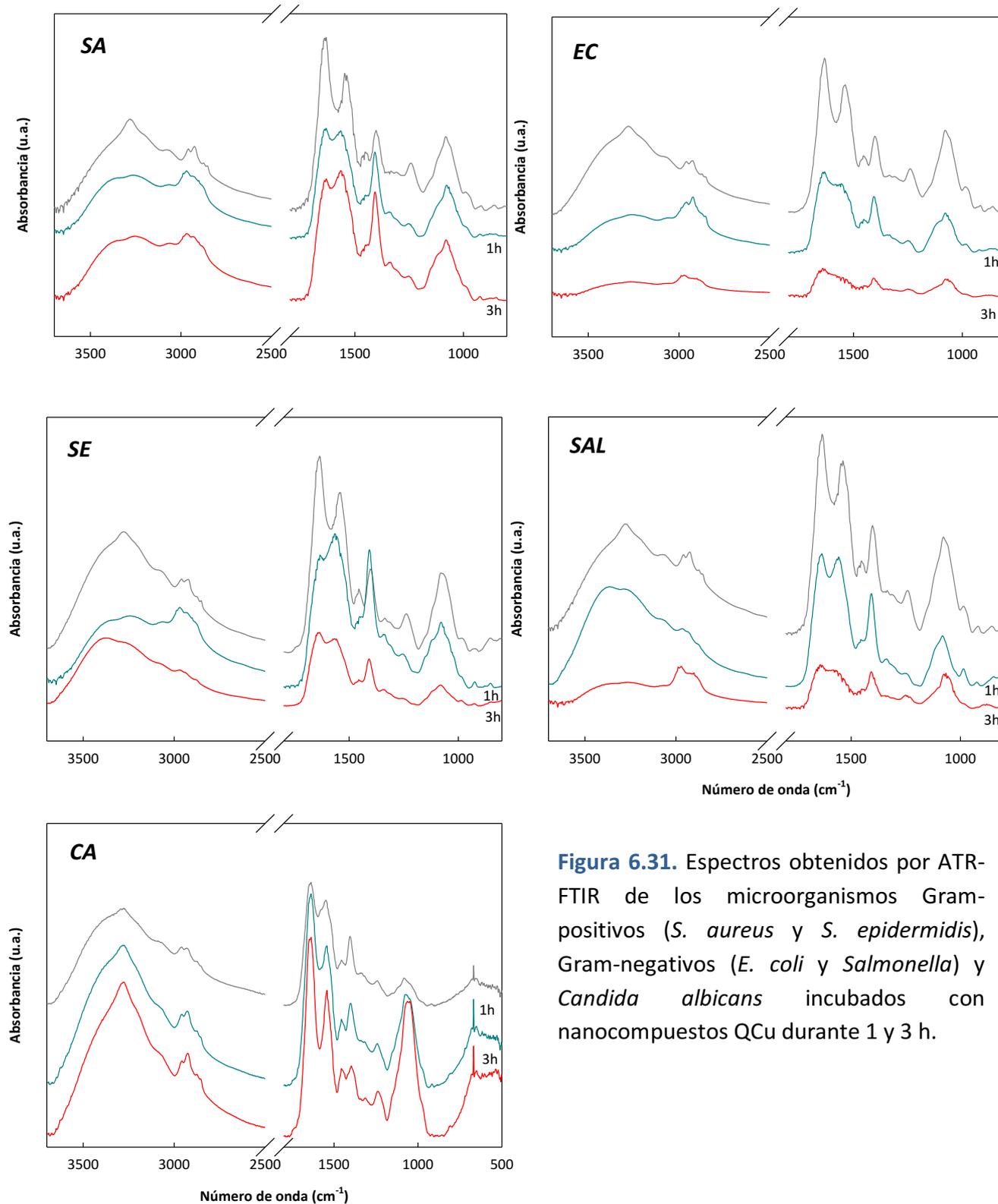


Figura 6.31. Espectros obtenidos por ATR-FTIR de los microorganismos Gram-positivos (*S. aureus* y *S. epidermidis*), Gram-negativos (*E. coli* y *Salmonella*) y *Candida albicans* incubados con nanocompuestos QCu durante 1 y 3 h.

6.4.7 Observación de suspensiones de bacterias por TEM y SEM

La [Figura 6.32](#) muestra las suspensiones de las bacterias control observadas por TEM mientras que las [Figuras 6.33-6.40](#) exhiben las micrografías de suspensiones de microorganismos incubados con nanocompuestos funcionalizados con NpAg, NpCu y NpTiO₂.

Las micrografías TEM de *E. coli* control exhibieron una forma de célula normal y delgada con estructura intacta y alta densidad de electrones sobre la cubierta exterior ([Feng y col., 2000](#)) ([Figura 6.32](#)). Después de 1 h de incubación se observó una pérdida grave de la integridad estructural ([Figura 6.33](#)). En las regiones polares de las células se produjo la degradación de la pared apical y el espacio periplasmático pareció ensancharse con desconexión de la membrana externa y de la membrana interna. Asimismo, se formaron múltiples ampollas o burbujas con fuga citosólica principalmente en los polos.

Después de la exposición por tiempos más prolongados (3 y 6 h) las bacterias *E. coli* se observaron colapsadas o se detectaron desechos debido a la lisis celular no solo en las regiones polares, indicando que los daños de la membrana celular fueron irreversibles y fatales ([Figura 6.33](#)). La proliferación celular también fue totalmente inhibida debido a este daño celular.

Un comportamiento similar se observó en el caso de la *Salmonella* spp. ([Figura 6.34](#)). Los resultados obtenidos estuvieron en concordancia con los informados por diversos autores ([Cárdenas y col. 2009](#); [Díaz-Visurraga y col., 2010](#); [Sawosz y col., 2011](#)).

Por otro lado, las células *S. aureus* y *S. epidermidis* control mantuvieron su forma cocoide y la estructura en forma de uva, con un citoplasma denso y regularmente distribuido sin ningún daño estructural ([Feng y col., 2000](#)). La [Figura 6.32](#) muestra una cadena corta de células con un diámetro constante.

Después de la exposición a los nanocompuestos durante 1 h, la pared celular de *S. aureus* y *S. epidermidis* expuso daños severos, como se puede ver en las [Figuras 6.33 y 6.34](#) indicando una pérdida de integridad y derrame de parte del contenido citoplasmático. Algunas células no colapsaron pero exhibieron regiones de baja densidad indicando la desorganización inicial de la pared celular.

Capítulo 6: Propiedades antimicrobianas de las matrices activas

A mayores tiempos de tratamiento, las células fueron completamente lisadas, con pérdida total del contenido citoplasmático, probablemente debido a paredes y membranas celulares dañadas. Otras células aparecieron deformadas y fragmentadas.

Además, también se observaron partículas o precipitados electrón-densos alrededor de las células bacterianas dañadas. La incubación por 3 h enfatizó la misma tendencia. Después de 6 h de tratamiento sólo se encontró material citoplasmático disperso y células tipo sombras. [Díaz-Visurraga y col. \(2010\)](#) informaron resultados similares trabajando con películas nanocompuestas a base de quitosano. Los mecanismos para el comportamiento antimicrobiano de los nanocompuestos se explicaron por la adsorción de bacterias en la superficie del polímero. El agua difunde a través de la matriz del polímero lo que conduce a la liberación de iones metálicos que causan la destrucción de la membrana bacteriana.

En consonancia con [Li y col. \(2007\)](#) y [Liu y col. \(2004\)](#), la membrana de las bacterias serían el objetivo/ diana del quitosano y por lo tanto la inactivación del microorganismo sería el resultado de la interrupción o penetración de la membrana.

En el caso de las bacterias Gram-negativas, la interacción electrostática del quitosano y las partes aniónicas del lipopolisacárido ([Helander y col., 2001](#); [H. Liu y col., 2004](#)) provoca una desorganización de la membrana externa. Estudios recientes mostraron que el quitosano perturba la membrana interna ([Chung y Chen, 2008](#); [H. Liu y col., 2004](#); [Mansilla y col., 2013](#)), lo que provoca fugas de material intracelular ([Mansilla y col., 2013](#); [Perinelli y col., 2018](#); [Raafat y Sahl, 2009](#)). Además, se ha observado que el quitosano puede atravesar la membrana celular de las bacterias Gram-negativas ([Fei y col., 2001](#); [Mansilla y col., 2013](#); [Park y col., 2011](#)). Esto indica que es posible que el quitosano interfiera con la síntesis de ADN / ARN y desencadene respuestas intracelulares (([Galván Márquez y col., 2013](#); [Park y col., 2011](#); [Verlee y col., 2017](#)). Sin embargo, antes de que pueda desencadenar estas respuestas intracelulares particulares, tiene que penetrar la membrana plasmática, que depende en gran medida del tipo de microorganismo y del peso molecular.

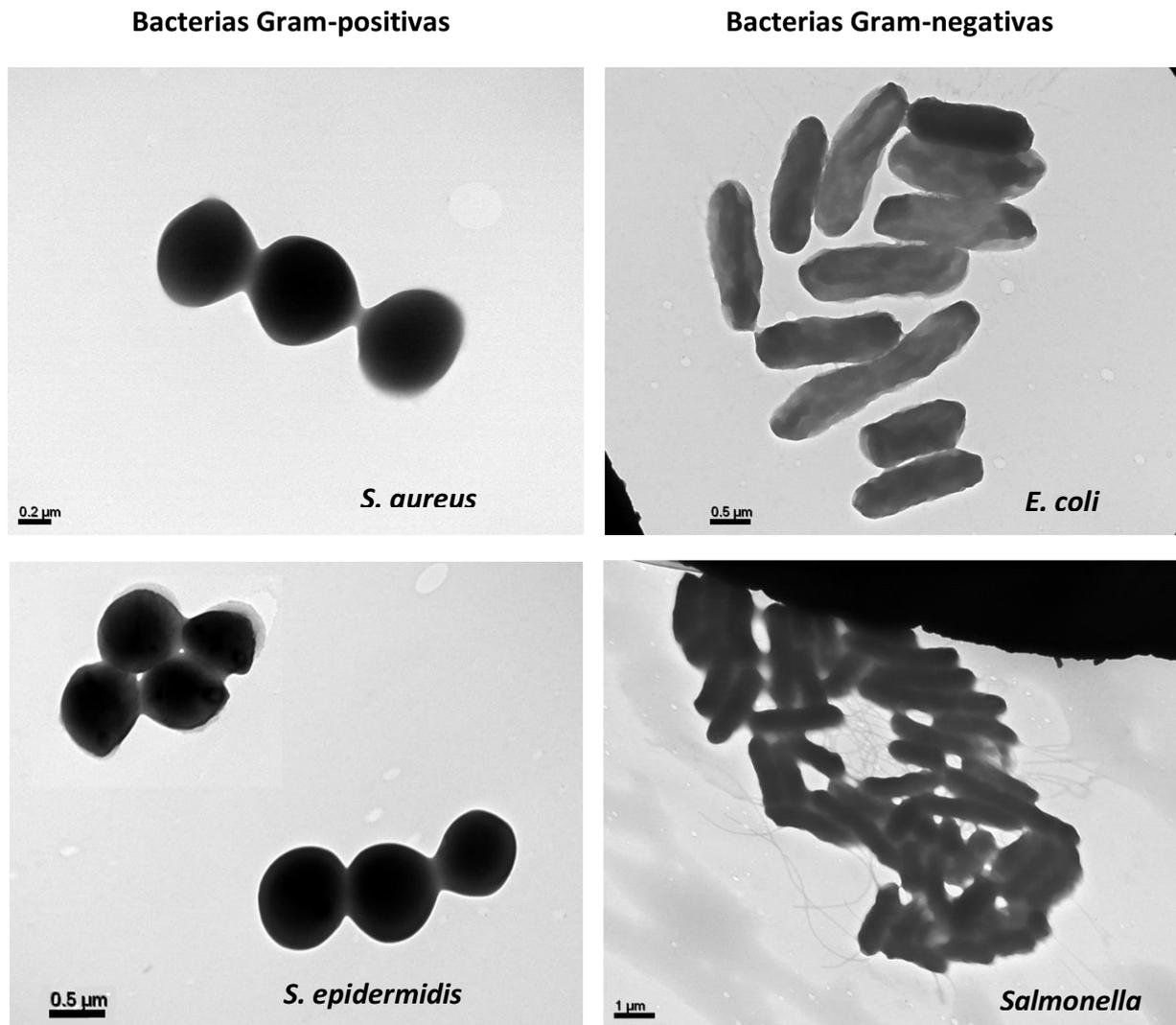


Figura 6.32. Micrografías obtenidas por TEM de suspensiones de bacterias control Gram-positivas (*S. aureus* y *S. epidermidis*) y Gram-negativas (*Salmonella* y *E. coli*). El aumento se muestra en cada micrografía.

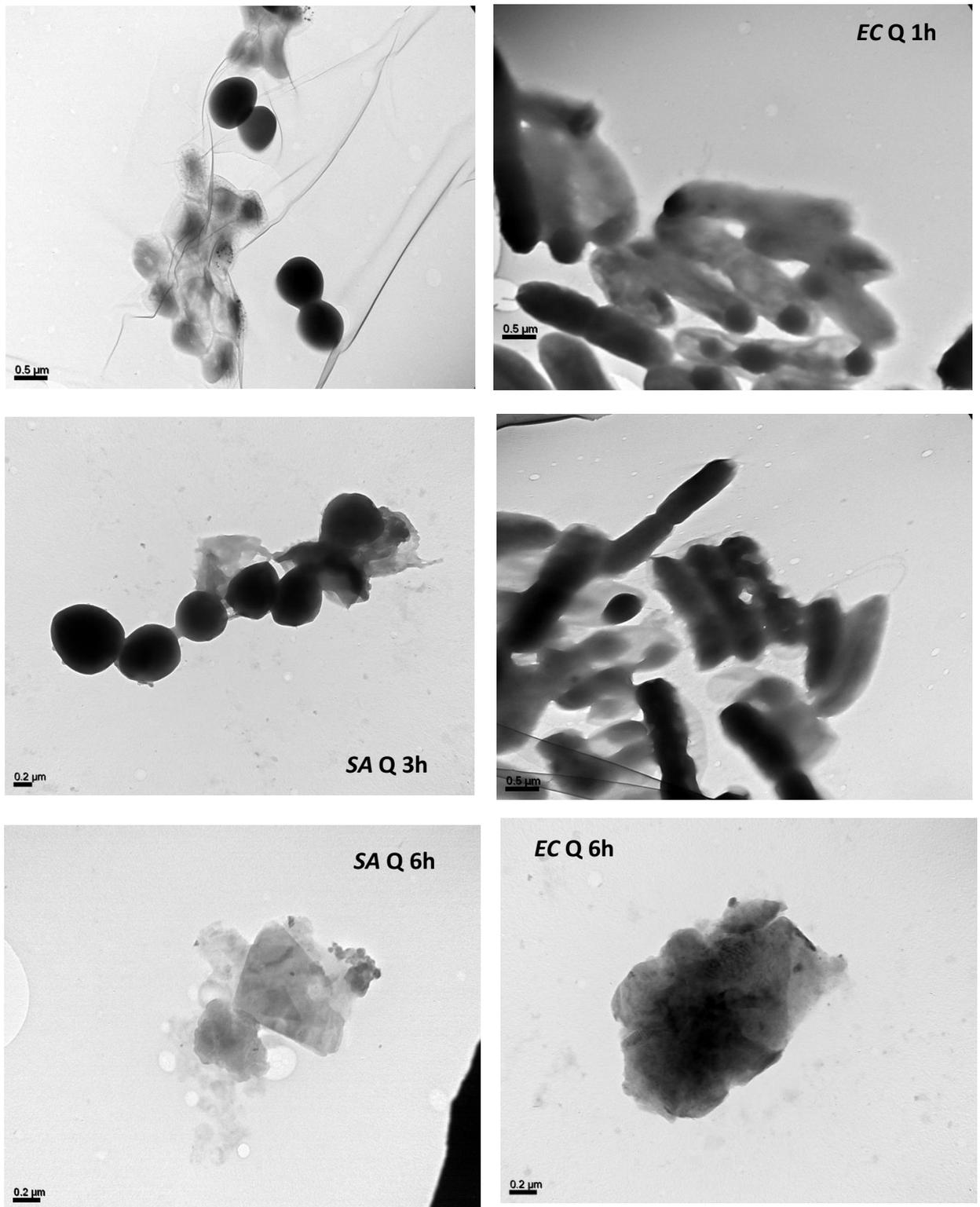


Figura 6.33. Micrografías obtenidas por TEM de suspensiones de *Staphylococcus aureus* (SA) y *Escherichia coli* (EC) incubadas en presencia de películas de quitosano durante 1, 3 y 6 h. El aumento se muestra en cada micrografía.

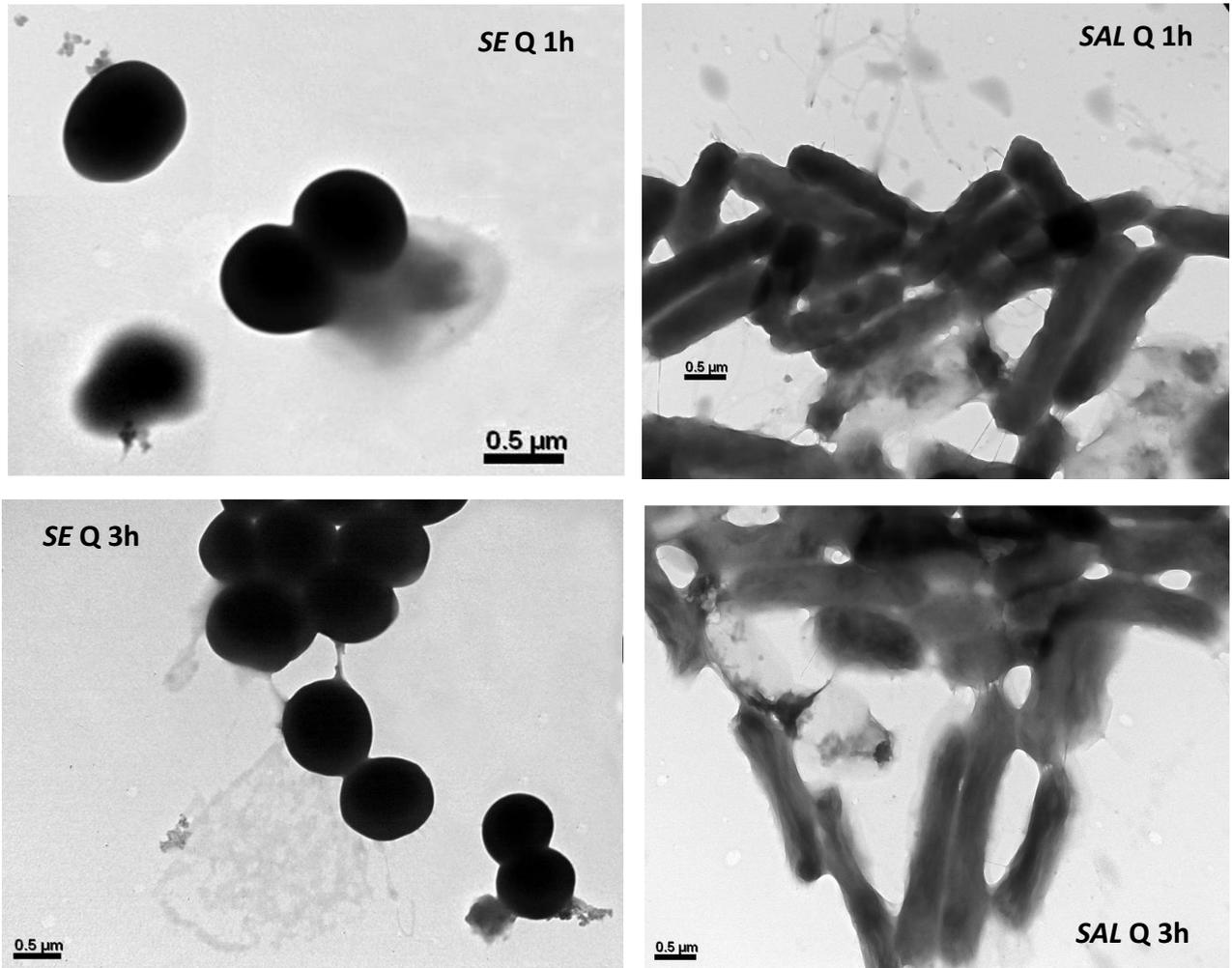


Figura 6.34. Micrografías obtenidas por TEM de suspensiones de *Staphylococcus epidermidis* (SE) y *Salmonella* (SAL) incubadas en presencia de películas de quitosano durante 1 y 3 h. El aumento se muestra en cada micrografía.

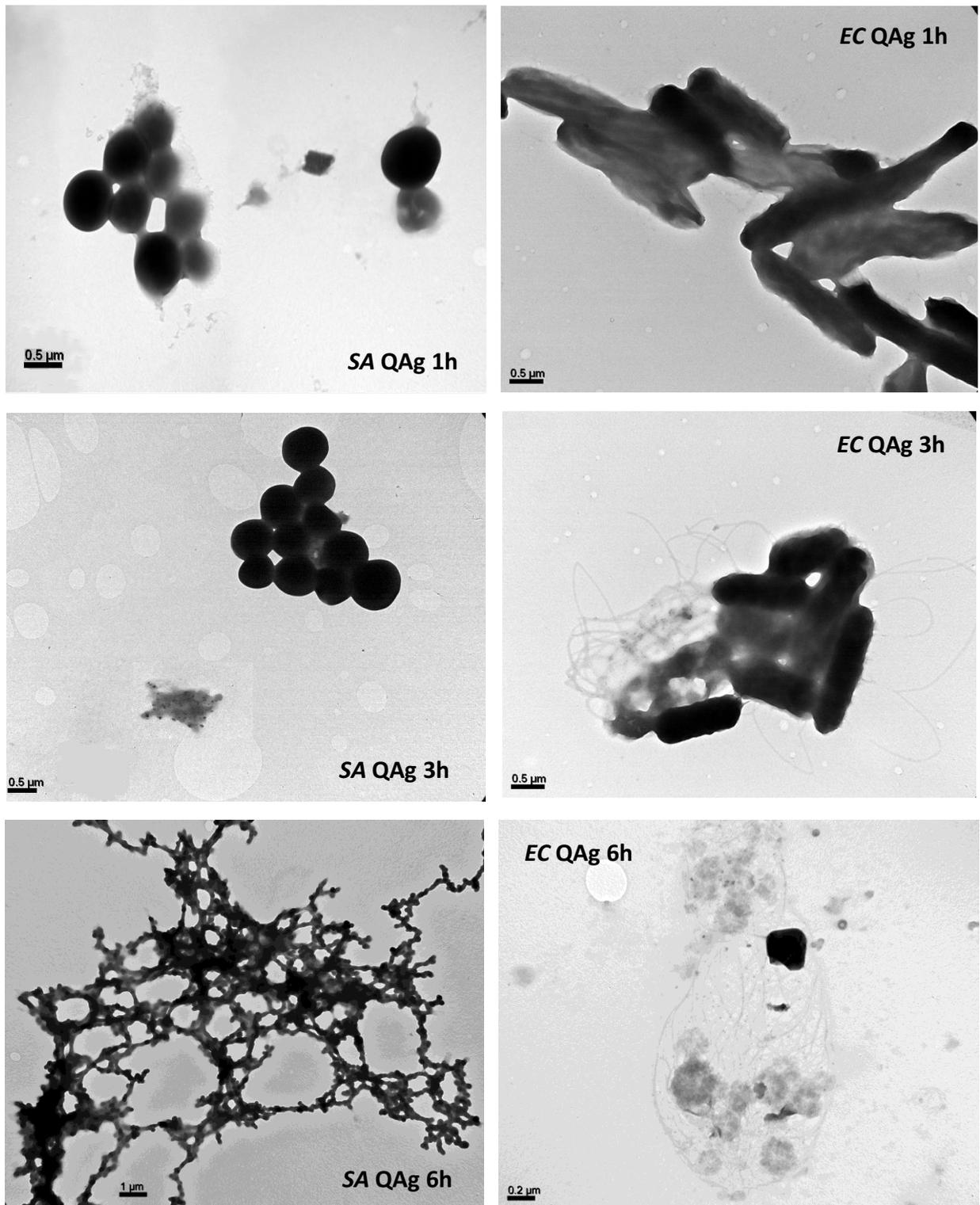


Figura 6.35. Micrografías obtenidas por TEM de suspensiones de *Staphylococcus aureus* (SA) y *Escherichia coli* (EC) incubadas en presencia de nanocompuestos QAg de durante 1, 3 y 6 h. El aumento se muestra en cada micrografía.

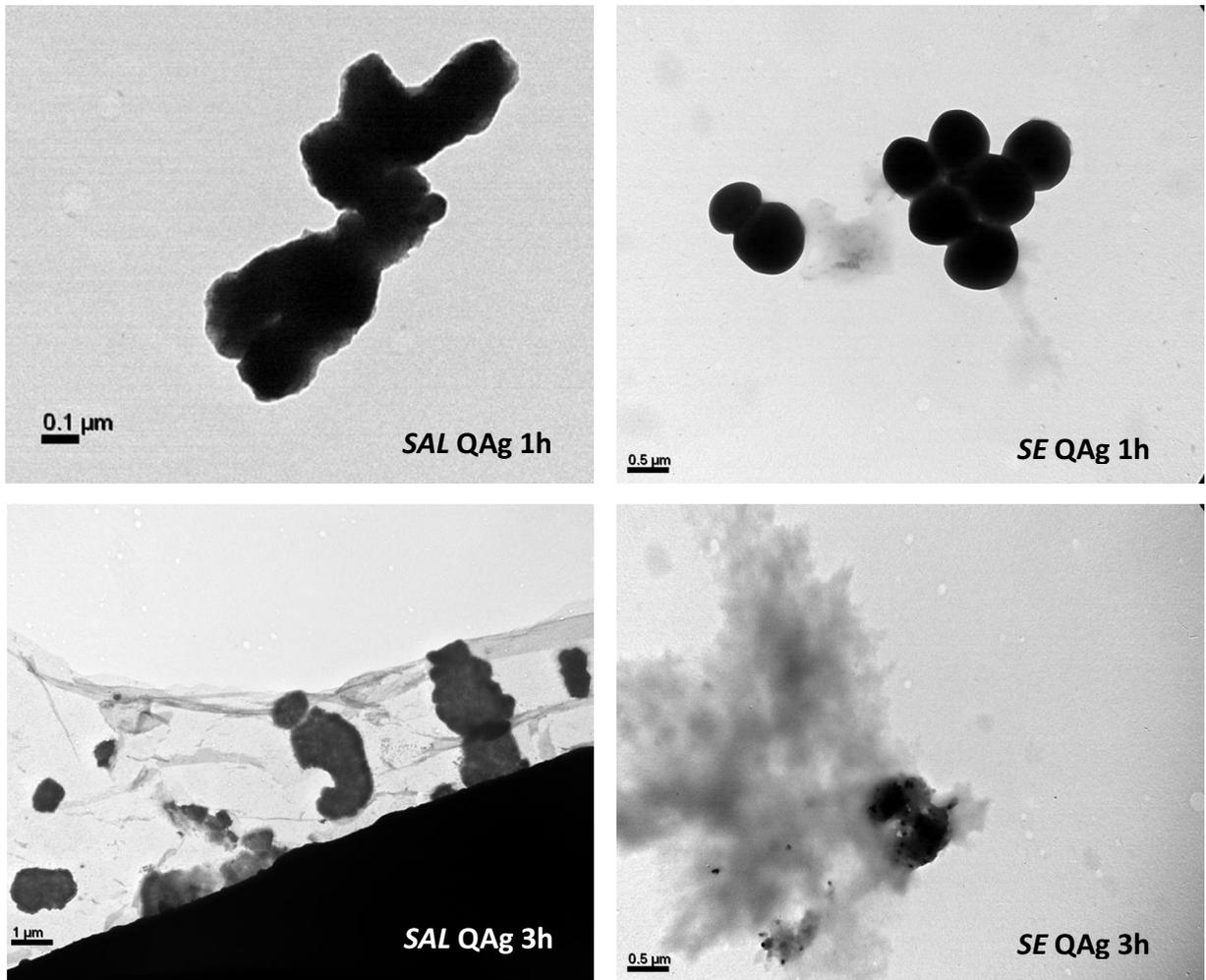


Figura 6.36. Micrografías obtenidas por TEM de suspensiones de *Staphylococcus epidermidis* (SE) y *Salmonella* (SAL) incubadas en presencia de nanocompuestos QAg durante 1 y 3 h. El aumento se muestra en cada micrografía.

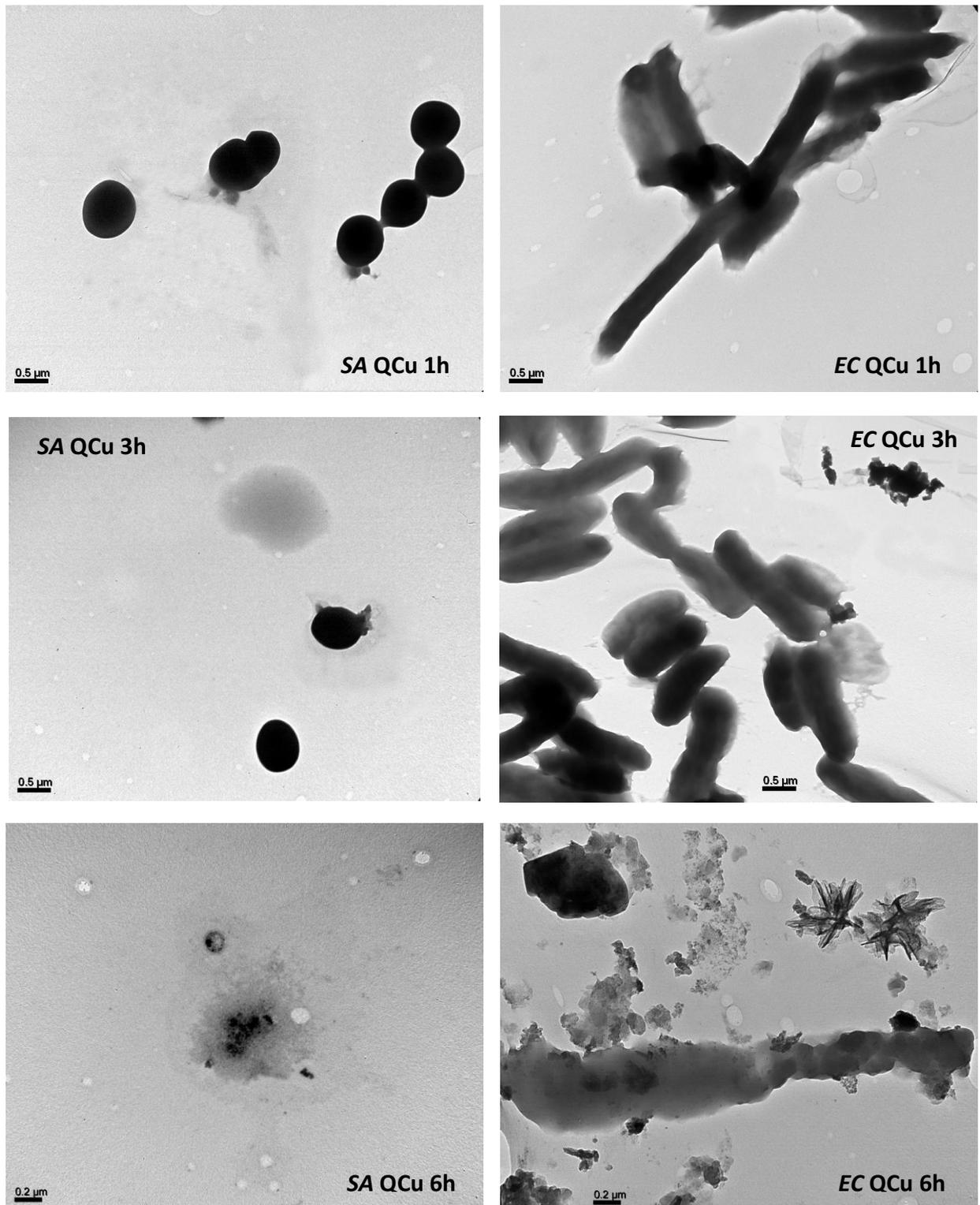


Figura 6.37. Micrografías obtenidas por TEM de suspensiones de *Staphylococcus aureus* (SA) y *Escherichia coli* (EC) incubadas en presencia de nanocompuestos QCu de durante 1, 3 y 6 h. El aumento se muestra en cada micrografía.

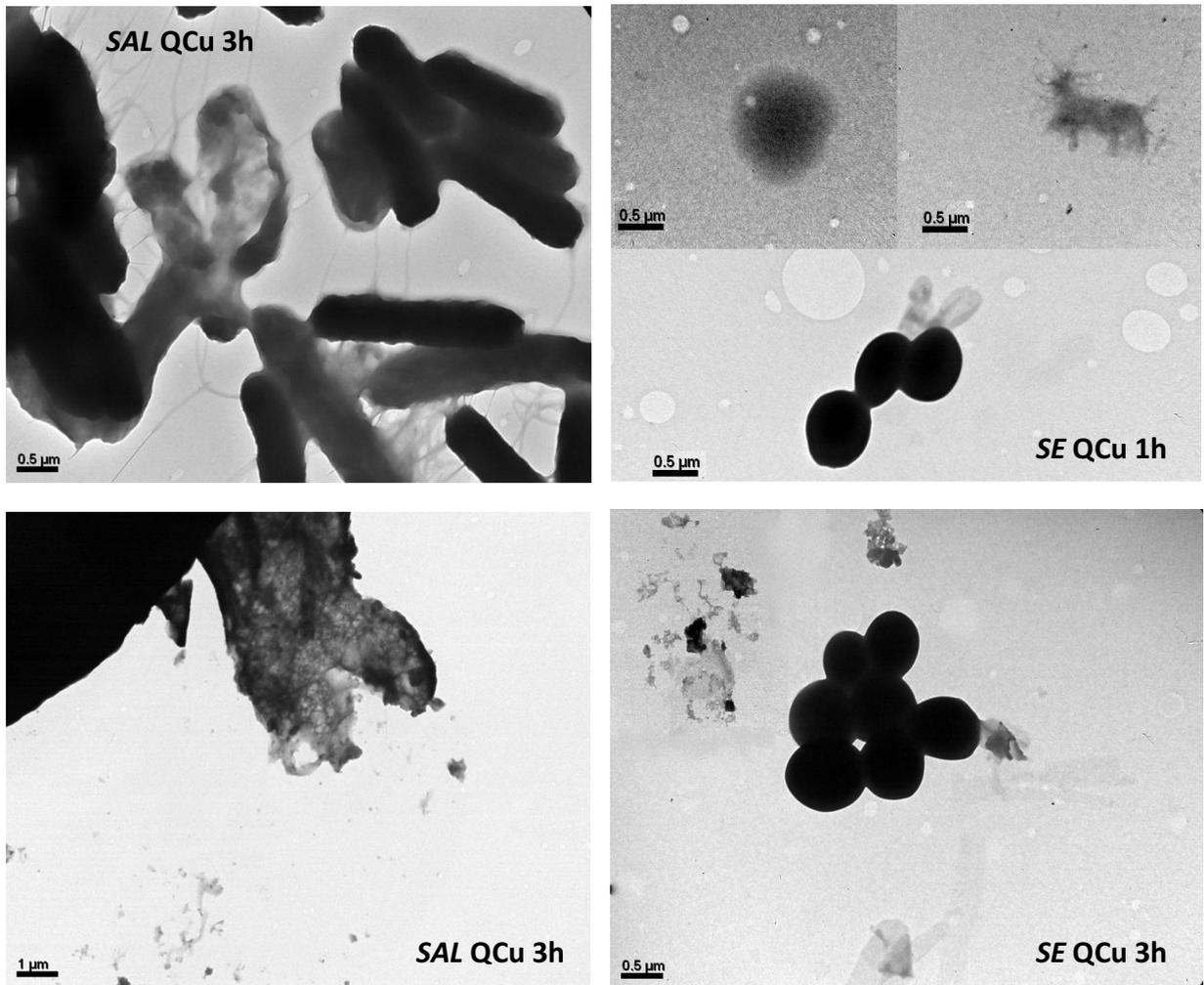


Figura 6.38. Micrografías obtenidas por TEM de suspensiones de *Staphylococcus epidermidis* (SE) y *Salmonella* (SAL) incubadas en presencia de nanocompuestos QCu durante 1 y 3 h. El aumento se muestra en cada micrografía.

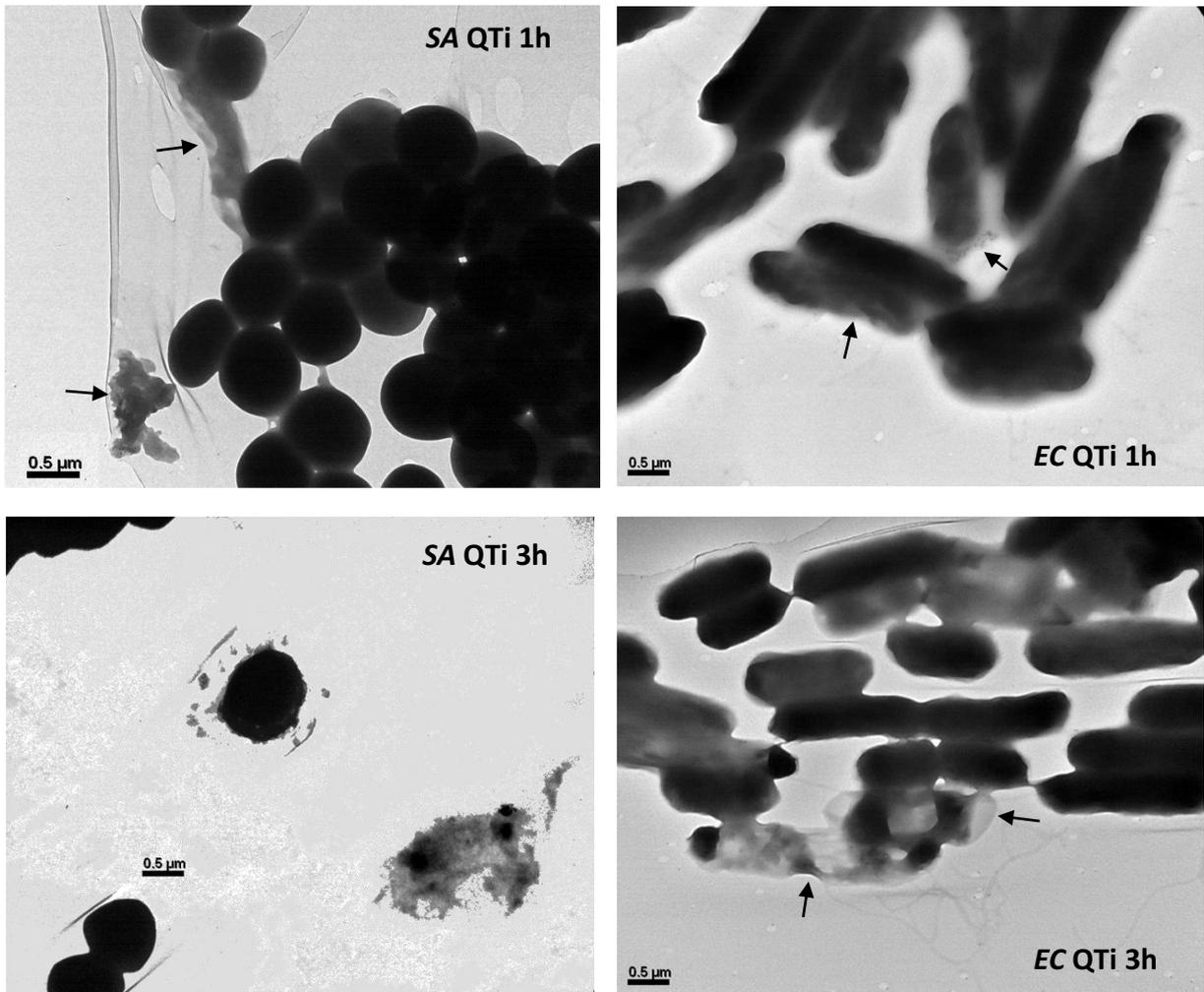


Figura 6.39. Micrografías obtenidas por TEM de suspensiones de *Staphylococcus aureus* (SA) y *Escherichia coli* (EC) incubadas en presencia de nanocompuestos QTi durante 1 y 3 h. El aumento se muestra en cada micrografía.

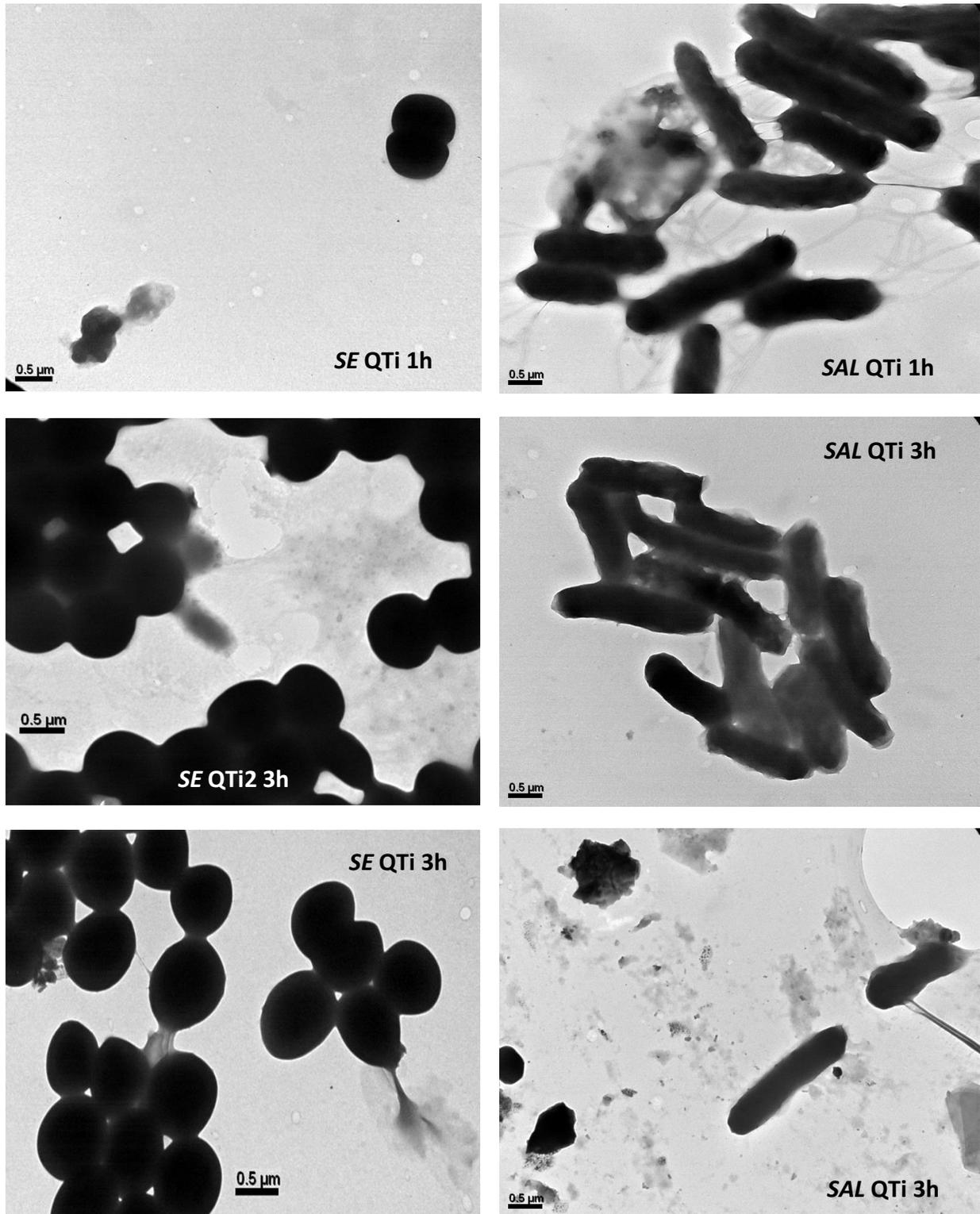


Figura 6.40. Micrografías obtenidas por TEM de suspensiones de *Staphylococcus epidermidis* (SE) y *Salmonella* (SAL) incubadas en presencia de nanopartículas QT1 durante 1 y 3 h. El aumento se muestra en cada micrografía.

Capítulo 6: Propiedades antimicrobianas de las matrices activas

El mecanismo de interacción se podría resumir en las siguientes etapas:

- Las películas de Q y los nanocompuestos podrían interactuar con la membrana celular de las bacterias cargadas negativamente por atracción electrostática, causando un incremento de la permeabilidad de la membrana y luego ruptura y pérdida de los componentes intracelulares
- La alteración de la membrana celular bacteriana sería el otro modo probable de acción de nanopartículas, que allanaría el camino hacia las células bacterianas provocando daños en las membranas proteicas y en las bicapas lipídicas, como se ha informado en estudios anteriores
- La fuga de material intracelular debido al daño de la membrana celular puede causar contracción de la misma, lo que en última instancia conducirá a la lisis celular como se justifica por las micrografías obtenidas por SEM y TEM.

La [Figura 6.41](#) y [6.42](#) muestra las micrografías obtenidas por SEM de *E. coli* y *S. aureus* control y expuestos a una suspensión de quitosano y de nanopartículas de TiO₂. Las partículas se unen a las células bacterianas, lo que resulta necesario para la acción bactericida, de acuerdo con la literatura ([Angel y col., 2015](#); [Lin y col., 2014](#))

Asimismo, *Candida albicans* se observó por SEM después de su incubación en presencia de películas Q y nanocompuestos QCu, QAg y QT_i ([Figura 6.43](#)).

La matriz de quitosano rodea la superficie de *E. coli* o *S. aureus* cargadas negativamente ([Figuras 6.41](#) y [6.42](#)), degrada y desfragmenta las células. Por otro lado, se ha demostrado que el quitosano es más eficaz contra las bacterias Gram negativas que las bacterias Gram positivas; sin embargo, el quitosano en la superficie de la célula Gram positiva puede formar una membrana polimérica que inhibe la entrada de nutrientes a la célula, provocando así la muerte celular.

Suspensiones de *E. coli* incubadas con Q o NpTiO₂ para observación por SEM

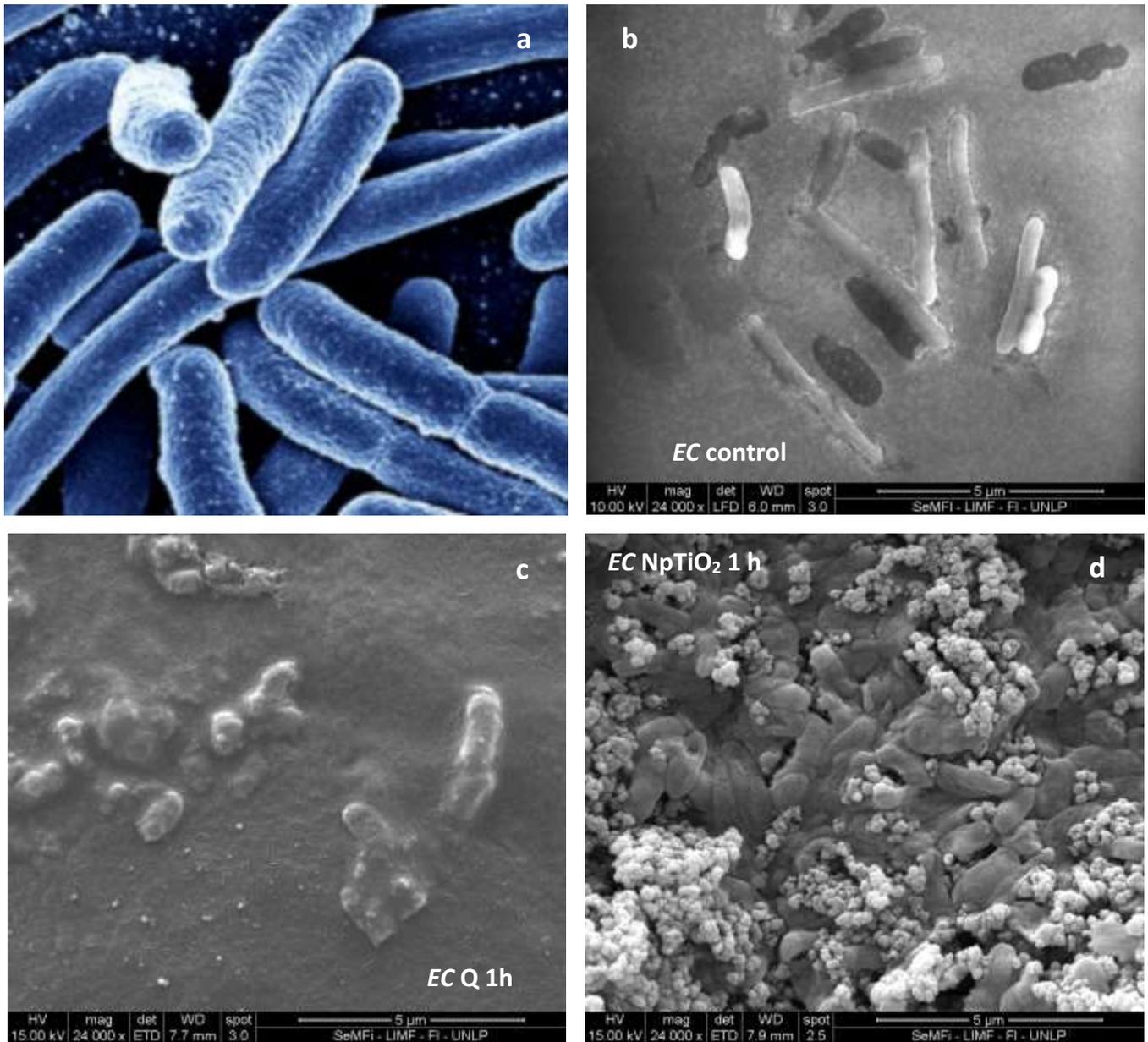


Figura 6.41. Imágenes de *E. coli* obtenidas por SEM: <https://healthtimes.com.au/hub/infection-control/33/news/aap/australias-national-superbug-alert-system-has-detected-the-new-bugs> (a), control (b) tratadas con solución de Q (c) y tratadas con NpTiO₂ (d) durante 1 h.

Suspensiones de *S. aureus* incubadas con Q o NpTiO₂ para observación por SEM

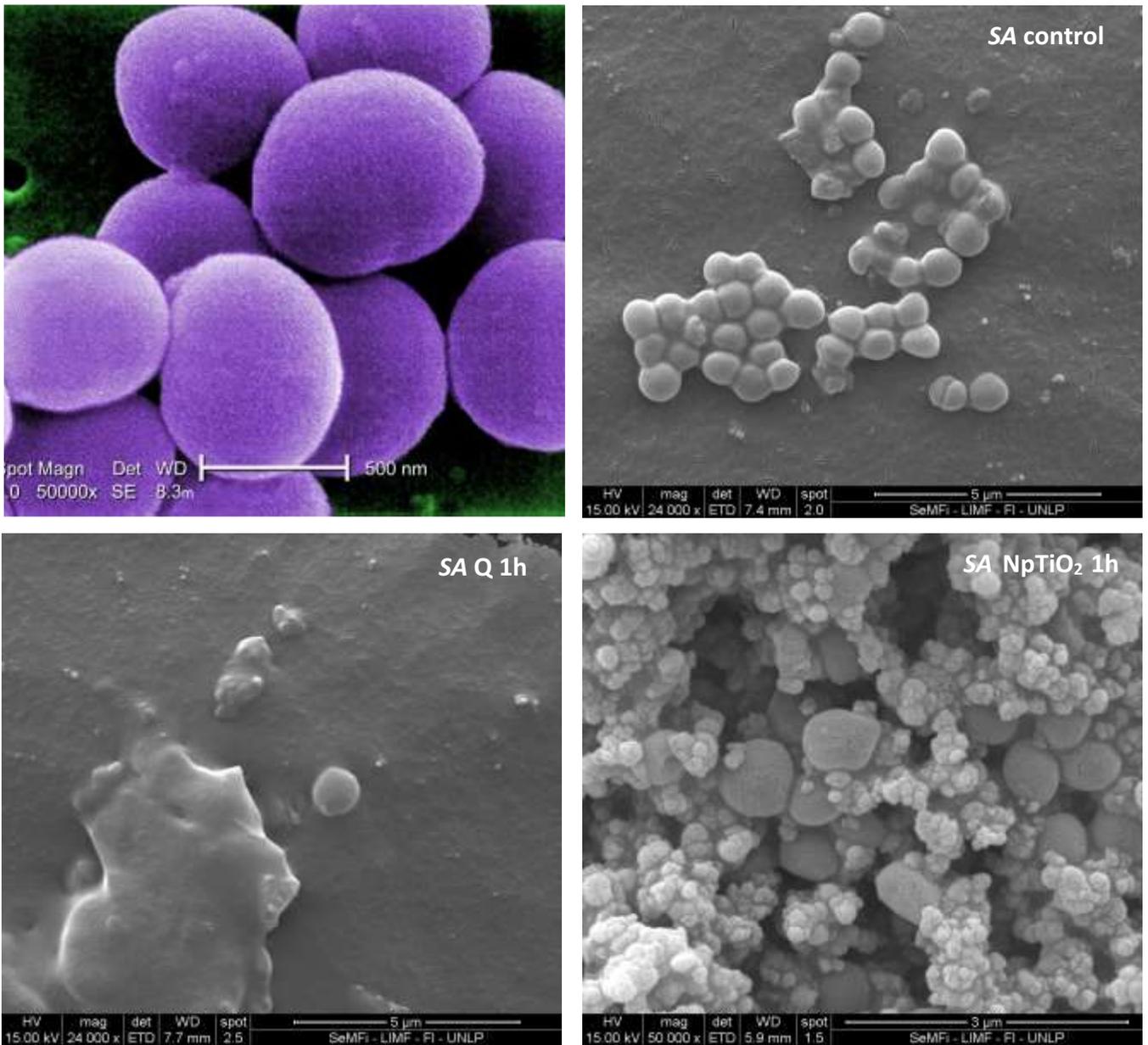


Figura 6.42. Imágenes de *S. aureus* obtenidas por SEM: (a) control, (b) tratadas con solución de Q y (c) tratadas con NpTiO₂ durante 1 h.

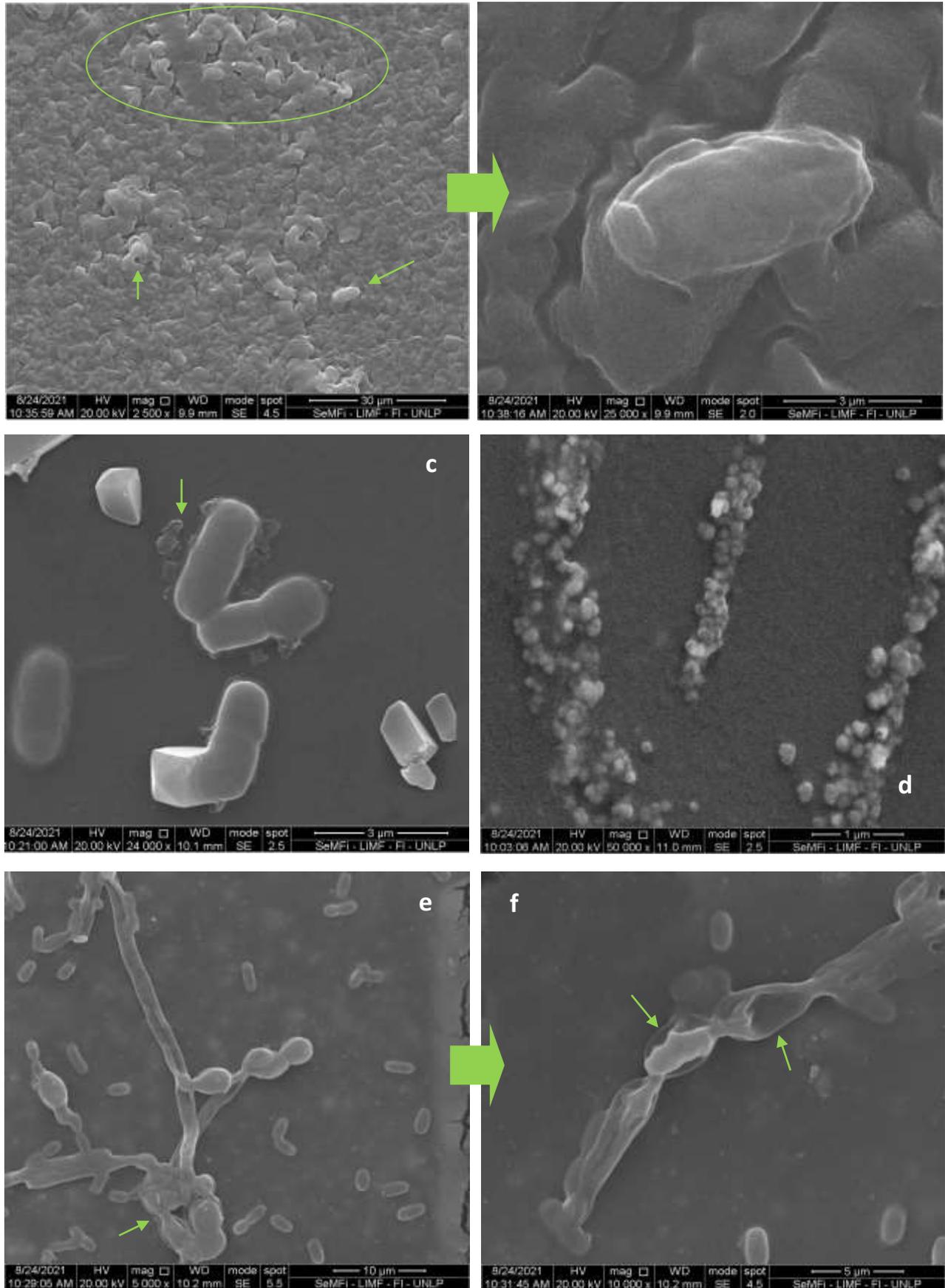


Figura 6.43. Micrografías obtenidas por SEM de *Candida albicans* incubadas en presencia de películas Q (a) y (b), nanocompuestos QCu (c), nanocompuestos QAg (d) y nanocompuestos QTi (e) y (f).

6.4.8 Cortes delgados de bacterias para observación por TEM

Para investigar las interacciones se realizó el análisis de los cultivos de bacterias usando cortes ultrafinos observados por microscopía TEM para encontrar evidencia adicional de los efectos observados.

La [Figura 6.44-6.47](#) muestra las micrografías obtenidas por TEM de *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis* y *Salmonella* control e incubadas con películas Q y matrices nanocompuestas QAg, QCu durante 3h. Las células de *E. coli* control presentaron a su alrededor nanopartículas de plata dispuestas aleatoriamente sobre la pared celular periférica para penetrar dentro de la célula bacteriana. Las células de *S. aureus* control presentaron una estructura esférica característica con densidad de electrones homogénea, pared celular regular y lisa y ligeras invaginaciones, demostrando la condición normal de división de las células. Después de la incubación con los nanocompuestos QAg y QCu, las células exhibieron alteraciones en la morfología de la pared celular con aumento de rugosidad y liberación de material intracelular. En las micrografías d y e, correspondientes a mayores aumentos de las bacterias incubadas con QCu y QAg, respectivamente, se observaron las nanopartículas distribuidas irregularmente en el interior de las células.

Similares resultados fueron informados por [Díaz-Visurraga y col. \(2010\)](#) trabajando con bacterias *S. aureus* tratadas con películas nanocompuestas de quitosanos de distintos pesos moleculares y nanopartículas de plata. Asimismo, [Cárdenas y col. \(2009\)](#) observaron alteraciones sufridas por células de *S. aureus* incubadas con nanocompuestos de quitosano y nanopartículas de cobre.

Las imágenes obtenidas mostraron que las Np estarían presentes dentro del citoplasma de *S. aureus*, asociadas a zonas de citoplasma translúcido, con separación localizada o completa de la membrana celular de la pared celular ([Figuras 6.44 y 6.47](#)).

Varios estudios han ligado la toxicidad de las nanopartículas de plata hacia las células bacterianas con la liberación de iones plata ([Smetana y col., 2008](#)). Un posible mecanismo para la disolución oxidativa de nanopartículas de plata ha sido reportado por [Choi y col. \(2008\)](#). Los autores especularon que el cambio de color observado en sus suspensiones de nanopartículas de plata sería atribuible a la oxidación de la plata en presencia de oxígeno ([Marambio-Jones y Hoek, 2010](#)).

Capítulo 6: Propiedades antimicrobianas de las matrices activas

Estudios recientes han demostrado que la mayoría de iones de plata proviene de la oxidación de la partícula metálica zero valente, típicamente por reacción con O₂ disuelto y mediada por protones y otros componentes en la fase fluida circundante (Liu y col., 2010; Wang y col., 2021). En las vías de administración iónica, la nanoplata actúa de manera análoga a un sistema de administración de fármacos, en el que la nanopartícula contiene un concentrado de una especie activa, en este caso el ión, que se transporta y se libera cerca de los sitios biológicos objetivo. Aunque la importancia del catión plata en la respuesta biológica es ampliamente reconocida, el paradigma de liberación no es bien conocido y existe un significativo potencial para mejorar las tecnologías de nanoplata a través de formulaciones de liberación controlada.

Por otra parte, de acuerdo a Raffi y col. (2010) es lógico afirmar que la unión de nanopartículas de cobre a bacterias depende de la superficie disponible para la interacción. Como las nanopartículas tienen una gran superficie, su eficacia bactericida se ve reforzada en comparación con las partículas de mayor tamaño (Stoimenov y col., 2002). El cobre tiene el potencial de interrumpir la función celular de múltiples maneras, ya que varios mecanismos que actúan simultáneamente pueden reducir la capacidad de los microorganismos para desarrollar resistencia contra el compuesto.

Los estudios sobre el mecanismo por el cual las nanopartículas son capaces de penetrar en las bacterias han sugerido que cuando *E. coli* se trata con nanopartículas de cobre, los cambios tienen lugar en la morfología de la membrana celular. Los iones Cu²⁺ pueden combinarse con la membrana plasmática por atracción electrostática y luego penetrar la membrana celular a través de la apertura o cierre de canales. Esto altera la permeabilidad de las membranas, lo que provoca fugas de iones intracelulares y metabolitos de bajo peso molecular. Los iones cobre tienen la capacidad de matar bacterias destruyendo sus paredes celulares y membranas porque tienen una fuerte capacidad de reducción, que puede extraer electrones de las bacterias, causando que su citoplasma se libere y oxidando el núcleo celular. Se sugiere que cuando las nanopartículas de cobre penetran en el interior de las bacterias, imparten daño al interactuar con compuestos que contienen fósforo y azufre, como el ácido desoxirribonucleico (ADN) porque tienen una gran afinidad para reaccionar con tales compuestos.

El mecanismo antibacteriano de nanopartículas de cobre se atribuyen al hecho de que los iones Cu²⁺ eluidos de las nanopartículas son absorbidas por las bacterias cuando la

Capítulo 6: Propiedades antimicrobianas de las matrices activas

concentración de nanopartículas es lo suficientemente alta. Las células bacterianas se inmovilizan y se inactivan por la presencia de nanopartículas de cobre en la fase de crecimiento medio, lo que dificulta su proceso de replicación, con posterior muerte celular (Hu y Xia 2006).

Corte de *E. coli* incubados con nanocompuestos observación por TEM

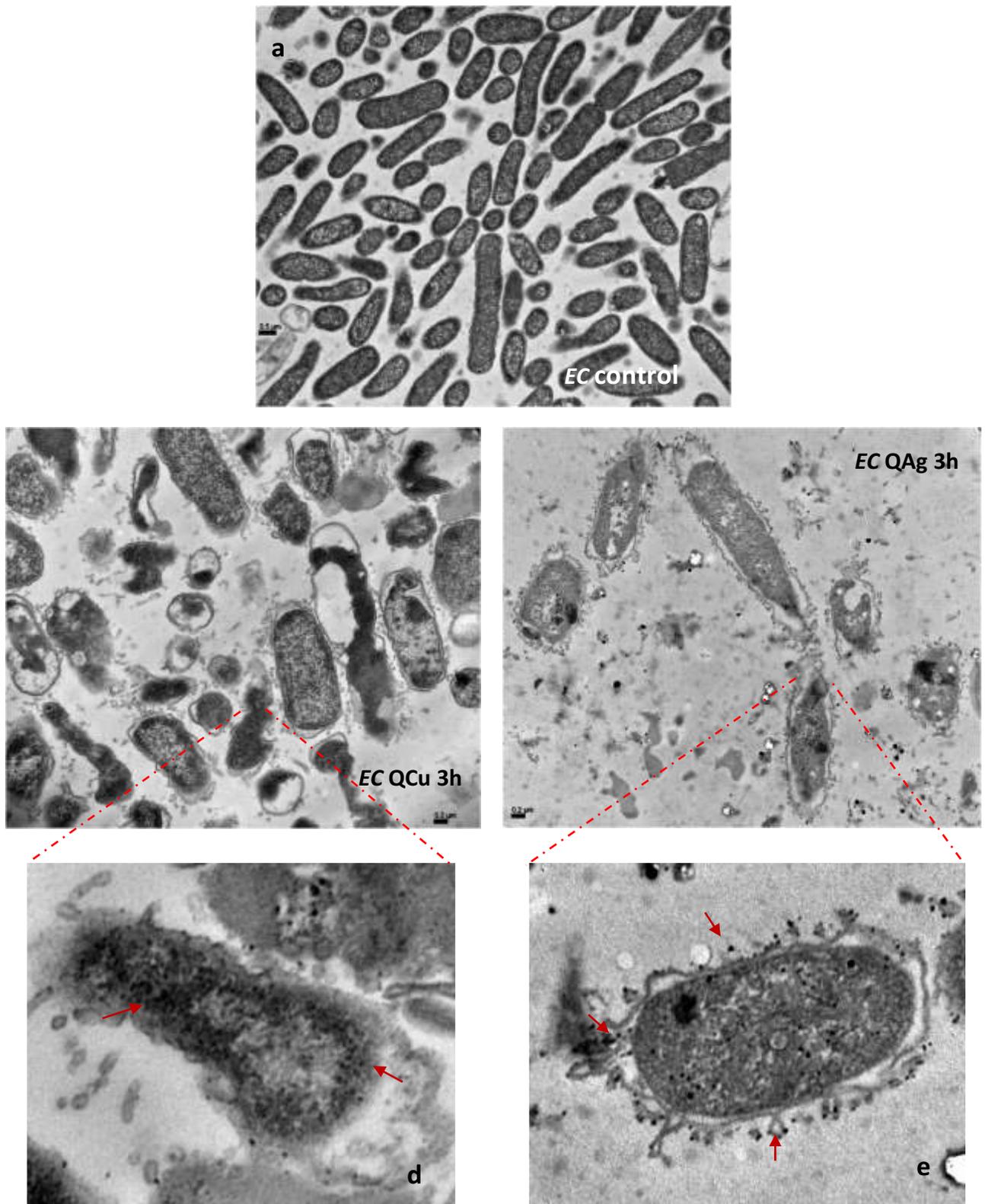


Figura 6.44. Comparación morfológica de imágenes de cortes de bacterias obtenidas por TEM: (a) *E. coli* control, suspensión de *E. coli* (b) tratada con nanocompuestos QCu y (c) tratada con nanocompuestos QAg. Magnificación mostrando detalles de las bacterias (d) y (e).

Corte de *S. aureus* incubados con nanocompuestos para observación por TEM

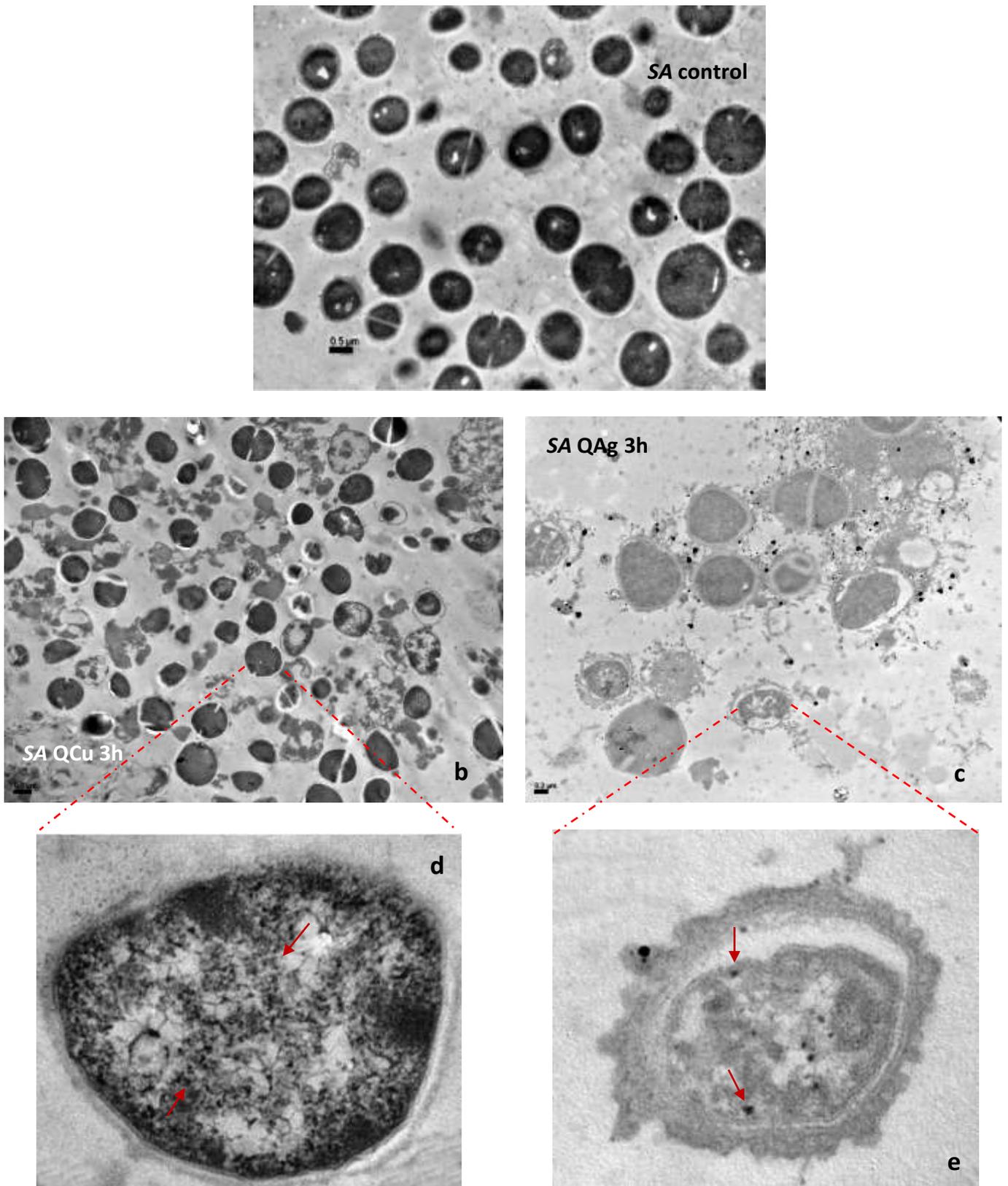


Figura 6.45. Comparación morfológica de imágenes de cortes de bacterias obtenidas por TEM: (a) *S. aureus* control, suspensión de *S. aureus* (b) tratada con nanocompuestos QCu y (c) tratada con nanocompuestos QAg. Magnificación mostrando detalles de las bacterias (d) y (e).

Corte fino de *E. coli* y *S. aureus* incubados con películas Q

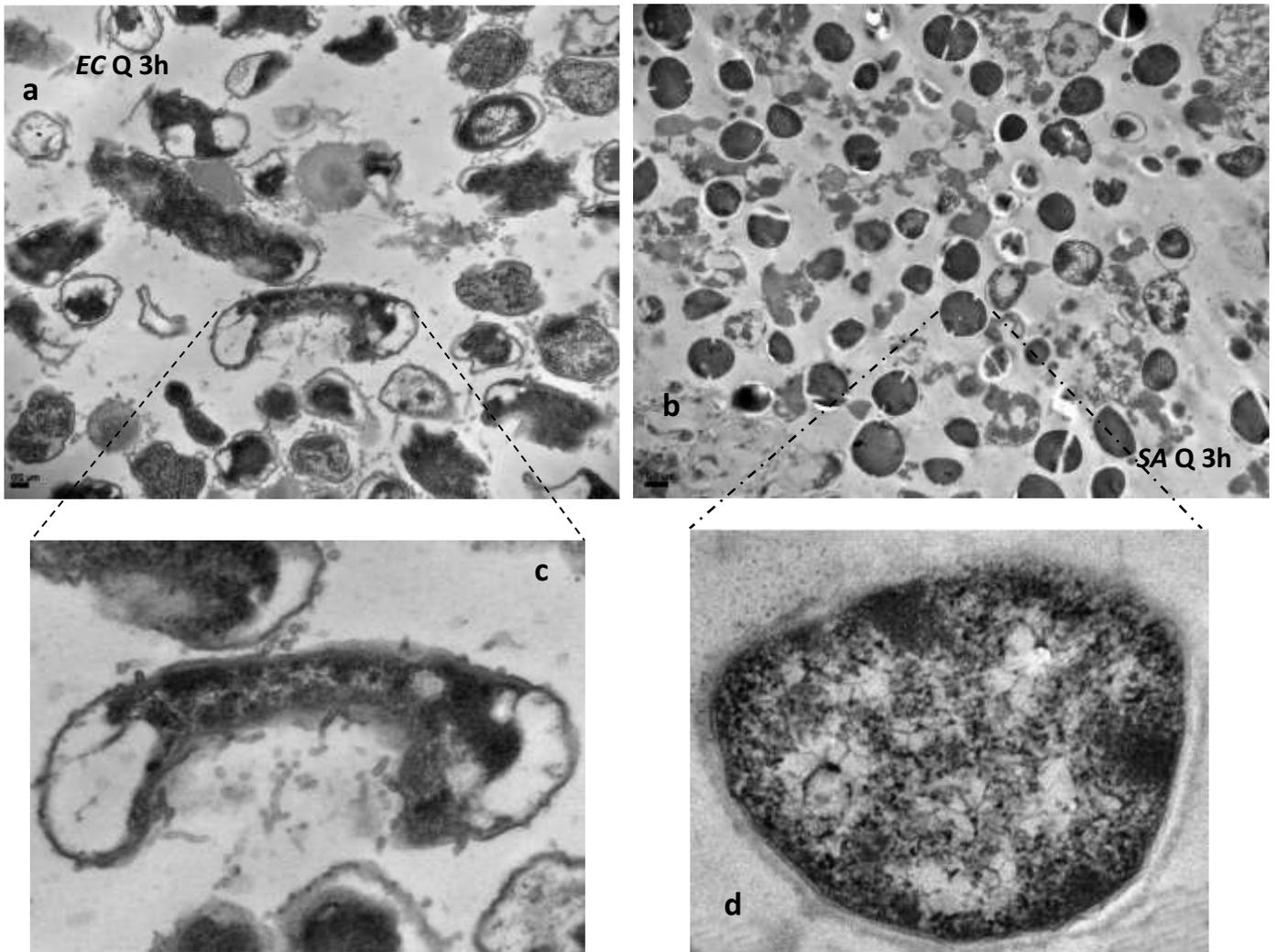


Figura 6.45. Micrografías de cortes de bacterias obtenidas por TEM: **(a)** suspensión de *E. coli* y **(b)** suspensión de *S. aureus* incubadas con películas Q. Magnificación mostrando detalles de las bacterias **(c)** y **(d)**.

Corte fino de *Salmonella* incubadas con película Q y nanocompuestos QAg y QCu

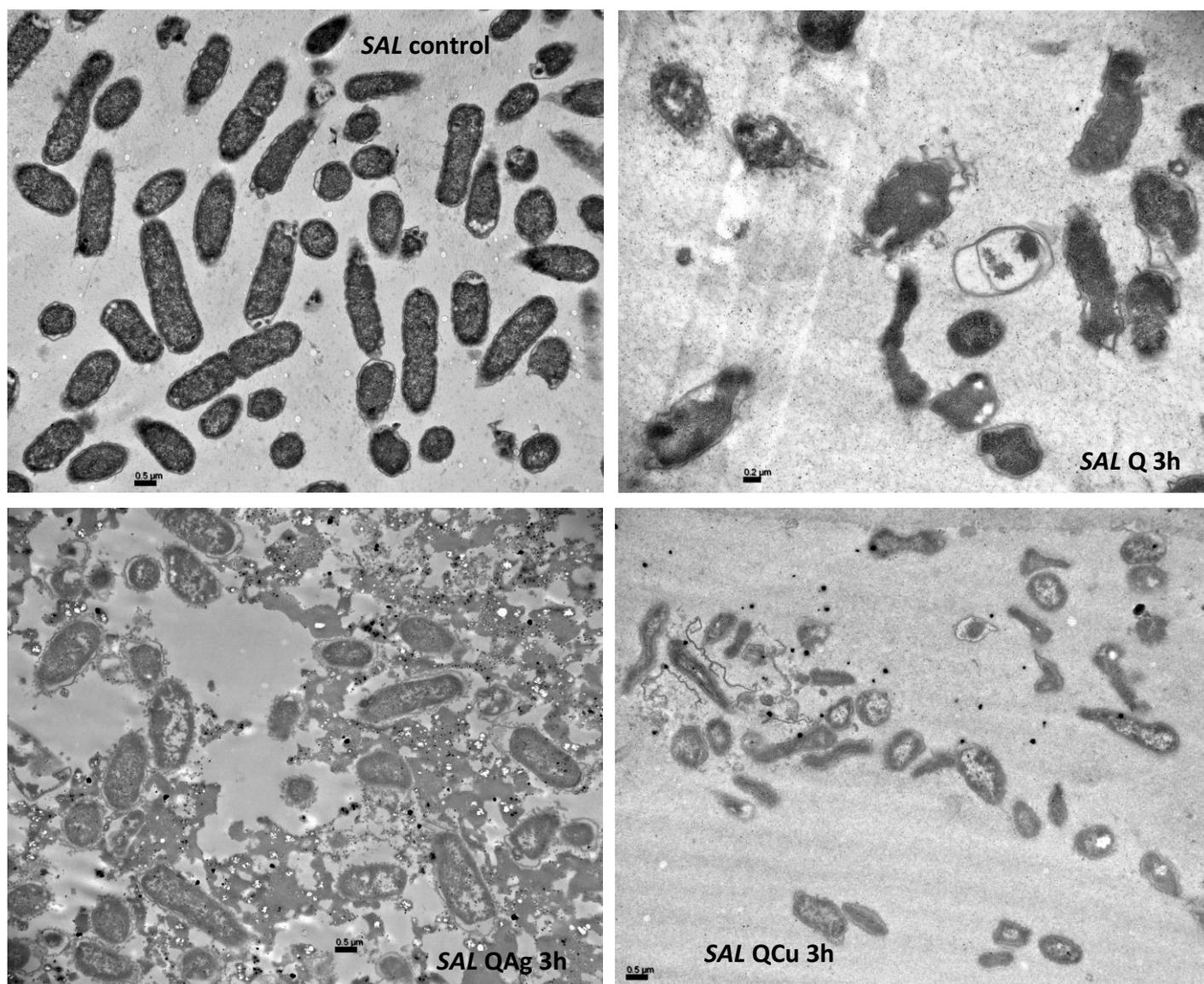


Figura 6.46. Micrografías de cortes de bacterias obtenidas por TEM: (a) suspensión de *Salmonella spp* incubadas con película Q, (b) con nanocompuesto QAg y (c) con nanocompuesto QCu. El aumento se muestra en cada micrografía.

S. epidermidis incubada con película Q y nanocompuestos QAg y QCu

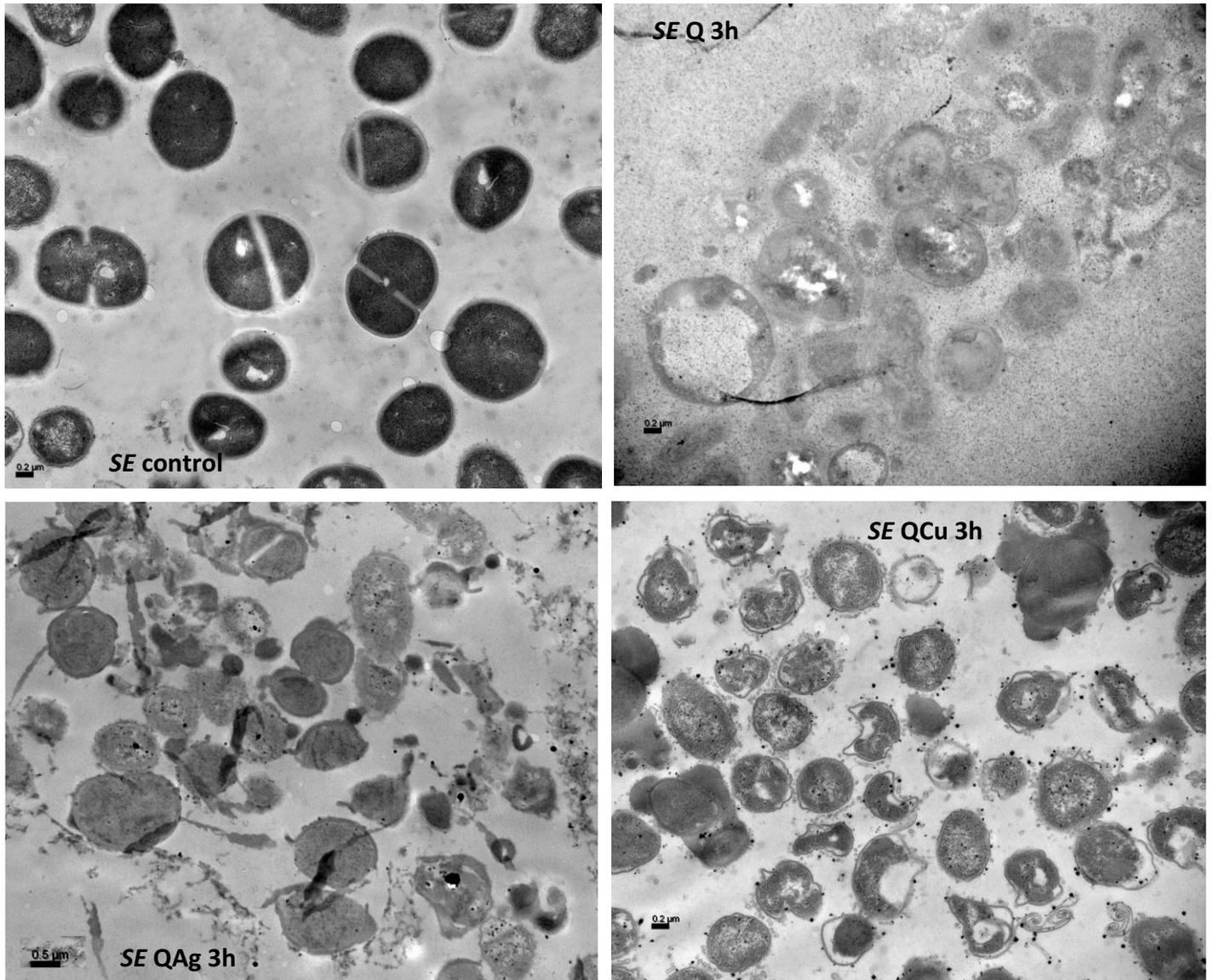


Figura 6.47. Micrografías de cortes de bacterias obtenidas por TEM: **(a)** suspensión de *S. epidermidis* incubada con película Q, **(b)** con nanocompuesto QAg y **(c)** con nanocompuesto QCu. El aumento se muestra en cada micrografía.

6.5 CONCLUSIONES

Se recolectaron evidencias suficientes para respaldar las actividades antimicrobianas y antifúngicas del quitosano como polímero en solución o formando parte de los nanocompuestos.

Tanto las películas desarrolladas a base de quitosano con nanopartículas incorporadas como sus mezclas con alcohol polivinílico mantuvieron el carácter antimicrobiano inherente al quitosano. Este fenómeno se explica por el modo de acción del biopolímero, causado por una interacción electrostática entre el quitosano y los componentes aniónicos de la pared celular.

Asimismo, las nanopartículas de plata, cobre y dióxido de titanio presentaron propiedades antimicrobianas *per se*, por lo que los nanocompuestos permitieron potenciar esa capacidad presentando un efecto sinérgico frente a las bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y *Candida albicans*.

Es necesario resaltar la relación existente con la capacidad de hinchamiento y la solubilidad de los nanocompuestos que permitieron el ingreso del medio acuoso con la consiguiente liberación de iones. El quitosano, además de su intrínseco carácter antimicrobiano, actuó como portador de las nanopartículas cuya ionización potenció el efecto inhibitorio de los nanocompuestos. En el caso de las mezclas con PVA, el entrecruzamiento restringió el movimiento de las nanopartículas y el halo se circunscribió a la zona próxima al nanocompuesto.

De lo anteriormente expuesto se puede inferir que es difícil establecer un orden creciente o decreciente en la magnitud de la susceptibilidad de los microorganismos frente a los nanocompuestos desarrollados. Además del tipo de microorganismo influyó el sustrato con el que se puso en contacto. A su vez ese sustrato tiene propiedades e interacciones que varían con los componentes, las proporciones de los polímeros y las concentraciones de las nanopartículas.

Es posible afirmar que todos los nanocompuestos presentaron actividad antimicrobiana frente a los cinco microorganismos ensayados. El carácter antimicrobiano de los nanocompuestos fue profundamente estudiado a través de diversas técnicas que permitieron corroborar lo observado desde el punto de vista macroscópico a nivel microscópico por medio de TEM y SEM y espectroscopía ATR-FTIR y potencial-zeta.

6.6 REFERENCIAS

- Alvarez-Ordóñez, A., Halisch, J., & Prieto, M. (2010). Changes in Fourier transform infrared spectra of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Enteritidis after adaptation to stressful growth conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 142(1–2), 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.008>
- Amini, S. M. (2019a). Preparation of antimicrobial metallic nanoparticles with bioactive compounds. *Materials Science and Engineering C*, 103(January), 109809. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109809>
- Amini, S. M. (2019b). Preparation of antimicrobial metallic nanoparticles with bioactive compounds. *Materials Science and Engineering C*, 103(May), 109809. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109809>
- Amini, S. M., & Mahabadi, V. P. (2018). Selenium nanoparticles role in organ systems functionality and disorder. *Nanomedicine Research Journal*, 3(3), 117–124. <https://doi.org/10.22034/NMRJ.2018.03.001>
- Amiri, S., Yousefi-Ahmadipour, A., Hosseini, M. J., Haj-Mirzaian, A., Momeny, M., Hosseini-Chegeni, H., Mokhtari, T., Kharrazi, S., Hassanzadeh, G., Amini, S. M., Jafarinejad, S., & Ghazi-Khansari, M. (2018). Maternal exposure to silver nanoparticles are associated with behavioral abnormalities in adulthood: Role of mitochondria and innate immunity in developmental toxicity. *NeuroToxicology*, 66, 66–77. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.03.006>
- Anaya, P., Cárdenas, G., Lavayen, V., García, A., & O'Dwyer, C. (2013). Chitosan gel film bandages: Correlating structure, composition, and antimicrobial properties. *Journal of Applied Polymer Science*, 128(6), 3939–3948. <https://doi.org/10.1002/app.38621>
- Anderson, D. G., Salm, S. N., Allen, D. P., & Nester, E. W. (2016). NESTER'S MICROBIOLOGY: A HUMAN PERSPECTIVE-Eighth edition. In D. G. Anderson, S. N. Salm, D. P. Allen, & E. W. Nester (Eds.), *Journal of Chemical Information and Modeling* (8th ed., Vol. 8). McGraw-Hill Education. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Angel, B. M., Vallotton, P., & Apte, S. C. (2015). On the mechanism of nanoparticulate CeO₂ toxicity to freshwater algae. *Aquatic Toxicology*, 168, 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.09.015>
- Ashrafi, M., Bayat, M., Mortazavi, P., Hashemi, S. J., & Meimandipour, A. (2020). Antimicrobial effect of chitosan–silver–copper nanocomposite on *Candida albicans*. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 10(1), 87–95. <https://doi.org/10.1007/s40097-020-00331-3>
- Ayaz Ahmed, K. B., Raman, T., & Anbazhagan, V. (2016). Platinum nanoparticles inhibit bacteria proliferation and rescue zebrafish from bacterial infection. *RSC Advances*, 6(50), 44415–44424. <https://doi.org/10.1039/c6ra03732a>
- Bala, P., Jathar, S., Kale, S., & Pal, K. (2014). Transdermal Drug Delivery System (TDDS) - A Multifaceted Approach For Drug Delivery. *Journal of Pharmacy Research*, 8(12), 1805–1835. <http://jpronline.info/index.php/jpr/article/view/19484>
- Bastarrachea, L., Dhawan, S., & Sablani, S. S. (2011). Engineering Properties of Polymeric-Based Antimicrobial Films for Food Packaging. *Food Engineering Reviews*, 3(2), 79–93. <https://doi.org/10.1007/s12393-011-9034-8>

Capítulo 6: Propiedades antimicrobianas de las matrices activas

- Böhme, K., Fernández-No, I. C., Barros-Velázquez, J., Gallardo, J. M., Cañas, B., & Calo-Mata, P. (2011). Rapid species identification of seafood spoilage and pathogenic Gram-positive bacteria by MALDI-TOF mass fingerprinting. *Electrophoresis*, 32(21), 2951–2965. <https://doi.org/10.1002/elps.201100217>
- BPF, D. (2003). Active packaging. *Food Packaging Technology*, 282–302.
- Bradley, E. L., Castle, L., & Chaudhry, Q. (2011). Applications of nanomaterials in food packaging with a consideration of opportunities for developing countries. *Trends in Food Science and Technology*, 22(11), 604–610. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.01.002>
- Brown, S., Santa Maria, J. P., & Walker, S. (2013). Wall teichoic acids of gram-positive bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 67, 313–336. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155620>
- Brunelle, J. P. (1978). Preparation of catalysts by metallic complex adsorption on mineral oxides. *Pure and Applied Chemistry*, 50(9–10), 1211–1229. <https://doi.org/10.1351/pac197850091211>
- Burgula, Y., Khali, D., Kim, S., Krishnan, S. S., Cousin, M. A., Gore, J. P., Reuhs, B. L., & Mauer, L. J. (2006). Detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* using filtration followed by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Journal of Food Protection*, 69(8), 1777–1784. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.8.1777>
- Cárdenas, G., Díaz V., J., Meléndrez, M. F., Cruzat C., C., & García Cancino, A. (2009). Colloidal Cu nanoparticles/chitosan composite film obtained by microwave heating for food package applications. *Polymer Bulletin*, 62(4), 511–524. <https://doi.org/10.1007/s00289-008-0031-x>
- Cha, D. S., & Chinnan, M. S. (2003). Emerging role of nisin in food and packaging systems. *Food Science and Biotechnology*, 12(2), 206–212.
- Cha, Dong Su, & Chinnan, M. S. (2004). Biopolymer-based antimicrobial packaging: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4), 223–237. <https://doi.org/10.1080/10408690490464276>
- Chen, H., Lan, G., Ran, L., Xiao, Y., Yu, K., Lu, B., Dai, F., Wu, D., & Lu, F. (2018). A novel wound dressing based on a Konjac glucomannan/silver nanoparticle composite sponge effectively kills bacteria and accelerates wound healing. *Carbohydrate Polymers*, 183, 70–80. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.11.029>
- Chen, L., Su, B., & Jiang, L. (2019). Recent advances in one-dimensional assembly of nanoparticles. *Chemical Society Reviews*, 48(1), 8–21. <https://doi.org/10.1039/c8cs00703a>
- Chen, X., Liu, L., Yu, P. Y., & Mao, S. S. (2011). Increasing solar absorption for photocatalysis with black hydrogenated titanium dioxide nanocrystals. *Science*, 331(6018), 746–750. <https://doi.org/10.1126/science.1200448>
- Cheng, Y. W., Wang, S. H., Liu, C. M., Chien, M. Y., Hsu, C. C., & Liu, T. Y. (2020). Amino-modified graphene oxide nanoplatelets for photo-thermal and anti-bacterial capability. *Surface and Coatings Technology*, 385, 125441. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2020.125441>
- Oh, J. K., Yegin, Y., Yang, F., Zhang, M., Li, J., Huang, S., & Akbulut, M. (2018). The influence of surface chemistry on the kinetics and thermodynamics of bacterial adhesion. *Scientific Reports*, 8(1), 1-13.. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35343-1>

Capítulo 6: Propiedades antimicrobianas de las matrices activas

- Chien, R., Yen, M., & Mau, J. (2015). Antimicrobial and antitumor activities of chitosan from shiitake stipes, compared to commercial chitosan from crab shells. *Carbohydrate Polymers*, 138, 259–264. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.11.061>
- Choi, O., Deng, K. K., Kim, N. J., Ross, L., Surampalli, R. Y., & Hu, Z. (2008). The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Research*, 42(12), 3066–3074. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.02.021>
- Chuan, D., Jin, T., Fan, R., Zhou, L., & Guo, G. (2019). Chitosan for gene delivery: Methods for improvement and applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, 268, 25–38. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.03.007>
- Chung, Y. C., & Chen, C. Y. (2008). Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. *Bioresource Technology*, 99(8), 2806–2814. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.06.044>
- Chung, Y. C., Kuo, C. L., & Chen, C. C. (2005). Preparation and important functional properties of water-soluble chitosan produced through Maillard reaction. *Bioresource Technology*, 96(13), 1473–1482. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.12.001>
- Chung, Y. C., & Chen, C. Y. (2008). Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. *Bioresource Technology*, 99(8), 2806–2814. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.06.044>
- Cioffi, N., & Rai, M. (2012). *Nano-antimicrobials: progress and prospects* (N. Cioffi & M. Rai (Eds.); XVI). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-24428-5>
- Cioffi, N., Torsi, L., Ditaranto, N., Tantillo, G., Ghibelli, L., Sabbatini, L., Bleve-Zacheo, T., D'Alessio, M., Zambonin, P. G., & Traversa, E. (2005). Copper nanoparticle/polymer composites with antifungal and bacteriostatic properties. *Chemistry of Materials*, 17(21), 5255–5262. <https://doi.org/10.1021/cm0505244>
- Coma, V. (2008). Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Science*, 78(1–2), 90–103. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.07.035>
- Cooksey, K. (2005). Effectiveness of antimicrobial food packaging materials. *Food Additives and Contaminants*, 22(10), 980–987. <https://doi.org/10.1080/02652030500246164>
- Currie, J., Lin, W., & Zhang, W. (2011). Patient knowledge and antibiotic abuse: Evidence from an audit study in China. *Journal of Health Economics*, 30(5), 933–949. <https://doi.org/10.1016/j.jhealeco.2011.05.009>
- D'Agostino, M., & Rodríguez-Lázaro, D. (2009). CHAPTER 13 - Harmonization and Validation of Methods in Food Safety – FOOD-PCR: A Case Study. *Global Issues in Food Science and Technology*, 199–209. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374124-0.00013-2>
- Dai, X., Zhao, Y., Li, J., Li, S., Lei, R., Chen, X., Zhang, X., & Li, C. (2018). Thiazolium-derivative functionalized silver nanocomposites for suppressing bacterial resistance and eradicating biofilms. *New Journal of Chemistry*, 42(2), 1316–1325. <https://doi.org/10.1039/c7nj03251j>
- de Kraker, M. E. A., Stewardson, A. J., & Harbarth, S. (2016). Will 10 Million People Die a Year due to Antimicrobial Resistance by 2050? *PLoS Medicine*, 13(11), 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002184>

Capítulo 6: Propiedades antimicrobianas de las matrices activas

- Dehnad, D., Mirzaei, H., Emam-Djomeh, Z., Jafari, S. M., & Dadashi, S. (2014). Thermal and antimicrobial properties of chitosan-nanocellulose films for extending shelf life of ground meat. *Carbohydrate Polymers*, *109*, 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.03.063>
- Delavary, B. M., van der Veer, W. M., van Egmond, M., Niessen, F. B., & Beelen, R. H. J. (2011). Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology*, *216*(7), 753–762. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2011.01.001>
- Devlieghere, F., Vermeulen, A., & Debevere, J. (2004). Chitosan: Antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology*, *21*(6), 703–714. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.02.008>
- Díaz-Visurraga, J., García, A., & Cárdenas, G. (2010). Lethal effect of chitosan-Ag (I) films on *Staphylococcus aureus* as evaluated by electron microscopy. *Journal of Applied Microbiology*, *108*(2), 633–646. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04447.x>
- Duncan, T. V. (2011). Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. *Journal of Colloid and Interface Science*, *363*(1), 1–24. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.07.017>
- Dutta, P. K., Tripathi, S., Mehrotra, G. K., & Dutta, J. (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry*, *114*(4), 1173–1182. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.047>
- Eckhardt, S., Brunetto, P. S., Gagnon, J., Priebe, M., Giese, B., & Fromm, K. M. (2013). Nanobio silver: Its interactions with peptides and bacteria, and its uses in medicine. *Chemical Reviews*, *113*(7), 4708–4754. <https://doi.org/10.1021/cr300288v>
- El-Rafie, M. H., Mohamed, A. A., Shaheen, T. I., & Hebeish, A. (2010). Antimicrobial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on cotton fabrics. *Carbohydrate Polymers*, *80*(3), 779–782. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.12.028>
- El-tahlawy, K. F., El-bendary, M. A., Elhendawy, A. G., & Hudson, S. M. (2005). The antimicrobial activity of cotton fabrics treated with different crosslinking agents and chitosan. *Carbohydrate Polymers*, *60*(4), 421–430. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.02.019>
- Eurosurveillance editorial team. (2012). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *Euro Surveillance : Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, *17*(10), 1–442. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2597>
- Fang, J., Lyon, D. Y., Wiesner, M. R., Dong, J., & Alvarez, P. J. (2007). Effect of a fullerene water suspension on bacterial phospholipids and membrane phase behavior. *Environmental Science & Technology*, *41*(7), 2636–2642. <https://doi.org/10.1021/es062181w>
- Fang, T. T., Li, X., Wang, Q. S., Zhang, Z. J., Liu, P., & Zhang, C. C. (2012). Toxicity evaluation of CdTe quantum dots with different size on *Escherichia coli*. *Toxicology in Vitro*, *26*(7), 1233–1239. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.06.001>
- Fei Liu, X., Guan, Y. L., Yang, D. Z., Li, Z., & Yao, K. De. (2001). Antibacterial Action of Chitosan and Carboxymethylated Chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*, *79*(7), 1324–1335. [https://doi.org/10.1002/1097-4628\(20010214\)79:7<1324::AID-APP210>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/1097-4628(20010214)79:7<1324::AID-APP210>3.0.CO;2-L)

Capítulo 6: Propiedades antimicrobianas de las matrices activas

- Feng, Q. L., Wu, J., Chen, G. Q., Cui, F. Z., Kim, T. N., & Kim, J. O. (2000). A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Materials Research*, 52(4), 662–668. [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(20001215\)52:4<662::AID-JBM10>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-4636(20001215)52:4<662::AID-JBM10>3.0.CO;2-3)
- Fernández-Pan, I., Maté, J. I., Gardrat, C., & Coma, V. (2015). Effect of chitosan molecular weight on the antimicrobial activity and release rate of carvacrol-enriched films. *Food Hydrocolloids*, 51, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.04.033>
- Fernandez-Saiz, P., Lagaron, J. M., & Ocio, M. J. (2009). Optimization of the biocide properties of chitosan for its application in the design of active films of interest in the food area. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 913–921. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.06.001>
- Galván Márquez, I., Akuaku, J., Cruz, I., Cheetham, J., Golshani, A., & Smith, M. L. (2013). Disruption of protein synthesis as antifungal mode of action by chitosan. *International Journal of Food Microbiology*, 164(1), 108–112. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.03.025>
- Galván Márquez, I., Akuaku, J., Cruz, I., Cheetham, J., Golshani, A., & Smith, M. L. (2013). Disruption of protein synthesis as antifungal mode of action by chitosan. *International Journal of Food Microbiology*, 164(1), 108–112. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.03.025>
- Ghaemi, B., Shaabani, E., Najafi-Taher, R., Jafari Nodooshan, S., Sadeghpour, A., Kharrazi, S., & Amani, A. (2018). Intracellular ROS Induction by Ag@ZnO Core-Shell Nanoparticles: Frontiers of Permanent Optically Active Holes in Breast Cancer Theranostic. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 10(29), 24370–24381. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b03822>
- Gopal, A., Kant, V., Gopalakrishnan, A., Tandan, S. K., & Kumar, D. (2014). Chitosan-based copper nanocomposite accelerates healing in excision wound model in rats. *European Journal of Pharmacology*, 731(1), 8–19. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.02.033>
- Goswami, D. S., Uppal, N., Goyal, S., Mehta, N., & Gupta, A. K. (2013). Permeation enhancer for TDDS from natural and synthetic sources: A review. *Journal of Biomedical and Pharmaceutical Research*, 2(1), 19–29.
- Goy, R. C., De Britto, D., & Assis, O. B. G. (2009). A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polimeros*, 19(3), 241–247. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282009000300013>
- Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J. B., Christensen, A. B., & Givskov, M. (2002). Food spoilage - Interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 78(1–2), 79–97. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00233-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00233-7)
- Greaves, N. S., Ashcroft, K. J., Baguneid, M., & Bayat, A. (2013). Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. *Journal of Dermatological Science*, 72(3), 206–217. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2013.07.008>
- Guarda, A., Rubilar, J. F., Miltz, J., & Galotto, M. J. (2011). The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *International Journal of Food Microbiology*, 146(2), 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.011>
- Gurunathan, S., Han, J. W., Abdal Dayem, A., Eppakayala, V., & Kim, J. H. (2012). Oxidative stress-mediated antibacterial activity of graphene oxide and reduced graphene oxide in *Pseudomonas*

Capítulo 6: Propiedades antimicrobianas de las matrices activas

- aeruginosa. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 5901–5914. <https://doi.org/10.2147/IJN.S37397>
- Han, JH. (2003). Antimicrobial food packaging. In A. R (Ed.), *Novel food packaging techniques* (Academic P). Novel food packaging techniques.
- Han, JungH. (2005). Antimicrobial packaging systems. *Innovations in Food Packaging*, 80–107. <https://doi.org/10.1201/9781420031812.ch10>
- Helander, I. M., Nurmiäho-Lassila, E. L., Ahvenainen, R., Rhoades, J., & Roller, S. (2001). Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 71(2–3), 235–244. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00609-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00609-2)
- Helm, D., Labischinski, H., & Naumann, D. (1991). Elaboration of a procedure for identification of bacteria using Fourier-Transform IR spectral libraries: a stepwise correlation approach. *Journal of Microbiological Methods*, 14(2), 127–142. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(91\)90042-O](https://doi.org/10.1016/0167-7012(91)90042-O)
- Hernández-Lauzardo, A. N., Bautista-Baños, S., Velázquez-del Valle, M. G., Méndez-Montecalvo, M. G., Sánchez-Rivera, M. M., & Bello-Pérez, L. A. (2008). Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. *Carbohydrate Polymers*, 73(4), 541–547. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.12.020>
- Hosseinnejad, M., & Jafari, S. M. (2016). Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 85, 467–475. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.022>
- Hu, C., Guo, J., Qu, J., & Hu, X. (2007). Photocatalytic degradation of pathogenic bacteria with AgI/TiO₂ under visible light irradiation. *Langmuir*, 23(9), 4982–4987. <https://doi.org/10.1021/la063626x>
- Hu, C. H., & Xia, M. S. (2006). Adsorption and antibacterial effect of copper-exchanged montmorillonite on *Escherichia coli* K88. *Applied Clay Science*, 31(3–4), 180–184. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2005.10.010>
- Hu, C., Song, L., Zhang, Z., Chen, N., Feng, Z., & Qu, L. (2015). Tailored graphene systems for unconventional applications in energy conversion and storage devices. *Energy and Environmental Science*, 8(1), 31–54. <https://doi.org/10.1039/c4ee02594f>
- Hyde, G. K., Stewart, S. M., Scarel, G., Parsons, G. N., Shih, C. C., Shih, C. M., Lin, S. J., Su, Y. Y., Monteiro-Riviere, N. A., & Narayan, R. J. (2011). Atomic layer deposition of titanium dioxide on cellulose acetate for enhanced hemostasis. *Biotechnology Journal*, 6(2), 213–223. <https://doi.org/10.1002/biot.201000342>
- Hye Kim, J., Il Kim, S., Kwon, I. B., Hyun Kim, M., & Ik Lim, J. (2013). Simple fabrication of silver hybridized porous chitosan-based patch for transdermal drug-delivery system. *Materials Letters*, 95, 48–51. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2012.12.078>
- Ing, L. Y., Zin, N. M., Sarwar, A., & Katas, H. (2012). Antifungal activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties. *International Journal of Biomaterials*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/632698>
- Ingle, A. P., Duran, N., & Rai, M. (2014). Bioactivity, mechanism of action, and cytotoxicity of

Capítulo 6: Propiedades antimicrobianas de las matrices activas

- copper-based nanoparticles: A review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(3), 1001–1009. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5422-8>
- Irkin, R., & Esmer, O. K. (2015). Novel food packaging systems with natural antimicrobial agents. *Journal of Food Science and Technology*, 52(10), 6095–6111. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1780-9>
- Jatoi, A. W., Kim, I. S., & Ni, Q. Q. (2019). Cellulose acetate nanofibers embedded with AgNPs anchored TiO₂ nanoparticles for long term excellent antibacterial applications. *Carbohydrate Polymers*, 207(December 2018), 640–649. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.12.029>
- Jayaramudu, T., Raghavendra, G. M., Varaprasad, K., Venkata, G., Reddy, S., Reddy, A. B., Sudhakar, K., & Sadiku, E. R. (2016). Preparation and characterization of poly (ethylene glycol) stabilized nano silver particles by a mechanochemical assisted ball mill process. *Journal of Applied Polymer Science*, 133(7)(September 2015), 1–8. <https://doi.org/10.1002/app.43027>
- Jayaramudu, T., Varaprasad, K., Pyarasani, R. D., Reddy, K. K., Kumar, K. D., Akbari-Fakhrabadi, A., Mangalaraja, R. V., & Amalraj, J. (2019). Chitosan capped copper oxide/copper nanoparticles encapsulated microbial resistant nanocomposite films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 128, 499–508. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.145>
- Jayaramudu, T., Varaprasad, K., Raghavendra, G. M., Sadiku, E. R., Mohana Raju, K., & Amalraj, J. (2017). Green synthesis of tea Ag nanocomposite hydrogels via mint leaf extraction for effective antibacterial activity. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 28(14), 1588–1602. <https://doi.org/10.1080/09205063.2017.1338501>
- Jayaramudu, T., Varaprasad, K., Reddy, K. K., Pyarasani, R. D., Akbari-Fakhrabadi, A., & Amalraj, J. (2020a). Chitosan-pluronic based Cu nanocomposite hydrogels for prototype antimicrobial applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 143, 825–832. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.143>
- Jayaramudu, T., Varaprasad, K., Reddy, K. K., Pyarasani, R. D., Akbari-Fakhrabadi, A., & Amalraj, J. (2020b). Chitosan-pluronic based Cu nanocomposite hydrogels for prototype antimicrobial applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 143, 825–832. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.143>
- Jastrzebska, A. M., Karwowska, E., Olszyna, A. R., & Kunicki, A. (2015). Influence of bacteria adsorption on zeta potential of Al₂O₃ and Al₂O₃/Ag nanoparticles in electrolyte and drinking water environment studied by means of zeta potential. *Surface and Coatings Technology*, 271, 225–233. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2014.12.015>
- Jiang, W., Yang, K., Vachet, R. W., & Xing, B. (2010). Interaction between oxide nanoparticles and biomolecules of the bacterial cell envelope as examined by infrared spectroscopy. *Langmuir*, 26(23), 18071–18077. <https://doi.org/10.1021/la103738e>
- Kłodzińska, E., Szumski, M., Dziubakiewicz, E., Hryniewicz, K., Skwarek, E., Janusz, W., & Buszewski, B. (2010). Effect of zeta potential value on bacterial behavior during electrophoretic separation. *Electrophoresis*, 31(9), 1590–1596. <https://doi.org/10.1002/elps.200900559>
- Korupalli, C., Huang, C. C., Lin, W. C., Pan, W. Y., Lin, P. Y., Wan, W. L., Li, M. J., Chang, Y., & Sung, H. W. (2017). Acidity-triggered charge-convertible nanoparticles that can cause bacterium-specific aggregation in situ to enhance photothermal ablation of focal infection. *Biomaterials*,

Capítulo 6: Propiedades antimicrobianas de las matrices activas

116, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.11.045>

- Kim, J. H., Cho, H., Ryu, S. E., & Choi, M. U. (2000). Effects of metal ions on the activity of protein tyrosine phosphatase VHR: Highly potent and reversible oxidative inactivation by Cu²⁺ ion. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 382(1), 72–80. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.1996>
- Kim, K. J., Sung, 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 nano-particles on *Candida albicans*. *BioMetals*, 22(2), 235–242. <https://doi.org/10.1007/s10534-008-9159-2>
- Koga, V. L., Rodrigues, G. R., Scandorieiro, S., Vespero, E. C., Oba, A., De Brito, B. G., De Brito, K. C. T., Nakazato, G., & Kobayashi, R. K. T. (2015). Evaluation of the antibiotic resistance and virulence of *Escherichia coli* strains isolated from chicken carcasses in 2007 and 2013 from Paraná, Brazil. *Foodborne Pathogens and Disease*, 12(6), 479–485. <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1888>
- Kong, M., Chen, X. G., Xing, K., & Park, H. J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144(1), 51–63. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.012>
- Kravanja, G., Primožič, M., Knez, Ž., & Leitgeb, M. (2019). Chitosan-based (Nano)materials for Novel Biomedical Applications. *Molecules*, 24(10), 1–23. <https://doi.org/10.3390/molecules24101960>
- Krepker, M., Shemesh, R., Danin Poleg, Y., Kashi, Y., Vaxman, A., & Segal, E. (2017). Active food packaging films with synergistic antimicrobial activity. *Food Control*, 76, 117–126. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.01.014>
- Kreyling, W. G., Semmler-Behnke, M., & Chaudhry, Q. (2010). A complementary definition of nanomaterial. *Nano Today*, 5(3), 165–168. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2010.03.004>
- Krishnan, N., Velramar, B., Ramatchandirin, B., Abraham, G. C., Duraisamy, N., Pandiyan, R., & Velu, R. K. (2018). Effect of biogenic silver nanocubes on matrix metalloproteinases 2 and 9 expressions in hyperglycemic skin injury and its impact in early wound healing in streptozotocin-induced diabetic mice. *Materials Science and Engineering C*, 91, 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.05.020>
- Kruk, T., Gołda-Cępa, M., Szczepanowicz, K., Szyk-Warszyńska, L., Brzychczy-Włoch, M., Kotarba, A., & Warszyński, P. (2019). Nanocomposite multifunctional polyelectrolyte thin films with copper nanoparticles as the antimicrobial coatings. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 181(January), 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.05.014>
- Kulatunga, D. C. M., Dananjaya, S. H. S., Godahewa, G. I., Lee, J., & De Zoysa, M. (2017). Chitosan silver nanocomposite (CAgNC) as an antifungal agent against *Candida albicans*. *Medical Mycology*, 55(2), 213–222. <https://doi.org/10.1093/mmy/myw053>
- Kumamoto, C. A., Gresnigt, M. S., & Hube, B. (2020). The gut, the bad and the harmless: *Candida albicans* as a commensal and opportunistic pathogen in the intestine. *Current Opinion in Microbiology*, 56, 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.05.006>
- Kumar, P. T. S., Abhilash, S., Manzoor, K., Nair, S. V., Tamura, H., & Jayakumar, R. (2010). Preparation and characterization of novel β -chitin/nanosilver composite scaffolds for wound

Capítulo 6: Propiedades antimicrobianas de las matrices activas

- dressing applications. *Carbohydrate Polymers*, 80(3), 761–767. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.12.024>
- Kuorwel, K. K., Cran, M. J., Sonneveld, K., Miltz, J., & Bigger, S. W. (2011). Antimicrobial activity of biodegradable polysaccharide and protein-based films containing active agents. *Journal of Food Science*, 76(3), R90–R102. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02102.x>
- Kwon, H. J., Shin, K., Soh, M., Chang, H., Kim, J., Lee, J., Ko, G., Kim, B. H., Kim, D., & Hyeon, T. (2018). Large-Scale Synthesis and Medical Applications of Uniform-Sized Metal Oxide Nanoparticles. *Advanced Materials*, 30(42), 1–24. <https://doi.org/10.1002/adma.201704290>
- Leung, Y. H., Xu, X., Ma, A. P. Y., Liu, F., Ng, A. M. C., Shen, Z., Gethings, L. A., Guo, M. Y., Djurišić, A. B., Lee, P. K. H., Lee, H. K., Chan, W. K., & Leung, F. C. C. (2016). Toxicity of ZnO and TiO₂ to Escherichia coli cells. *Scientific Reports*, 6(September), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep35243>
- Lin, X., Li, J., Ma, S., Liu, G., Yang, K., Tong, M., & Lin, D. (2014). Toxicity of TiO₂ nanoparticles to Escherichia coli: Effects of particle size, crystal phase and water chemistry. *PLoS ONE*, 9(10), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110247>
- Liu, H., Du, Y., Wang, X., & Sun, L. (2004). Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *International Journal of Food Microbiology*, 95(2), 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.01.022>
- Liu, J., Sonshine, D. A., Shervani, S., & Hurt, R. H. (2010). Controlled release of biologically active silver from nanosilver surfaces. *ACS Nano*, 4(11), 6903–6913. <https://doi.org/10.1021/nn102272n>
- Maquelin, K., Choo-Smith, L.-P., Endtz, H. P., Bruining, H. A., & Puppels, G. J. (2000). Raman spectroscopic studies on bacteria. *Optical Biopsy and Tissue Optics*, 4161, 144. <https://doi.org/10.1117/12.409323>
- Marambio-Jones, C., & Hoek, E. M. V. (2010). A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticle Research*, 12(5), 1531–1551. <https://doi.org/10.1007/s11051-010-9900-y>
- Matica, M. A., Aachmann, F. L., Tøndervik, A., Sletta, H., & Ostafe, V. (2019). Chitosan as a wound dressing starting material: Antimicrobial properties and mode of action. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), 1–34. <https://doi.org/10.3390/ijms20235889>
- Lee, W. S., Park, Y. S., & Cho, Y. K. (2015). Significantly enhanced antibacterial activity of TiO₂ nanofibers with hierarchical nanostructures and controlled crystallinity. *Analyst*, 140(2), 616–622. <https://doi.org/10.1039/c4an01682c>
- Lee, Y., Puumala, E., Robbins, N., & Cowen, L. E. (2021). Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in Candida albicans and beyond. *Chemical Reviews*, 121(6), 3390–3411. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00199>
- Lekjing, S. (2016). A chitosan-based coating with or without clove oil extends the shelf life of cooked pork sausages in refrigerated storage. *Meat Science*, 111, 192–197. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.10.003>
- Leung, Y. H., Ng, A. M. C., Xu, X., Shen, Z., Gethings, L. A., Wong, M. T., Chan, C. M. N., Guo, M. Y., Ng, Y. H., Djurišić, A. B., Lee, P. K. H., Chan, W. K., Yu, L. H., Phillips, D. L., Ma, A. P. Y., & Leung, F.

Capítulo 6: Propiedades antimicrobianas de las matrices activas

- C. C. (2014). Mechanisms of antibacterial activity of mgo: Non-ros mediated toxicity of mgo nanoparticles towards escherichia coli. *Small*, 10(6), 1171–1183. <https://doi.org/10.1002/sml.201302434>
- Li, W. R., Xie, X. B., Shi, Q. S., Zeng, H. Y., Ou-Yang, Y. S., & Chen, Y. B. (2010). Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on Escherichia coli. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(4), 1115–1122. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2159-5>
- Li, Q., Lu, F., Zhou, G., Yu, K., Lu, B., Xiao, Y., Dai, F., Wu, D., & Lan, G. (2017). Silver Inlaid with Gold Nanoparticle/Chitosan Wound Dressing Enhances Antibacterial Activity and Porosity, and Promotes Wound Healing. *Biomacromolecules*, 18(11), 3766–3775. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01180>
- Li, Z., Yang, F., & Yang, R. (2015). Synthesis and characterization of chitosan derivatives with dual-antibacterial functional groups. *International Journal of Biological Macromolecules*, 75, 378–387. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.01.056>
- Lin, D., Yang, Y., Wang, J., Yan, W., Wu, Z., Chen, H., Zhang, Q., Wu, D., Qin, W., & Tu, Z. (2020). Preparation and characterization of TiO₂-Ag loaded fish gelatin-chitosan antibacterial composite film for food packaging. *International Journal of Biological Macromolecules*, 154, 123–133. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.070>
- Liu, H., Du, Y., Wang, X., & Sun, L. (2004). Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *International Journal of Food Microbiology*, 95(2), 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.01.022>
- Liu, Y., Zhang, Q., Xu, M., Yuan, H., Chen, Y., Zhang, J., Luo, K., Zhang, J., & You, B. (2019). Novel and efficient synthesis of Ag-ZnO nanoparticles for the sunlight-induced photocatalytic degradation. *Applied Surface Science*, 476(January), 632–640. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2019.01.137>
- Lopez-Moya, F., Suarez-Fernandez, M., & Lopez-Llorca, L. V. (2019). Molecular mechanisms of chitosan interactions with fungi and plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2), 332.
- Luo, M., Ming, Y., Wang, L., Li, Y., Li, B., Chen, J., & Shi, S. (2018). Local delivery of deep marine fungus-derived equisetin from polyvinylpyrrolidone (PVP) nanofibers for anti-MRSA activity. *Chemical Engineering Journal*, 350(February), 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.05.159>
- Malhotra, B., Keshwani, A., & Kharkwal, H. (2015). Antimicrobial food packaging: Potential and pitfalls. *Frontiers in Microbiology*, 6(JUN), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00611>
- Manikandan, A., & Sathiyabama, M. (2015). Green synthesis of copper-chitosan nanoparticles and study of its antibacterial activity. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 6(1), 1. <https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000251>
- Mansilla, A. Y., Albertengo, L., Rodríguez, M. S., Debbaudt, A., Zúñiga, A., & Casalongué, C. A. (2013). Evidence on antimicrobial properties and mode of action of a chitosan obtained from crustacean exoskeletons on Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(15), 6957–6966. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4993-8>

Capítulo 6: Propiedades antimicrobianas de las matrices activas

- Marambio-Jones, C., & Hoek, E. M. V. (2010). A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticle Research*, 12(5), 1531–1551. <https://doi.org/10.1007/s11051-010-9900-y>
- Matica, M. A., Aachmann, F. L., Tøndervik, A., Sletta, H., & Ostafe, V. (2019). Chitosan as a wound dressing starting material: Antimicrobial properties and mode of action. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), 1–34. <https://doi.org/10.3390/ijms20235889>
- Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M., & Tauxe, R. V. (2000). Food-related illness and death in the United States. *Journal of Environmental Health*, 62(7), 9–18. <https://doi.org/10.3201/eid0506.990624>
- Muñoz-bonilla, A., Echeverria, C., Sonseca, Á., Arrieta, M. P., & Fern, M. (2019). Bio-Based Polymers with Antimicrobial Properties towards Sustainable Development. *Materials*, 12(4)(February 2019), 641. <https://doi.org/10.3390/ma12040641>
- Muriel-Galet, V., López-Carballo, G., Gavara, R., & Hernández-Muñoz, P. (2012). Antimicrobial food packaging film based on the release of LAE from EVOH. *International Journal of Food Microbiology*, 157(2), 239–244. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.009>
- Mutalik, C., Wang, D. Y., Krisnawati, D. I., Jazidie, A., Yougbare, S., & Kuo, T. R. (2020). Light-activated heterostructured nanomaterials for antibacterial applications. *Nanomaterials*, 10(4), 1–16. <https://doi.org/10.3390/nano10040643>
- Nadtochenko, V. A., Rincon, A. G., Stanca, S. E., & Kiwi, J. (2005). Dynamics of E. coli membrane cell peroxidation during TiO₂ photocatalysis studied by ATR-FTIR spectroscopy and AFM microscopy. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 169(2), 131–137. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2004.06.011>
- Nagy, A., Harrison, A., Sabbani, S., Munson, R. S., Dutta, P. K., & Waldman, W. J. (2011). Silver nanoparticles embedded in zeolite membranes: release of silver ions and mechanism of antibacterial action. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 1833–1852. <https://doi.org/10.2147/ijn.s24019>
- Nakazato, G., Kobayashi, R. K. T., Seabra, A. B., & Duran, N. (2017a). *Use of Nanoparticles As a*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804303-5/00012-2>
- Nakazato, G., Kobayashi, R. K. T., Seabra, A. B., & Duran, N. (2017b). Use of nanoparticles as a potential antimicrobial for food packaging. In *Food Preservation*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804303-5.00012-2>
- Naumann, D. (2006). Infrared Spectroscopy in Microbiology. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 1–29. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a0117>
- Naumann, D. (2000). Infrared Spectroscopy in Microbiology. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 102–131. file:///C:/Users/adm/Downloads/paperNaumann2000_FTIRmicrobiology.pdf
- Naumann, D. (2001). FT-infrared and FT-Raman spectroscopy in biomedical research. *Applied Spectroscopy Reviews*, 36(2–3), 239. <https://doi.org/10.1081/ASR-100106157>
- Naumann, D. (2008). FT-IR spectroscopy of microorganisms at the Robert Koch Institute: experiences gained during a successful project. *Biomedical Optical Spectroscopy*, 6853, 68530G. <https://doi.org/10.1117/12.761698>

Capítulo 6: Propiedades antimicrobianas de las matrices activas

- Neuhaus, F. C., & Baddiley, J. (2003). A Continuum of Anionic Charge: Structures and Functions of D-Alanyl-Teichoic Acids in Gram-Positive Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 686–723. <https://doi.org/10.1128/mubr.67.4.686-723.2003>
- OMS. (2017). *The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017*. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC). E05500. [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))
- Padgett, T., Han, I. Y., & Dawson, P. L. (1998). Incorporation of food-grade antimicrobial compounds into biodegradable packaging films. *Journal of Food Protection*, 61(10), 1330–1335. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-61.10.1330>
- Palma-Guerrero, J., Huang, I. C., Jansson, H. B., Salinas, J., Lopez-Llorca, L. V., & Read, N. D. (2009). Chitosan permeabilizes the plasma membrane and kills cells of *Neurospora crassa* in an energy dependent manner. *Fungal Genetics and Biology*, 46(8), 585–594. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.02.010>
- Palma-Guerrero, J., Lopez-Jimenez, J. A., Pérez-Berná, A. J., Huang, I. C., Jansson, H. B., Salinas, J., Villalaín, J., Read, N. D., & Lopez-Llorca, L. V. (2010). Membrane fluidity determines sensitivity of filamentous fungi to chitosan. *Molecular Microbiology*, 75(4), 1021–1032. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.07039.x>
- Panwar, R., Pemmaraju, S. C., Sharma, A. K., & Pruthi, V. (2016). Efficacy of ferulic acid encapsulated chitosan nanoparticles against *Candida albicans* biofilm. In *Microbial Pathogenesis* (Vol. 95). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.02.007>
- Park, S. C., Nah, J. W., & Park, Y. (2011). PH-dependent mode of antibacterial actions of low molecular weight water-soluble chitosan (LMWSC) against various pathogens. *Macromolecular Research*, 19(8), 853–860. <https://doi.org/10.1007/s13233-011-0812-1>
- Park, S. C., Nah, J. W., & Park, Y. (2011). PH-dependent mode of antibacterial actions of low molecular weight water-soluble chitosan (LMWSC) against various pathogens. *Macromolecular Research*, 19(8), 853–860. <https://doi.org/10.1007/s13233-011-0812-1>
- Peña, A., Sánchez, N. S., & Calahorra, M. (2013). Effects of chitosan on *Candida albicans*: conditions for its antifungal activity. *BioMed Research International*, 2013.
- Pérez-Obando, J., Marín-Silva, D. A., Pinotti, A. N., Pizzio, L. R., Osorio-Vargas, P., & Rengifo-Herrera, J. A. (2019). Degradation study of malachite green on chitosan films containing heterojunctions of melon/TiO₂ absorbing visible-light in solid-gas interfaces. *Applied Catalysis B: Environmental*, 244. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2018.12.004>
- Perinelli, D. R., Fagioli, L., Campana, R., Lam, J. K. W., Baffone, W., Palmieri, G. F., Casettari, L., & Bonacucina, G. (2018). Chitosan-based nanosystems and their exploited antimicrobial activity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 117(January), 8–20. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.01.046>
- Plapied, L., Vandermeulen, G., Vroman, B., Préat, V., & des Rieux, A. (2010). Bioadhesive nanoparticles of fungal chitosan for oral DNA delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 398(1–2), 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.07.041>

Capítulo 6: Propiedades antimicrobianas de las matrices activas

- Quintavalla, S., & Vicini, L. (2002). <Quintavalla Vicini antimicrob pack in meat.pdf>. *Meat Science*, 62, 373–380. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(02\)00121-3](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00121-3)
- Raafat, D., Von Bargen, K., Haas, A., & Sahl, H. G. (2008). Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(12), 3764–3773. <https://doi.org/10.1128/AEM.00453-08>
- Raafat, D., & Sahl, H. G. (2009). Chitosan and its antimicrobial potential - A critical literature survey. *Microbial Biotechnology*, 2(2 SPEC. ISS.), 186–201. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2008.00080.x>
- Rabea, E. I., Badawy, M. E. T., Stevens, C. V., Smagghe, G., & Steurbaut, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4(6), 1457–1465. <https://doi.org/10.1021/bm034130m>
- Raffi, M., Mehrwan, S., Bhatti, T. M., Akhter, J. I., Hameed, A., Yawar, W., & Ul Hasan, M. M. (2010). Investigations into the antibacterial behavior of copper nanoparticles against *Escherichia coli*. *Annals of Microbiology*, 60(1), 75–80. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0015-6>
- Rafique, M., Shaikh, A. J., Rasheed, R., Tahir, M. B., Bakhat, H. F., Rafique, M. S., & Rabbani, F. (2017). A Review on Synthesis, Characterization and Applications of Copper Nanoparticles Using Green Method. *Nano*, 12(4). <https://doi.org/10.1142/S1793292017500436>
- Raghavendra, G. M., Jayaramudu, T., Varaprasad, K., Sadiku, R., Ray, S. S., & Mohana Raju, K. (2013). Cellulose-polymer-Ag nanocomposite fibers for antibacterial fabrics/skin scaffolds. *Carbohydrate Polymers*, 93(2), 553–560. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.12.035>
- Raghavendra, G. M., Jung, J., Kim, D., & Seo, J. (2017). Chitosan-mediated synthesis of flowery-CuO, and its antibacterial and catalytic properties. *Carbohydrate Polymers*, 172, 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.04.070>
- Rodríguez-Lázaro, D., & Hernandez, M. (2018). Emerging Biological Risks in a Global Context: An Introduction. *Advances in Food and Nutrition Research*, 86, 1–12. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2018.04.001>
- Romainor, A. N. B., Chin, S. F., Pang, S. C., & Bilung, L. M. (2014). Preparation and characterization of chitosan nanoparticles-doped cellulose films with antimicrobial property. *Journal of Nanomaterials*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/710459>
- Roy, K., Mao, H. Q., Huang, S. K., & Leong, K. W. (1999). Oral gene delivery with chitosan-DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. *Nature Medicine*, 5(4), 387–391. <https://doi.org/10.1038/7385>
- Ruparelia, J. P., Chatterjee, A. K., Duttagupta, S. P., & Mukherji, S. (2008). Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta Biomaterialia*, 4(3), 707–716. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2007.11.006>
- Sawosz, E., Chwalibog, A., Mitura, K., Mitura, S., Szeliga, J., Niemiec, T., Rupiewicz, M., Grodzik, M., & Sokolowska, A. (2011). Visualisation of morphological interaction of diamond and silver nanoparticles with *Salmonella Enteritidis* and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 11(9), 7635–7641. <https://doi.org/10.1166/jnn.2011.4735>
- Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. A., Roy, S. L., Jones, J. L., &

Capítulo 6: Propiedades antimicrobianas de las matrices activas

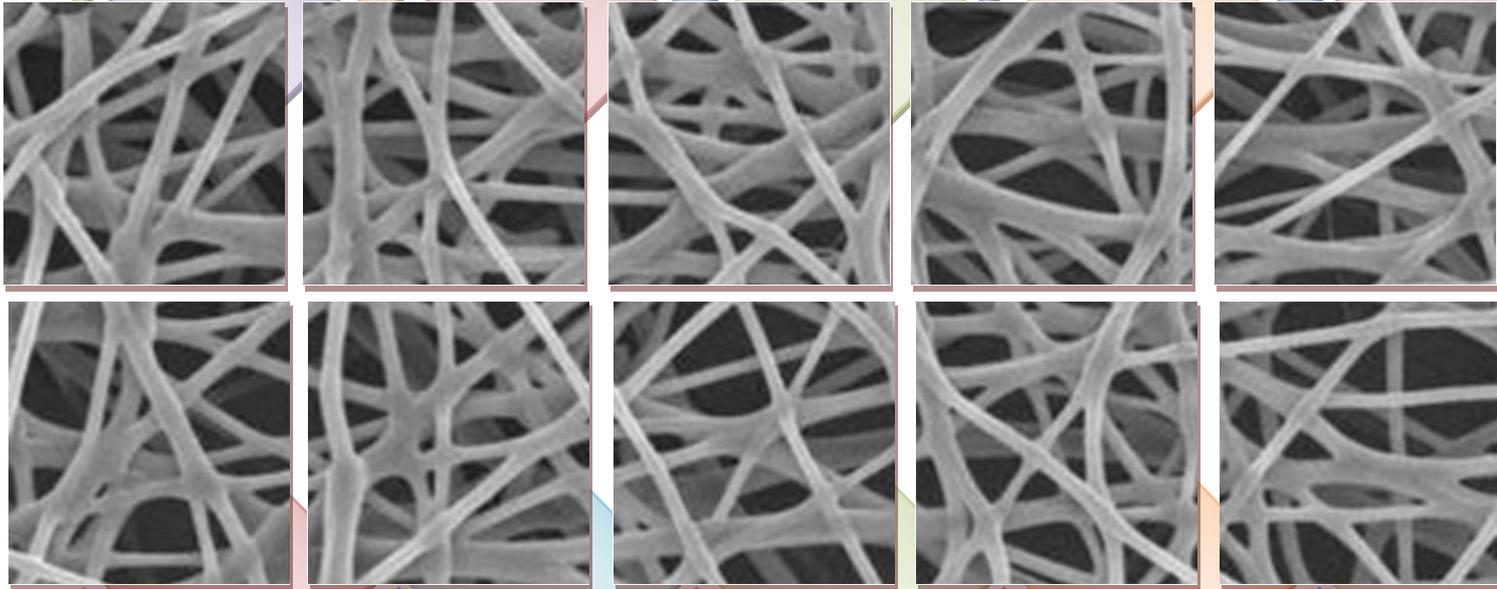
- Griffin, P. M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States-Major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17(1), 7–15. <https://doi.org/10.3201/eid1701.P11101>
- Severino, R., Ferrari, G., Vu, K. D., Donsì, F., Salmieri, S., & Lacroix, M. (2015). Antimicrobial effects of modified chitosan based coating containing nanoemulsion of essential oils, modified atmosphere packaging and gamma irradiation against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* on green beans. *Food Control*, 50, 215–222. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.08.029>
- Sharma, V. K., Yngard, R. A., & Lin, Y. (2009). Silver nanoparticles : Green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science*, 145(1–2), 83–96. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2008.09.002>
- Shi, G., Chen, W., Zhang, Y., Dai, X., Zhang, X., & Wu, Z. (2019). An Antifouling Hydrogel Containing Silver Nanoparticles for Modulating the Therapeutic Immune Response in Chronic Wound Healing. *Langmuir*, 35(5), 1837–1845. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b01834>
- Sivaranjani, V., & Philominathan, P. (2016). Synthesize of Titanium dioxide nanoparticles using *Moringa oleifera* leaves and evaluation of wound healing activity. *Wound Medicine*, 12, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.wndm.2015.11.002>
- Smetana, A. B., Klabunde, K. J., Marchin, G. R., & Sorensen, C. M. (2008). Biocidal activity of nanocrystalline silver powders and particles. *Langmuir*, 24(14), 7457–7464. <https://doi.org/10.1021/la800091y>
- Soares, R. M., Rosangela, M. D. A., Alviano, D. S., Angluster, J., Alviano, C. S., & Travassos, L. R. (2000). Identification of sialic acids on the cell surface of *Candida albicans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1474(2), 262-268. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(00\)00003-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(00)00003-9)
- Soon, R. L., Nation, R. L., Cockram, S., Moffatt, J. H., Harper, M., Adler, B., Boyce, J. D., Larson, I., & Li, J. (2011). Different surface charge of colistin-susceptible and -resistant *Acinetobacter baumannii* cells measured with zeta potential as a function of growth phase and colistin treatment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(1), 126–133. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq422>
- Stoimenov, P. K., Klinger, R. L., Marchin, G. L., & Klabunde, K. J. (2002). Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents. *Langmuir*, 18(17), 6679–6686. <https://doi.org/10.1021/la0202374>
- Sudarshan, N. R., Hoover, D. G., & Knorr, D. (1992). Antibacterial Action of Chitosan. *Food Biotechnology*, 6(3), 257–272. <https://doi.org/10.1080/08905439209549838>
- Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K., & Bigger, S. W. (n.d.). Active Packaging Technologies with an Emphasis on Antimicrobial Packaging and its Applications. *Ergodic Theory and Dynamical Systems*, 33(2), 529–548. <https://doi.org/10.1017/S014338571100109X>
- Tronchin, G., Pihet, M., Lopes-Bezerra, L. M., & Bouchara, J. P. (2008). Adherence mechanisms in human pathogenic fungi. *Sabouraudia*, 46(8), 749-772. <https://doi.org/10.1080/13693780802206435>
- Tsai, G. J., Zhang, S. L., & Shieh, P. L. (2004). Antimicrobial Activity of a Low-Molecular-Weight Chitosan Obtained from Cellulase Digestion of Chitosan. *Journal of Food Protection*, 67(2), 396–

Capítulo 6: Propiedades antimicrobianas de las matrices activas

398. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.2.396>
- Varma, A. J., Deshpande, S. V., & Kennedy, J. F. (2004). Metal complexation by chitosan and its derivatives: A review. *Carbohydrate Polymers*, 55(1), 77–93. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2003.08.005>
- Vélez-Peña, E., Pérez-Obando, J., Pais-Ospina, D., Marín-Silva, D. A., Pinotti, A., Cánneva, A., Donadelli, J. A., Damonte, L., Pizzio, L. R., Osorio-Vargas, P., & Rengifo-Herrera, J. A. (2020). Self-cleaning and antimicrobial photo-induced properties under indoor lighting irradiation of chitosan films containing Melon/TiO₂ composites. *Applied Surface Science*, 508(October), 144895. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2019.144895>
- Verlee, A., Mincke, S., & Stevens, C. V. (2017). Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 164, 268–283. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.001>
- Verma, N., & Kumar, N. (2019). Synthesis and Biomedical Applications of Copper Oxide Nanoparticles: An Expanding Horizon [Review-article]. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 5(3), 1170–1188. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.8b01092>
- Verma, P., Yuan, K., Kuwahara, Y., Mori, K., & Yamashita, H. (2018). Enhancement of plasmonic activity by Pt/Ag bimetallic nanocatalyst supported on mesoporous silica in the hydrogen production from hydrogen storage material. *Applied Catalysis B: Environmental*, 223, 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2017.05.017>
- Vermeiren, L., Devlieghere, F., & Debevere, J. (2002). Effectiveness of some recent antimicrobial packaging concepts. *Food Additives & Contaminants*, 19((S1)), 163–171. <https://doi.org/10.1080/02652030110104852>
- Vermeiren, L., Devlieghere, F., Van Beest, M., De Kruijf, N., & Debevere, J. (1999). Developments in the active packaging of foods. *Trends in Food Science and Technology*, 10(3), 77–86. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(99\)00032-1](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(99)00032-1)
- Wallace, D. J., Van Gilder, T., Shallow, S., Fiorentino, T., Segler, S. D., Smith, K. E., Shiferaw, B., Etzel, R., Garthright, W. E., & Angulo, F. J. (2000). Incidence of foodborne illnesses reported by the Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet) - 1997. *Journal of Food Protection*, 63(6), 807–809. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.6.807>
- Wang, L., Periyasami, G., Aldalbahi, A., & Fogliano, V. (2021). The antimicrobial activity of silver nanoparticles biocomposite films depends on the silver ions release behaviour. *Food Chemistry*, 359(January), 129859. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129859>
- Wang, L., Hu, C., & Shao, L. (2017). The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 1227–1249. <https://doi.org/10.2147/IJN.S121956>
- Wang, X., Du, Y., Fan, L., Liu, H., & Hu, Y. (2005). Chitosan- metal complexes as antimicrobial agent: Synthesis, characterization and Structure-activity study. *Polymer Bulletin*, 55(1–2), 105–113. <https://doi.org/10.1007/s00289-005-0414-1>
- Wenning, M., & Scherer, S. (2013). Identification of microorganisms by FTIR spectroscopy: Perspectives and limitations of the method. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(16),

Capítulo 6: Propiedades antimicrobianas de las matrices activas

- 7111–7120. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5087-3>
- WHO, W. H. O. (2015). WHO ESTIMATES OF THE GLOBAL BURDEN OF FOODBORNE DISEASES. *World Health Organization* 2015. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165_eng.pdf?sequence=1
- Wilson, W. W., Wade, M. M., Holman, S. C., & Champlin, F. R. (2001). Status of methods for assessing bacterial cell surface charge properties based on zeta potential measurements. *Journal of Microbiological Methods*, 43(3), 153–164. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00224-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00224-4)
- Xia, W., Liu, P., Zhang, J., & Chen, J. (2011). Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. *Food Hydrocolloids*, 25(2), 170–179. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.03.003>
- Yang, H., Zheng, J., Huang, C., Zhao, X., Chen, H., & Sun, Z. (2015). Effects of Combined Aqueous Chlorine Dioxide and Chitosan Coatings on Microbial Growth and Quality Maintenance of Fresh-Cut Bamboo Shoots (*Phyllostachys praecox* f. *prevernalis*.) During Storage. *Food and Bioprocess Technology*, 8(5), 1011–1019. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1463-y>
- Yang, K. C., Zheng, J. H., Chen, Y. L., Lee, K. C., & Cho, E. C. (2016). Carboxyfullerene decorated titanium dioxide nanomaterials for reactive oxygen species scavenging activities. *RSC Advances*, 6(58), 53025–53033. <https://doi.org/10.1039/c6ra09414g>
- Ye, H., Cheng, J., & Yu, K. (2019). In situ reduction of silver nanoparticles by gelatin to obtain porous silver nanoparticle/chitosan composites with enhanced antimicrobial and wound-healing activity. In *International Journal of Biological Macromolecules* (Vol. 121). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.056>
- Yuan, G., Lv, H., Tang, W., Zhang, X., & Sun, H. (2016). Effect of chitosan coating combined with pomegranate peel extract on the quality of Pacific white shrimp during iced storage. *Food Control*, 59, 818–823. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.07.011>
- Zhou, Y., Jin, C., Li, Y., & Shen, W. (2018). Dynamic behavior of metal nanoparticles for catalysis. *Nano Today*, 20, 101–120. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2018.04.005>
- Ziani, K., Fernández-Pan, I., Royo, M., & Maté, J. I. (2009). Antifungal activity of films and solutions based on chitosan against typical seed fungi. *Food Hydrocolloids*, 23(8), 2309–2314. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.06.005>



Capítulo 7

Nanoestructuras funcionalizadas electrohiladas



7.1 INTRODUCCIÓN

7.1.1 Diseño de nanoestructuras por electrohilado

El electrohilado es una técnica versátil que permite generar fibras ultrafinas con dimensiones nanométricas. En los últimos años se ha registrado un avance notable en el desarrollo de métodos de electrohilado para generar nanofibras las cuales pueden ser usadas en diversas aplicaciones (Xue y col., 2019). Se usan diferentes metodologías como el electrohilado de mezcla, de emulsión, coaxial, y de portador secundario y la inmovilización en superficie (Cornejo Bravo y col., 2016; Lamarra y col., 2020).

Existen una variedad de compuestos que se pueden someter al electrohilado para generar las nanofibras, que van desde los polímeros sintéticos hasta macromoléculas orgánicas como los polisacáridos y proteínas.

A principios de este siglo la técnica de electrohilado comenzó a recibir gran atención debido a los múltiples materiales y formulaciones usadas para la síntesis de nanofibras, incluyendo compuestos de naturaleza polimérica, biológica y cerámicos generando estructuras compuestas (Larsen y col., 2003; Li y col., 2003; Xue y col., 2019). La capacidad de electrohilar una gran variedad de materiales permite que se exploren varias aplicaciones como catálisis, eficiencia energética (diseño de equipamiento para la recolección, conversión y almacenamiento de energía), ampliando el espectro de materiales usados para estos fines ya que tradicionalmente estaba dominado por nanopartículas inorgánicas (Xue y col., 2019).

Varios polímeros sintéticos como el ácido poliláctico (PLA), el ácido poliglicólico (PGA), el alcohol polivinílico (PVA), el poliuretano (PU), la polivinilpirrolidona (PVP), el ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) y otros biopolímeros son utilizados para la generación de nanofibras (Jain y col., 2020).

Los biopolímeros son cada vez más estudiados ya que son materiales biocompatibles y biodegradables, que no tienen efectos secundarios en los sistemas biológicos (Mohan y col., 2016) pero debido a su estructura compleja, baja resistencia mecánica y rápida degradación, su uso ha sido restringido hasta el momento (Babitha y col., 2017).

Uno de los biopolímeros usados para generar nanofibras es el quitosano (Q) (Zhang y col., 2007; Sasmal y Datta, 2019; Jain y col., 2020). Otros biopolímeros naturales como el

colágeno, la gelatina y la celulosa se utilizan para producir nanofibras (Kamble y col., 2017).

El electrohilado se ha utilizado para generar nanofibras a partir de diversos tipos de materiales. Al introducir componentes a nanoescala con diferentes dimensiones y / o morfologías (por ejemplo, nanopartículas, nanoalimentos, nanocables, nanotubos y nanohojas) en soluciones de polímeros, las mezclas obtenidas también se han utilizado para electrohilar. El desarrollo del electrohilado ha permitido el diseño controlado de la estructura del material formado. Un ejemplo es la alineación ordenada de las nanofibras, característica que ha abierto más aplicaciones en sectores biomédicos (Deitzel y col., 2001; Theron y col., 2001; Dersch y col., 2003; Li y col., 2003; Xue y col., 2019).

Las nanofibras tienen diversos campos de aplicación, como administración de fármacos (Hu y col., 2014), ingeniería de tejidos (Barnes y col., 2007), ingeniería genética (Lakshmi Priya y col., 2017), remediación ambiental (filtración y adsorción de contaminantes), cosmética, entre otros (Jain y col., 2020). Estas aplicaciones se deben a sus propiedades excepcionales como alta porosidad, gran relación de área superficial/volumen, flexibilidad funcional, buena resistencia mecánica (Jain y col., 2020).

Las nanofibras permiten la liberación controlada de genes y fármacos (anticancerígenos, antimicrobianos, cardiovasculares, antibióticos, proteínas y péptidos como el ADN y el ARN al sitio específico del cuerpo (Torres-Martínez y col., 2018; Nagarajan y col., 2019) y su implementación en la ingeniería de tejidos debido a su biocompatibilidad. Las nanofibras también se pueden usar como scaffolds para el reemplazo y la regeneración de tejidos y órganos dañados mediante la incorporación de factores de crecimiento (Tiwari y Rohiwal, 2018).

El éxito de la electrohilado de una solución de polímero, así como la estructura y la morfología de las nanofibras de polímero resultantes, está determinada por un conjunto de parámetros relacionados con el polímero, el disolvente, la solución de polímero, los parámetros de procesamiento y las condiciones ambientales (Xue y col., 2017). Existen dos requisitos generales para una electrohilatura de solución exitosa: (i) peso molecular suficientemente alto para el polímero y (ii) disponibilidad de un solvente adecuado para disolver el polímero. El peso molecular de un polímero tiene un impacto importante en los comportamientos reológicos y propiedades eléctricas de la solución (Luo y col., 2012; Xue y col., 2019).

En las últimas décadas, el volumen de investigación sobre la mezcla de polímeros como PVA y PVP ha ganado interés por el diseño de nuevos biomateriales con propiedades finales a medida que son muy superiores a las de cada componente individual. Estas propiedades mejoradas resultan de la modificación de la microestructura del compuesto PVA-PVP y su manifestación está determinada por las interacciones establecidas (Abdelrazek y col., 2010). A nivel molecular, la miscibilidad de dos polímeros sólo es posible cuando se producen interacciones favorables entre sus cadenas (enlaces de hidrógeno, complejos de transferencia de carga, electrones π , iónicos o dipolos) (Teodorescu y col., 2018), determinando un mínimo de energía libre de Gibbs y entalpía negativa de la mezcla (Abdelrazek y col., 2010).

7.1.2 Principio de electrohilado

El electrohilado es una técnica simple, continua, reproducible y escalable para la producción de nanofibras que ha ganado mucha atención en los últimos años (Almetwally y col., 2018; Yadav y col., 2019).

Su principio se basa en la producción electrostática de nanofibras (Bognitzki y col., 2016). Como se ilustra en la Figura 7.1, la solución polimérica se dispone en una jeringa de alimentación la cual se ensambla con una bomba dosificadora o inyectora.

La solución del polímero sale de la jeringa en forma una gota, en contacto con un campo eléctrico generado por el alto voltaje (5–50 kV) del medio, que induce una carga sobre la superficie volviéndola altamente electrificada. Debido a este fenómeno, la gota toma forma de cono el cual es conocido como cono de Taylor. Cuando se incrementa la intensidad del voltaje, la fuerza electrostática vence la tensión superficial de la gota provocando su expulsión en forma de chorro continuo que es atraído hacia la placa colectora de metal. La distancia entre el colector y la gota varía permite que el chorro del polímero se someta a un proceso de alargamiento formando una fibra delgada.

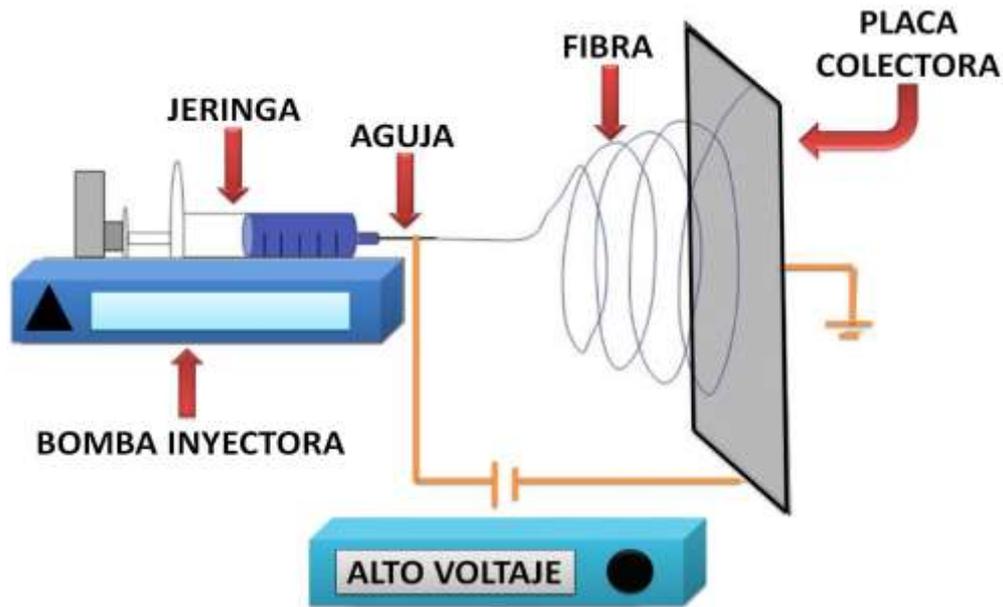


Figura 7.1. Ilustración de la técnica de electrohilado utilizada para la fabricación de nanofibras.

Simultáneamente, el disolvente se evapora generando la fibra electrohilada en el colector (Yu y col., 2009; Almetwally y col., 2018; Torres-Martinez y col., 2018; Jain y col., 2020).

Varios parámetros afectan el proceso de electrohilado y también influyen en las propiedades y características de las nanofibras. Estos parámetros incluyen el voltaje aplicado, la velocidad de alimentación de la solución, la distancia del inyector-colector, la viscosidad de la solución, la concentración, la tensión superficial, la presión de vapor del disolvente y la conductividad (Subbiah y col., 2004).

La generación de las nanofibras electrohiladas puede llevarse a cabo por medio de diferentes ajustes experimentales como la forma de dosificación del polímero y la forma del colector, generando la posibilidad de controlar la composición, orientación, forma y composición de la fibra.

7.1.3 Variaciones experimentales

Composición de la fibra

En la [Figura 7.2](#) se puede distinguir variantes de la técnica convencional de electrospinning para generar diferentes tipos de nanofibras según la composición.

Se usan diferentes metodologías como el electrohilado de mezcla de fibras en línea o biocomponentes para combinar polímeros sintéticos y naturales ([Goonoo y col., 2014](#); [Prasady col., 2015](#); [Madhavan y col., 2018](#)), de emulsión ([García-Moreno y col., 2016](#); [Lamarra y col., 2020](#)), coaxial ([Li y col., 2004](#); [Wang y col., 2012](#)).

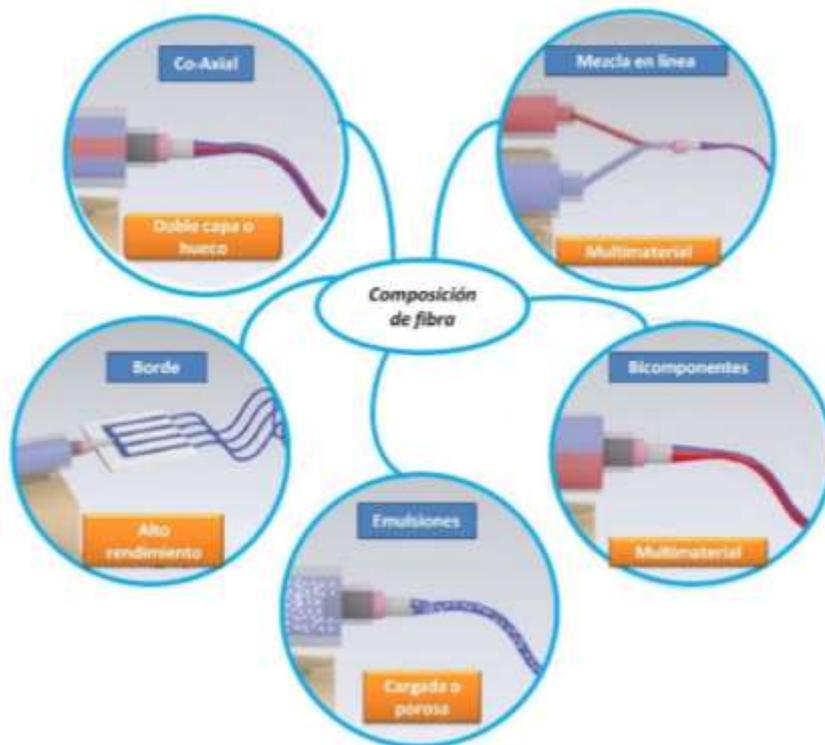


Figura 7.2. Esquemas de los métodos de electrohilado para alterar la composición de la fibra. Adaptado de [Kishan y Cosgriff-Hernandez \(2017\)](#).

Orientación de la fibra

Según se puede observar en la [Figura 7.3](#) existen varias metodologías para generar diferentes fibras según la orientación.

Existen diferentes arreglos para lograr la orientación de la fibra, uso de un colector giratorio ([Kim y col., 2004](#); [Pan y col., 2006](#)), *electrospinning* magnético ([Yang y col., 2007](#);

Orr y col., 2015), usando patrones con forma controlable y configuración en 3D como tubos interconectados, formas rizadas u onduladas (Sun y col., 2013).

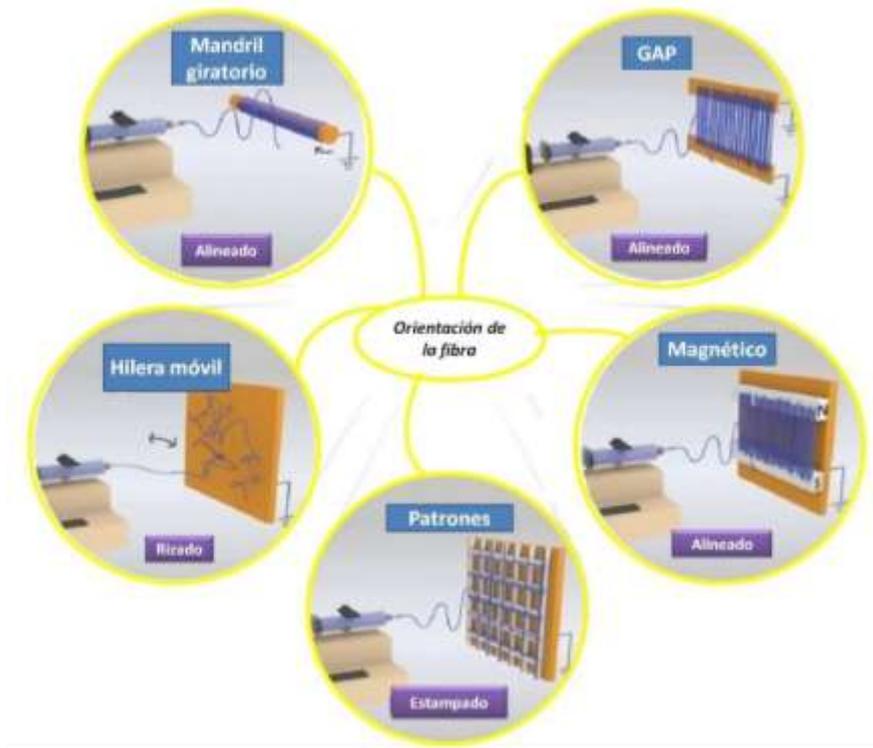
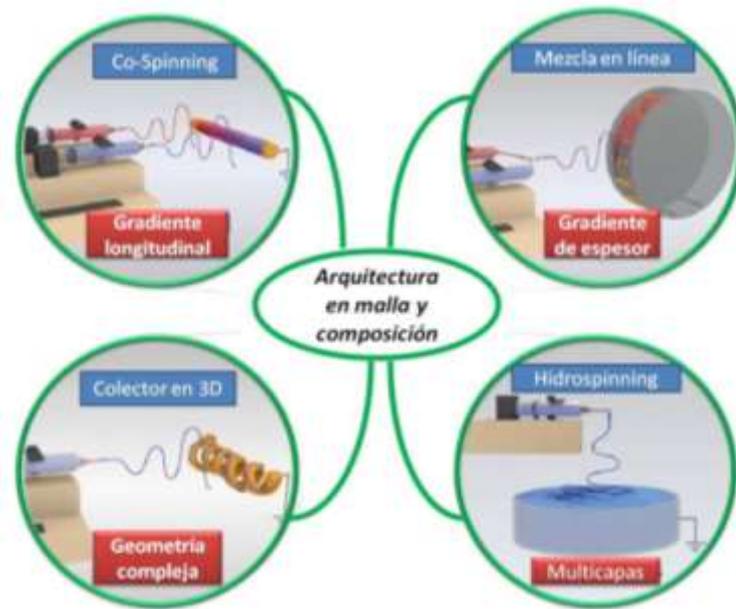


Figura 7.3. Esquemas de los métodos de electrohilado para dirigir la orientación de la fibra. Adaptado de Kishan y Cosgriff-Hernandez (2017).

Según la **Figura 7.4** se puede distinguir varias metodologías para generar diferentes fibras según la arquitectura en malla y composición, estas son:



7.4. Esquema de los métodos de electrohilado para controlar la forma y composición de mallas. Adaptado de Kishan y Cosgriff-Hernandez (2017).

El *coelectrospinning* combina las propiedades deseables de dos polímeros (Zhang y col., 2005; Zander y col., 2013); en el *hidrospinning* se conecta a tierra el baño de agua y las fibras se dirigen hacia la superficie (Kim y col., 2006; Teo y col., 2007); el *electrospinning* 3D convierte las mallas electrohiladas en estructuras 3D, como tubos o pilas de capas múltiples (Chang y col., 2016; Walser y col., 2016).

7.2 OBJETIVOS

7.2.2 Objetivos generales

Diseñar nanofibras funcionalizadas con nanopartículas de cobre mediante la técnica de electrohilado. Obtener sistemas bicapa combinando la malla electrohilada con películas a base de quitosano.

7.2.3 Objetivos específicos

- Evaluar el comportamiento reológico de mezclas de soluciones de PVA, PVP con y sin la incorporación de nanopartículas de cobre
- Obtener nanoestructuras fibrosas mediante la técnica de electrohilado a partir de soluciones con diferente concentración de PVA, PVP y sus mezclas entrecruzadas y funcionalizadas con nanopartículas de cobre
- Crear sistemas bicapas compuestos por: (i) nanofibras de polímeros (PVA, PVP) y nanopartículas metálicas de cobre y (ii) una película de quitosano con presencia de nanopartículas de plata
- Caracterizar la morfología de los materiales obtenidos por microscopía electrónica de barrido SEM
- Estudiar el comportamiento térmico, las propiedades microestructurales así como la capacidad antimicrobiana de las nanoestructuras formadas
- Aplicar la matriz fibrosa PVA-PVPCu como medio filtrante para retener material particulado

7.3 MATERIALES Y MÉTODOS

7.3.1 Materiales

Para la formulación de los sistemas, se utilizó alcohol polivinílico (PVA) Elvanol T-25 proporcionado por DuPont (USA) con un grado de hidrólisis entre 86-89 % y un peso molecular de 50 a 55 kDa. Asimismo, se usó poli(vinilpirrolidona)(PVP) (marca) y quitosano (Q) comercial distribuido por Parafarm (Buenos Aires, Argentina) en forma de polvo. El ácido acético fue adquirido a Anedra (Buenos Aires, Argentina). Para la síntesis de las nanopartículas de plata y cobre se emplearon los reactivos detallados en el **Capítulo 2** y **3**. En todos los ensayos se utilizó agua de calidad milli-Q.

7.3.2 Métodos

Formulación de las soluciones

La solución de poli(vinilpirrolidona) (PVP) se preparó con una concentración del 8% (p/v) por solubilización en agua Milli-Q bajo agitación magnética constante a temperatura ambiente durante 1 h. Por otra parte, la solución de PVA se disolvió hasta una concentración del 14% (p/v) en agua Milli-Q bajo agitación magnética constante a una temperatura de 95°C durante 6 h. El quitosano se usó al 1% (p/v) por solubilización en ácido acético 1%. Para la obtención de las nanopartículas de Ag y Cu en solución se siguió el protocolo del **Capítulo 2** y **3**, respectivamente.

Formación de fibras por electrohilado

El equipo experimental utilizado en el presente trabajo de Tesis consta básicamente de: i) un reservorio de solución polimérica (PVA o sus mezclas con PVP y agregado de NpCu), ii) una fuente de alta tensión (1-30 kV), iii) una bomba de infusión a jeringa PC11UB APEMA (Argentina) que permite dosificar un flujo de solución polimérica entre 0.3 y 1 ml h⁻¹, y iv) un colector metálico. La [Figura 7.5](#) muestra los componentes del sistema que constituyen la base del equipo de construcción casera de disposición horizontal empleado para los procesos electrodinámicos. En base a ensayos previos se escogió un voltaje de 24kV, un flujo de 0.4 ml/h y una distancia placa colectora-aguja de 27 cm y una distancia entre los electrodos de 29 cm. Las jeringas usadas fueron de 20 ml, las agujas fueron de acero inoxidable con un diámetro interior de 0.4 mm y el metal del colector estático plano fue acero inoxidable.

Capítulo 7: Nanoestructuras funcionalizadas electrohiladas

Las nanofibras se depositaron en el colector durante 12 horas aproximadamente hasta la obtención de una película con un espesor capaz de desmoldarse de la superficie de contacto. En el esquema de la [Figura 7.6](#) se muestra la deposición de las fibras directamente sobre el electrodo o sobre una película QAg_2 para formar un sistema bicapa.



Figura 7.5. Dispositivo experimental mostrando la fuente de alta tensión, la bomba infusora y la placa colectora utilizada para producir fibras mediante el proceso de electrohilado.

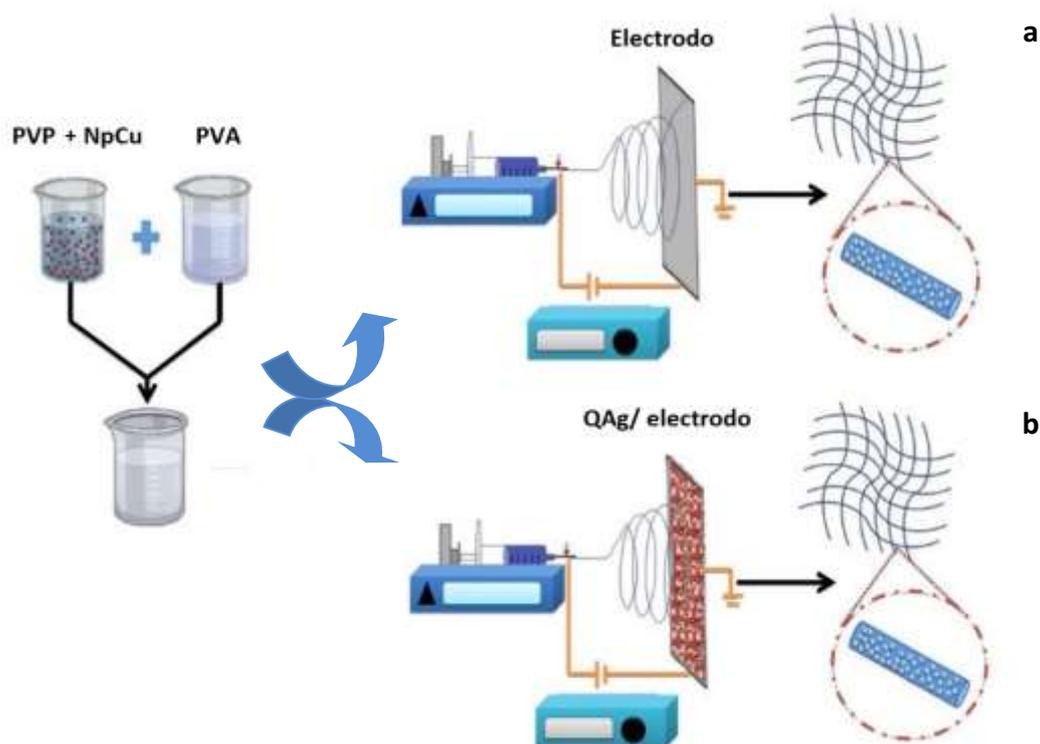


Figura 7.6. Esquema representativo de obtención de matrices fibrosas PVA-PVP y PVA-PVPCu directamente sobre el electrodo **(a)** o sobre una película QAg ubicada sobre el electrodo para formar un sistema bicapa QAg+PVA-PVPCu **(b)**.

Comportamiento reológico y conductividad

El estudio de la reología tiene gran importancia en diversas áreas, entre las que se incluyen la cosmética y la alimenticia. Como es bien conocido, la reología es la ciencia de la deformación y flujo de la materia bajo condiciones controladas de ensayo (Demir y col., 2002; McKee y col., 2004; Son y col., 2004; Ki y col., 2005; Haghi y Akbari, 2007; Rosas, 2008). En este contexto, la velocidad a la cual se deforma el material (*shear rate*) se representa por $\dot{\gamma}$ y la resistencia a fluir que este hace es representada mediante el esfuerzo de corte τ (*shear stress*).

La viscosidad de las suspensiones preparadas se midió mediante un reómetro Haake Rheo Stress 600 (Alemania) con una geometría plato-plato de superficies rugosas y una separación entre platos de 1 mm a 25°C. La viscosidad en estado estacionario se midió en un rango de velocidad de corte de 1 a 550 s⁻¹.

A partir de los ensayos rotacionales se obtuvieron las curvas de flujo de esfuerzo de corte en función de la velocidad de deformación. El comportamiento reológico se ajustó matemáticamente utilizando el modelo de Ostwald de Waele

$$\tau = k \dot{\gamma}^n$$

donde,

τ es el esfuerzo de corte, k el índice de consistencia de flujo, $\dot{\gamma}$ la velocidad de deformación y n el índice de comportamiento de flujo.

Las conductividades eléctricas de las soluciones de PVP 8%, PVA 14% y la mezcla 75:25 de PVA y PVP con y sin presencia de NpCu se midieron con un conductímetro y pHmetro Mettler Toledo con accesorio (sonda de conductividad Inlab 741) a temperatura ambiente.

Formulación de las soluciones para la bicapa

El sistema bicapa se formó llevando a cabo el proceso de electrohilado sobre una película preformada QAg (ya descrita en el **Capítulo 2**) ubicada sobre el electrodo de acero inoxidable. La formación de la matriz electrohilada se realizó usando soluciones mezcla de PVA-PVP en proporción 75:25, ó de PVA-PVPCu por incorporación de NpCu. En este último caso se usó una solución de PVP 8% y NpCu₂.

Caracterización de la morfología y tamaño de las fibras

El análisis morfológico de las nanofibras y la determinación de la distribución de los diámetros se realizó a través micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido SEM. El diámetro de las fibras fue calculado mediante el uso del programa Fiji (Image J).

Caracterización de las nanoestructuras obtenidas

Se determinaron las propiedades fisicoquímicas relacionadas con la afinidad por el agua (contenido de humedad, solubilidad, hinchamiento y permeabilidad al vapor de agua) siguiendo las técnicas ya descritas en capítulos previos.

Asimismo, el comportamiento térmico se analizó por TGA. Desde el punto de vista estructural, se realizaron estudios por ATR-FTIR, además de examinar las diferencias observadas luego de la incorporación de las nanopartículas de cobre y la formación del sistema bicapa QAg₂+PVA-PVPCu₂.

Microscopía de barrido SEM

La microscopía de barrido SEM se llevó a cabo con el equipo SEM FEI QUANTA 200 (Holanda). Las muestras se montaron sobre los tacos de bronce con cinta de carbono doble faz y se aplicó un recubrimiento de oro. Luego las muestras metalizadas se observaron bajo alto vacío y se realizó el análisis de la composición usando un EDS.

Tratamientos térmicos

Para la aplicación de las matrices electrohiladas PVA-PVPCu₂ como filtros para el análisis de material particulado, las mismas se sometieron a un tratamiento térmico en estufa a una temperatura de 120°C durante 1h.

7.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.4.1 Comportamiento reológico y conductividad de las soluciones

Como es sabido, la viscosidad de una solución polimérica está fuertemente influenciada por su concentración. Hay cuatro regímenes de concentración diferentes para las soluciones de polímeros: (i) diluido, (ii) semidiluido no entrelazado, (iii) semidiluido entrelazado y (iv) concentrado.

La transición entre diluido y semidiluido entrelazado se produce a una concentración conocida como concentración de solapamiento C^* . En esta concentración, las cadenas individuales, que fueron separados por moléculas de disolvente en el régimen diluido, comienzan a superponerse entre sí, pero aún permanecen en gran medida desenredadas (Tiwari y Venkatraman, 2012).

Cuando la concentración se incrementa aún más, se produce el entrecruzamiento de las cadenas. Este fenómeno crucial para la formación de fibra hace que la concentración, y consecuentemente la viscosidad sea un parámetro fundamental para el proceso de electrohilado. La transición entre regímenes semidiluidos no entrelazados y semidiluidos se conoce como concentración de entrelazamiento (C_e). Se cree que se requiere una concentración C_e antes de obtener un *electrospinning* estable, con producción de fibras uniformes sin cuentas o perlas (Gupta y col., 2005). En el caso de las soluciones empleadas en *electrospinning*, para valores muy bajos de viscosidad no se observa formación continua de fibras, mientras que, por el contrario, para valores muy elevados, se encuentra dificultad en la proyección del cono. Se desprende el importante papel que desempeña la viscosidad en la determinación de un rango de concentraciones apropiado con el que se puedan obtener fibras de forma continua.

En la [Figura 7.7](#) se observan las curvas del comportamiento de flujo de las soluciones poliméricas ensayadas PVA 14%, PVP 8% y sus mezclas PVA-PVP y PVA-PVPCu₂ obtenidas de los ensayos rotacionales.

El comportamiento reológico se ajustó con el modelo del modelo de Ostwald de Waele, obteniéndose el índice de consistencia k y el índice de comportamiento de flujo, o empleando el modelo de Newton dependiendo de las soluciones.

Solo la solución de PVP 8% presentó un comportamiento estrictamente newtoniano con $n=1$. La solución de PVA 14% tuvo un comportamiento pseudoplástico con $n=0.71$ y las mezclas mostraron valores cercanos a 1.

En el caso del sistema PVA-PVPCu₂, el comportamiento reológico se tornó más newtoniano y la viscosidad también se redujo ligeramente ($p>0.05$) después de añadir NpCu₂ en comparación con el sistema PVA-PVP. Según [Huang y col. \(2016\)](#) esto podría deberse a que iones cobre destruyen algunos de los enlaces de hidrógeno entre el PVA y el PVP ya que por tener grupos funcionales similares pueden entrecruzarse fácilmente.

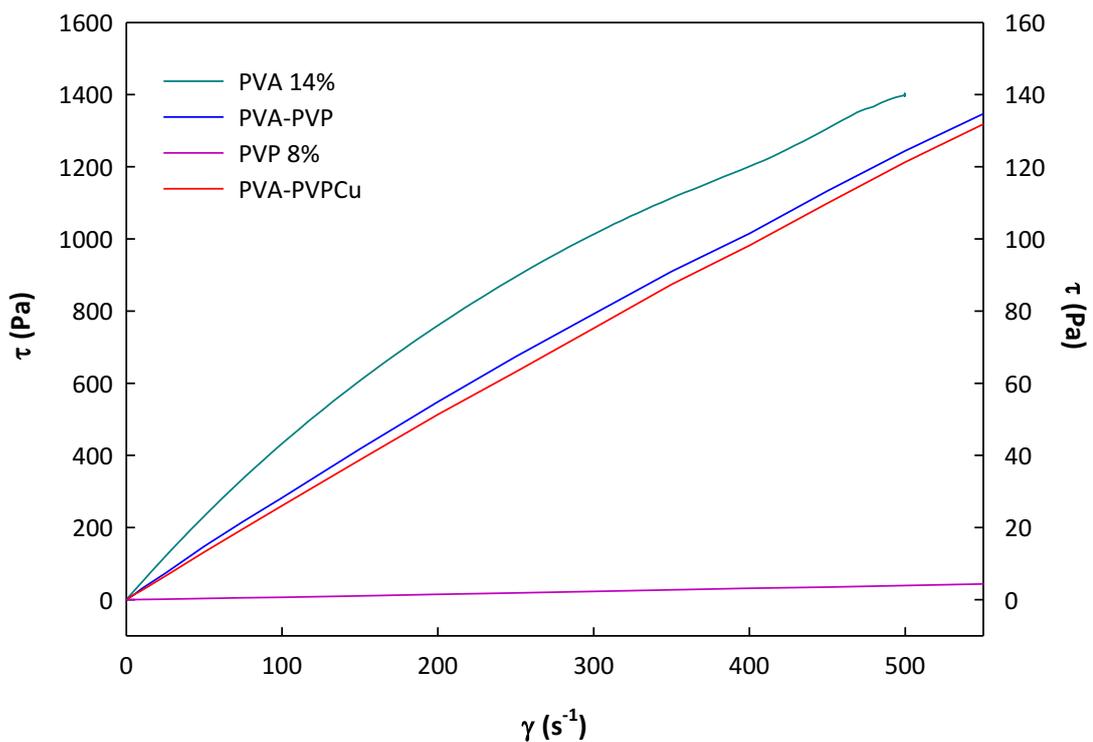


Figura 7.7. Comportamiento de flujo de las soluciones poliméricas ensayadas. Esfuerzo de corte en función de la velocidad de deformación para las soluciones de PVA 14%, PVP 8% y las mezclas PVA-PVP y PVA-PVPCu₂.

Los resultados indicarían que la combinación de la mezcla con NpCu puede ayudar a ajustar el comportamiento reológico de los sistemas de electrohilado según las necesidades a satisfacer.

El valor informado de viscosidad se correspondió con una velocidad de 500 s⁻¹. La viscosidad de la mezcla con agregado de nanopartículas de Cu no presentó diferencias significativas ($p<0.05$) con la de la mezcla pura.

Asimismo, la conductividad de la solución desempeña un papel clave en el proceso de *electrospinning*, ya que la solución de polímero viscoso se estira debido a la repulsión de las cargas presentes en su superficie y cuando la conductividad es más alta se pueden transportar más cargas (Huang y col., 2016; Shankhwar y col., 2016).

La conductividad eléctrica de la mezcla PVA-PVP presentó un valor más cercano al del PVA. Sin embargo, la adición de NpCu incrementó significativamente este valor debido a la excelente conductividad eléctrica del Cu.

Huang y col. (2016) encontraron un comportamiento similar trabajando con PVP con la adición de nanopartículas de plata.

Tabla 7.1. Parámetros de ajuste de los modelos reológicos, viscosidad aparente calculada a 500 s⁻¹ y conductividad de las suspensiones filmogénicas.

Formulación	Parámetros reológicos				Conductividad ($\mu\text{S cm}^{-1}$)
	k	n_v	η (mPa.s)	R ²	
PVA 14%	17.04 ^c	0.71 ^a	2380.0 ^c	0.997	882.0 ^c
PVP 8%	0.005 ^a	1.07 ^c	7.91 ^a	0.999	74.3 ^a
Q 1%	0.08 ^{a,b}	0.79 ^a	22.7 ^a	0.997	2450.0 ^e
PVA-PVP	0.45 ^b	0.90 ^b	248.8 ^b	0.999	662.0 ^b
PVA-PVPCu ₂	0.34 ^{a,b}	0.94 ^b	246.4 ^b	0.999	1080.0 ^d

Los valores informados corresponden a la rampa ascendente de la curva de comportamiento de flujo.

^aLetras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$).

7.4.2 Propiedades relacionadas con la afinidad por el agua

En la [Tabla 7.2](#) se muestran la permeabilidad al vapor de agua, solubilidad y la humedad de las matrices electrohiladas. Las WVP fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) que para las películas obtenidas por moldeo. Estos resultados se debieron a la formación de la estructura porosa inherente a la técnica de electrohilado con el consecuente aumento en la transferencia de materia. Considerando los valores de humedad, la combinación de PVA con PVP llevó a una disminución significativa ($p < 0.05$) de esta variable.

Tabla 7.2. Determinación de las propiedades relacionadas con la afinidad por el agua: permeabilidad al vapor de agua, solubilidad y humedad de las matrices electrohiladas.

Muestra	Espesor (μm)	WVP $10^{10}(\text{g s}^{-1} \text{m}^{-1}\text{Pa}^{-1})$	Humedad %	Solubilidad %
PVA	130.8	6.4 (0.3) ^a	11.0 (0.5) ^b	n.d.
PVA-PVP	133.8	3.7 (0.5) ^b	6.1 (0.4) ^a	82.3 (7.1) ^c
PVA-PVPCu ₂	139.0	4.1 (0.6) ^b	8.7 (1.4) ^{a,b}	30.5 (1.2) ^b
QAg ₂ +PVA-PVP	171.8	4.2 (0.8) ^{a,b}	9.1 (0.2) ^b	n.d.
QAg ₂ +PVA-PVPCu ₂	183.8	4.3 (0.7) ^b	8.6 (0.8) ^{a,b}	21.1 (1.1) ^a

^aLetras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$).

7.4.3 Análisis microestructural por SEM

Las micrografías SEM de las membranas de PVA y compuestas obtenidas por electrohilado que se muestran en la [Figura 7.8](#) indican la formación de una red fibrosa homogénea e interconectada sin presencia de cuentas o perlas.

Muestra	Frecuencia mayor (%)	Tamaño (nm)*
PVA-PVPCu ₂	30	149-193 (15)
PVA-PVP	30	162-275 (11)
PVA	30	155-192 (12)

*Desviación estándar entre paréntesis

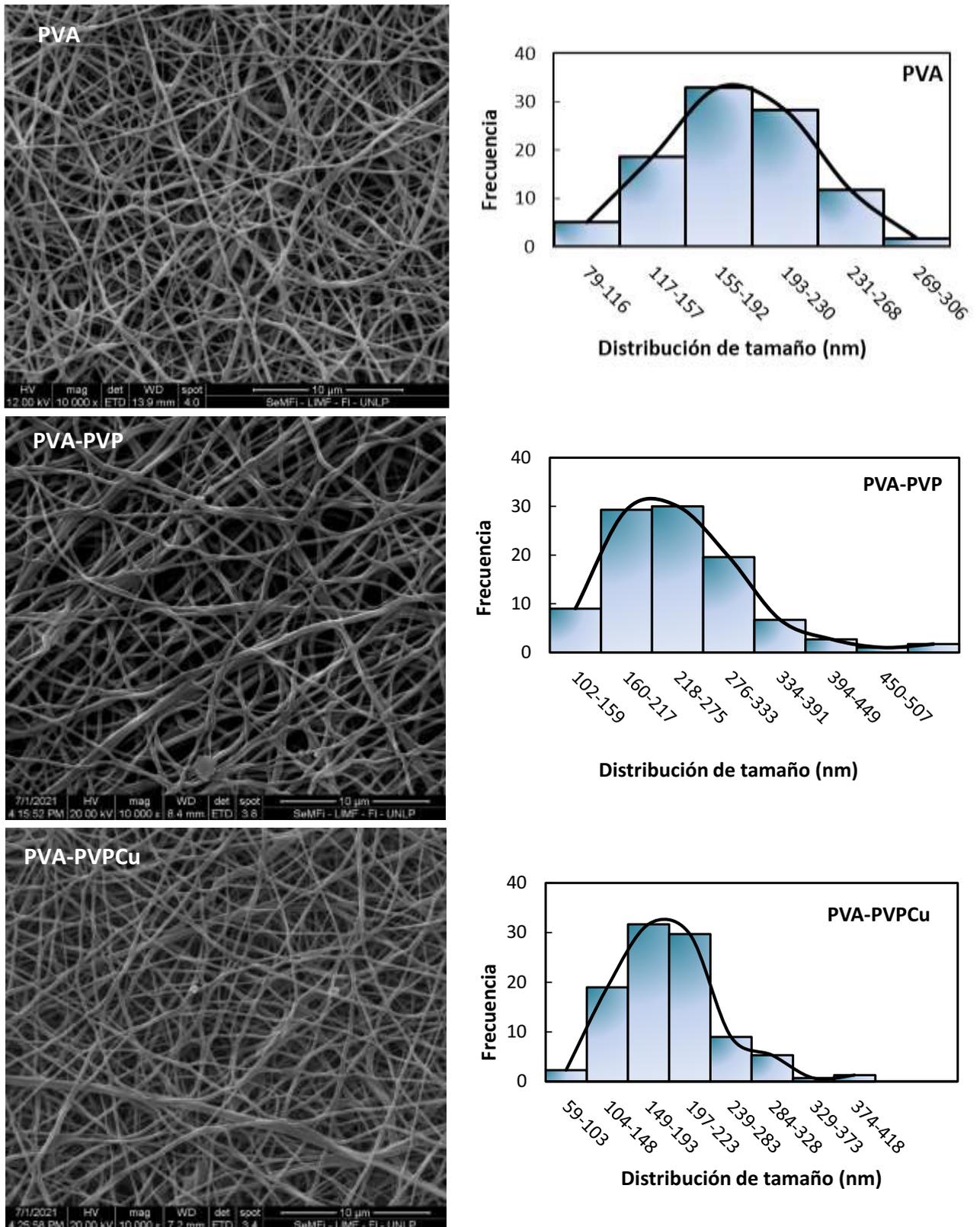


Figura 7.8. Micrografía obtenida por SEM de mallas poliméricas electrohiladas a partir de soluciones de: (a) PVA, (b) PVA-PVP y (c) PVA-PVPCu₂ y sus respectivos histogramas mostrando el diámetro de las fibras.

Se muestran también los histogramas con las distribuciones de diámetros de fibras. La muestra de PVA presentó una distribución de tamaño de fibra centrada alrededor de 172 nm. La inclusión del PVP en el sistema ocasionó un incremento en la población de fibras con diámetros mayores que 246 nm mientras la proporción de tamaños de 188 nm fue del 88%.

Asimismo, la inclusión de nanopartículas de cobre en la solución de PVA-PVP disminuyó el diámetro de las fibras llevando el centro de la distribución a 175 nm para la matriz electrohilada PVA-PVPCu₂.

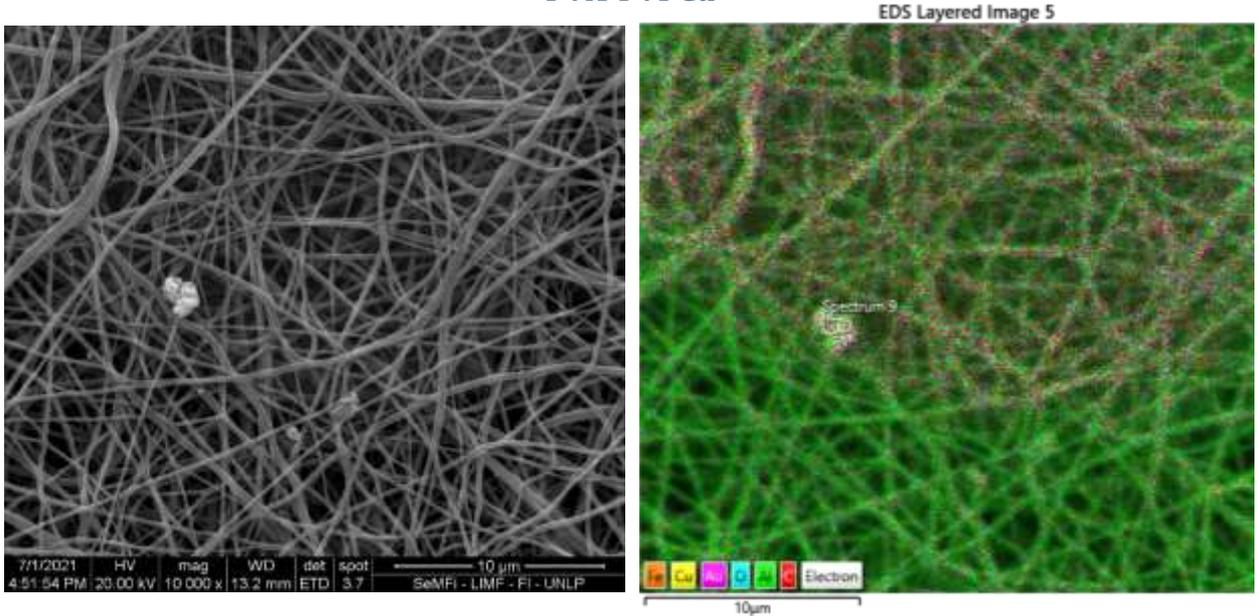
Según [Shankhwar y col. \(2016\)](#) el aumento en la conductividad de la solución estira las fibras y tiende a producir diámetros más estrechos. Estos resultados se correlacionan con los valores de conductividad de la [Tabla 7.1](#).

En la micrografía de la [Figura 7.9](#) se exhibe la malla fibrosa correspondiente a la mezcla PVA-PVP cargada con nanopartículas donde se observan las NpCu adheridas a las fibras. El análisis EDS confirmó la presencia de Cu.

Por otra parte, la micrografía SEM del sistema bicapa (NpCu y NpAg) exhibió la presencia de fibras formando la capa superior pero debido a que el análisis EDS se realizó en la zona demarcada correspondiente a la sección transversal solo se detectó la presencia de Ag ([Figura 7.10](#)). En la [Figura 7.11](#) se exhibe la micrografía tomada desde el lado de la malla fibrosa (PVA-PVPCu₂). Debido a la porosidad de la misma también se detectó la presencia de Ag proveniente de la capa ubicada detrás (QAg₂).

Un análisis similar pudo realizarse para la siguiente micrografía expuesta ([Figura 7.12](#)) donde el mapeo mostró una distribución homogénea tanto de Ag como de Cu.

PVA-PVPCu



Espectro			
Elemento	Tipo de línea	Peso %	Atómico %
C	K series	52.35	70.86
Al	K series	25.01	15.07
Fe	K series	0.14	0.04
Au	M series	8.40	0.69
O	K series	12.79	13.00
Cu	K series	1.30	0.33
Total		100.00	100.00

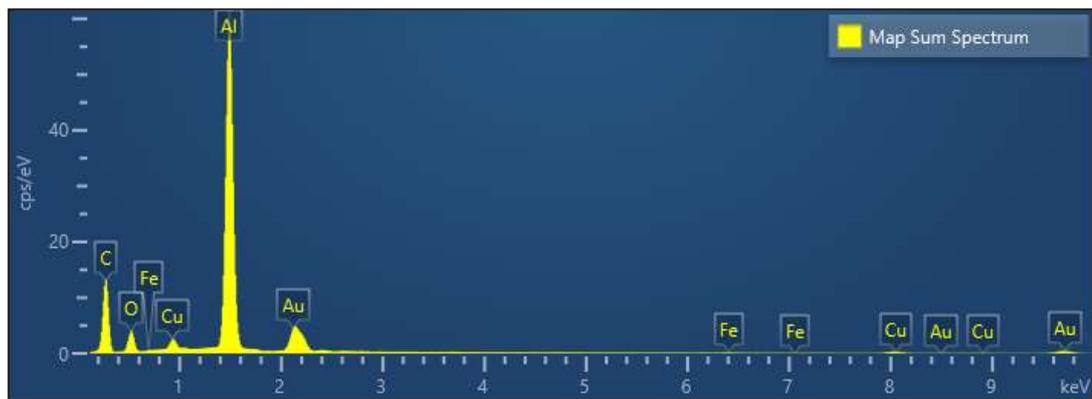
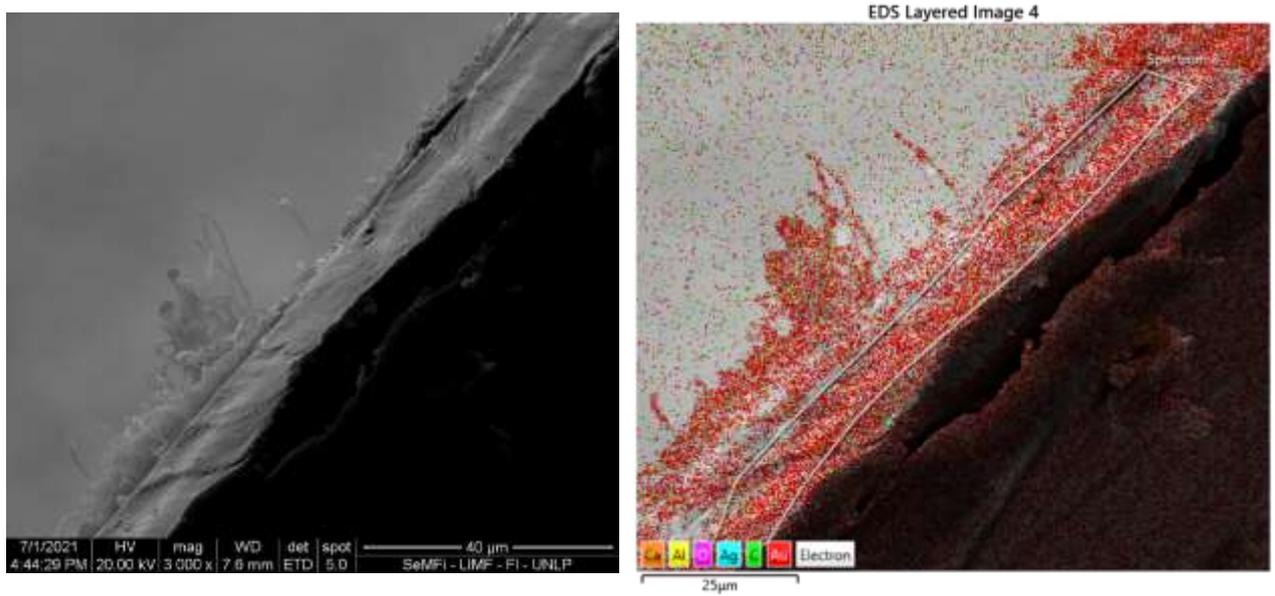


Figura 7.9. Micrografías obtenidas por SEM mostrando la malla de fibras del nanocompuesto PVA-PVPCu. La escala se muestra en la micrografía. El espectro EDS y la Tabla correspondiente demuestran la presencia de Cu.

BICAPA: QAg+PVA-PVP



Espectro

Elemento	Tipo de línea	Peso %	Atómico %
Au	M series	85.50	31.50
C	K series	8.94	54.01
Al	K series	0.88	2.36
Ag	L series	2.36	1.59
O	K series	2.32	10.54
Total		100.00	100.00

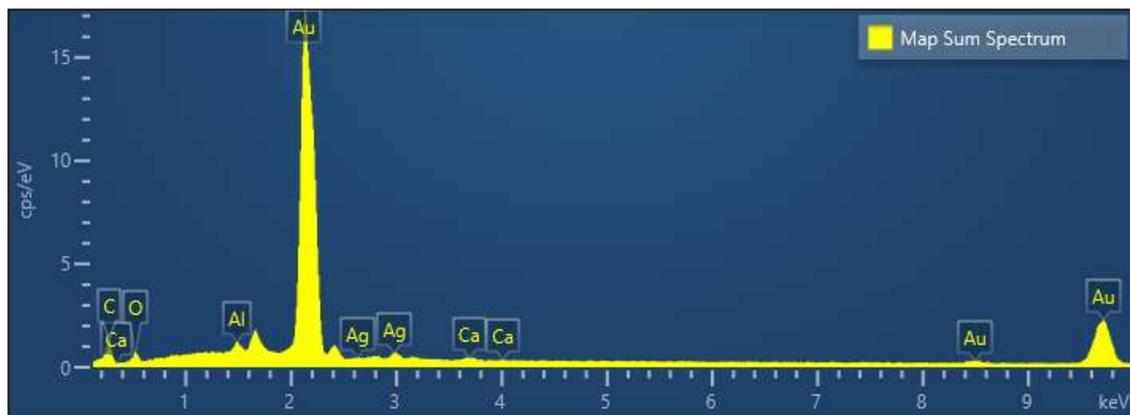
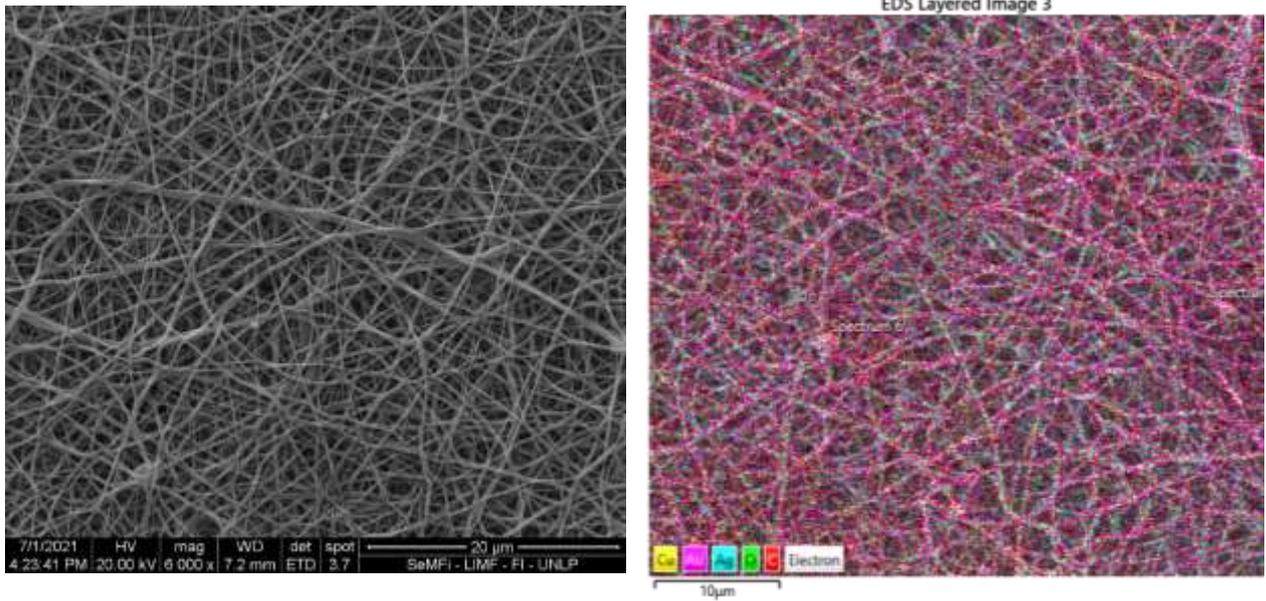


Figura 7.9. Micrografías obtenidas por SEM mostrando un corte transversal del sistema bicapa constituido por la malla de fibras del nanocompuesto PVA-PVP depositada sobre la película QAg₂. La escala se muestra en la micrografía. El espectro EDS y la Tabla corresponden a la película QAg y muestran la presencia de Ag.

BICAPA: QAg+PVA-PVPCu



Espectro			
Elemento	Tipo de línea	Peso %	Atómico %
C	K series	52.46	78.86
O	K series	15.79	17.82
Au	M series	27.19	2.49
Ag	L series	4.07	0.68
Cu	K series	0.49	0.14
Total		100.00	100.00

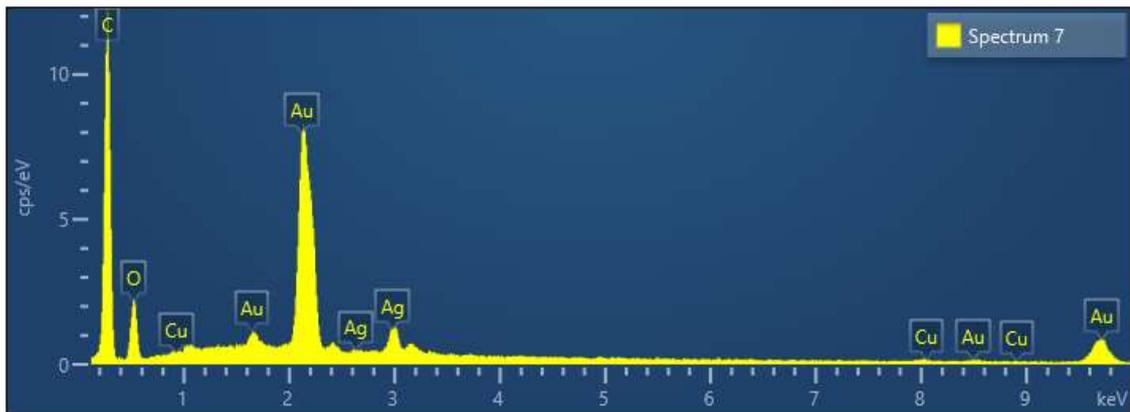


Figura 7.10. Micrografías obtenidas por SEM mostrando el sistema bicapa constituido por la malla de fibras del nanocompuesto PVA-PVPCu depositada sobre la película QAg. La escala se muestra en la micrografía. El espectro EDS y la Tabla corresponden a la superficie vista desde la estructura porosa y llegando a la capa QAg.

BICAPA: QAg+PVA-PVPCu

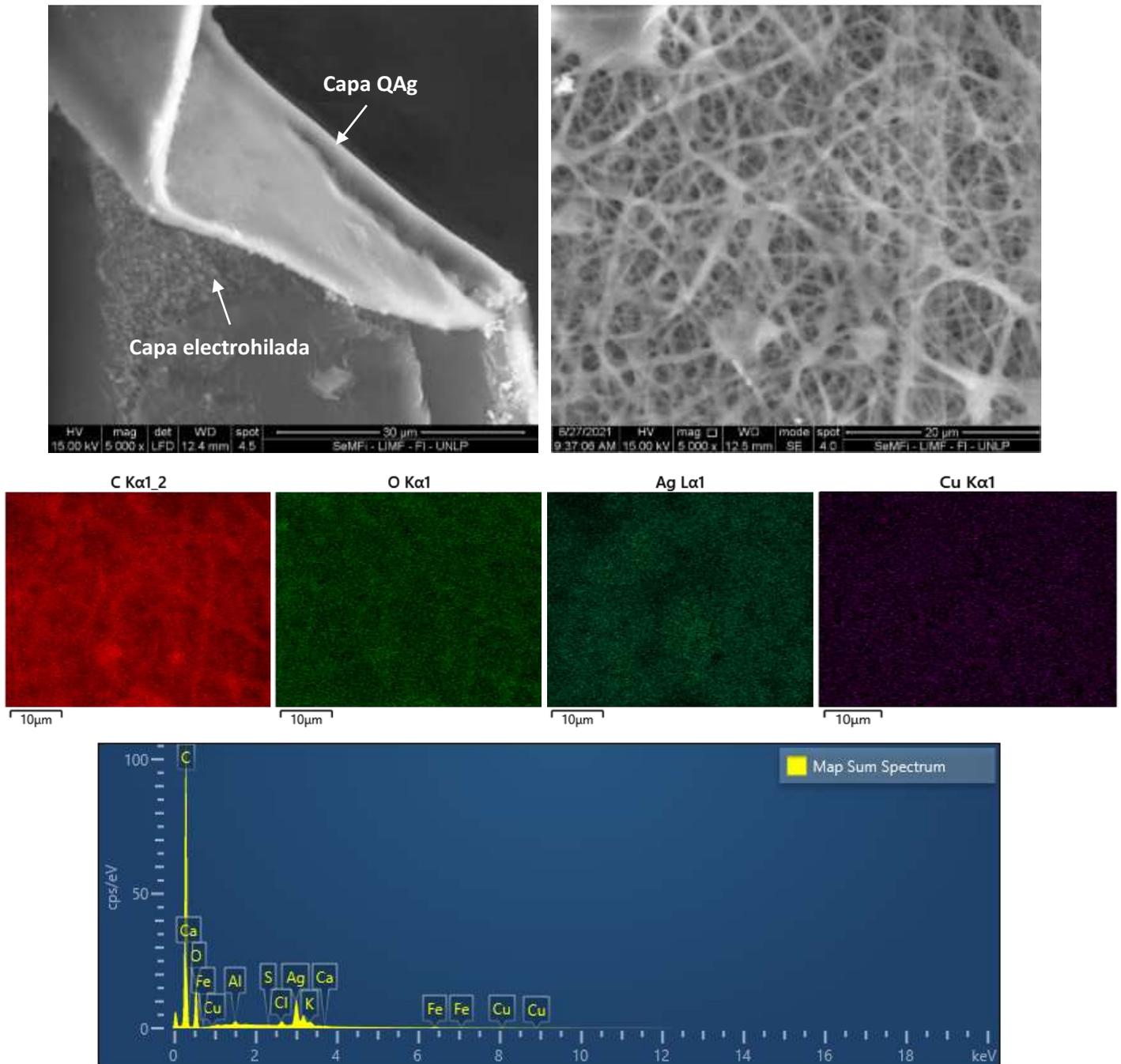


Figura 7.11. Micrografías obtenidas por SEM mostrando el sistema bicapa constituido por la malla de fibras del nanocompuesto PVA-PVPCu depositada sobre la película QAg. La escala se muestra en la micrografía. El espectro EDS corresponde a la superficie vista desde la película obtenida por moldeo QAg a través de un corte criogénico.

7.4.4 Análisis térmico por DSC

En la [Tabla 7.3](#) y en la [Figura 7.12](#) se muestran los valores de temperatura de transición vítrea de las matrices electrohiladas PVA-PVPCu sin y con a tratamiento térmico a 120°C durante 1 h. A su vez, se exhiben a efectos comparativos las T_g de la matriz de PVA obtenida por electrospinning, del PVP en polvo y de la película PVPCu obtenida por moldeo.

En las matrices electrohiladas se observaron tres T_g que corresponderían a la fase más rica en PVA y las ubicadas a mayor temperatura a la fase rica en PVP y NpCu.

El tratamiento térmico, si bien modificó las propiedades relacionadas con la resistencia al agua como se presenta en la Sección *Tratamiento térmico de las matrices electrohiladas (filtros)*, no produjo cambios significativos en el patrón de las curvas de flujo de calor de las matrices, y la ubicación de las temperaturas de pico resultaron casi idénticas.

Tabla 7.3. Temperaturas de transición vítrea (T_g) de las muestras PVA-PVPCu electrohiladas sin y con tratamiento térmico a 120°C durante 1 h así como las del PVA electrohilado, PVP en polvo y PVPCu obtenida por moldeo.

Obtención	Muestra	$T_{g1}(^{\circ}\text{C})$	$T_{g2}(^{\circ}\text{C})$	$T_{g3}(^{\circ}\text{C})$
Electrohilado	PVA	78.0	107.6	-
	PVA-PVPCu	74.6	118.3	205.0
	PVA-PVPCu 120°C	66.7	136.3	219.7
Polvo	PVP	-	107.6	193.7
Moldeo	PVPCu	-	102.4	182.2

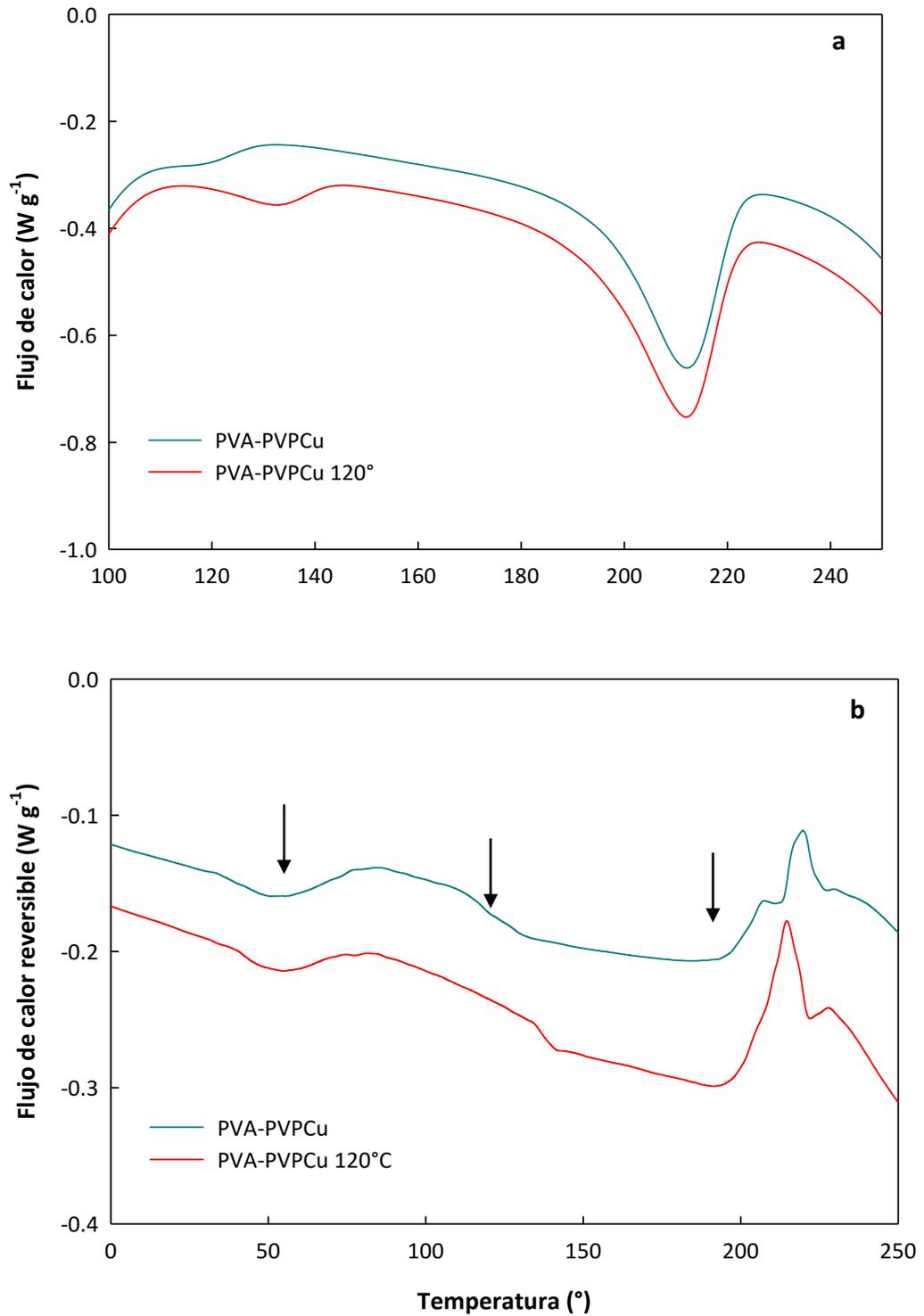


Figura 7.12. Curvas de flujo de calor obtenidas por DSC de matrices electrohiladas PVA-PVP y PVA-PVPCu₂ (a) y flujo de calor reversible obtenidas por MDSC donde se señalan las T_g s (b).

7.4.5 DRX: análisis y deconvolución

En la [Figura 7.13](#) se muestran los patrones de difracción de rayos X de las muestras de PVA y PVA-PVP sin y con NpCu obtenidas por electrohilado.

El PVA presentó un pico agudo de difracción cristalina a $2\theta = 19.4^\circ$ ([Figura 7.13](#)) asociado al plano (101) de la estructura semicristalina del PVA debido a las fuertes interacciones de tipo puente de hidrógeno establecidas entre las cadenas poliméricas ([Jaipakdee y col., 2018](#)). El procesamiento del polímero por electrohilado disminuyó la intensidad del pico de difracción, fenómeno que se correlacionó con la disminución en la cristalinidad del polímero ([Qin y col., 2008](#)). Una tendencia similar fue observada por [Basha y col. \(2017\)](#) quienes detectaron una reducción significativa de la cristalinidad en matrices de PVA como consecuencia del procesamiento por electrohilado ([Tabla 7.4](#)). Estos autores afirman que la disminución del grado de cristalinidad del polímero representa una ventaja para aplicaciones biomédicas. La misma tendencia siguieron los resultados informados por [Enayati y col. \(2016\)](#) en relación a una reducción de la cristalinidad después del proceso de electrohilado.

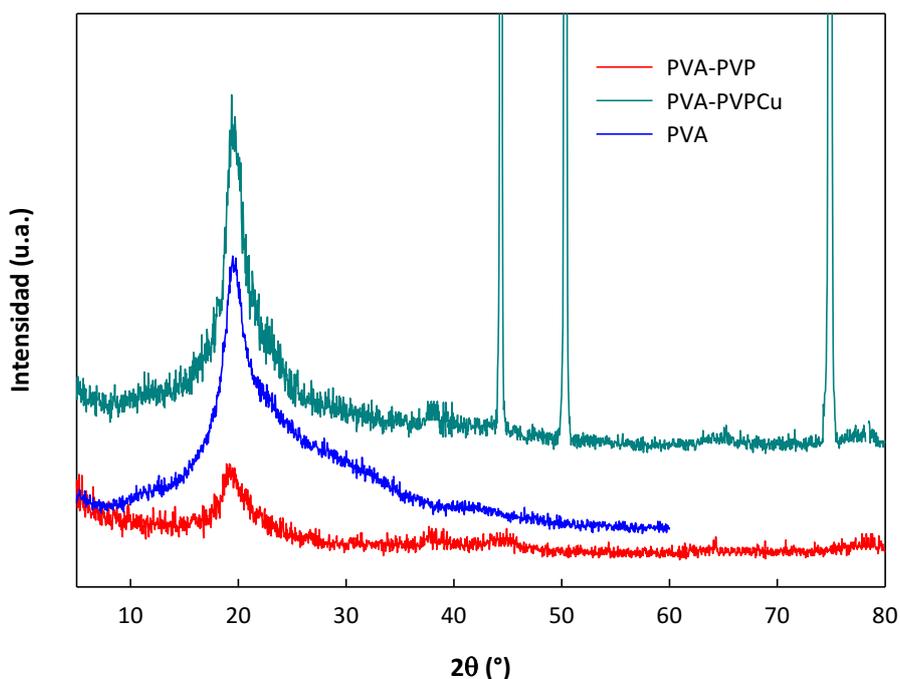


Figura 7.13. Difractogramas de rayos X de las distintas matrices a base de PVA obtenidas por electrohilado

Pangon y col. (2016) encontraron resultados similares al trabajar con mezclas de quitosano y PVA entrecruzadas con distintos ácidos. Estos autores señalaron que la pérdida de cristalinidad se asoció a una disminución en el arreglo de las cadenas poliméricas debido a la evaporación rápida del solvente durante el proceso de electrohilado. Asimismo, Krstic y col. (2018) sugirieron que durante el proceso de electrohilado las moléculas se orientan en la dirección de las fibras teniendo menos tiempo para alinearse entre sí, generando un empaque menos favorable. Una tendencia similar fue informada por Lamarra y col. (2021).

Asimismo la presencia de PVP disminuyó la intensidad del patrón de difracción del PVA debido a su naturaleza amorfa (Tabla 7.4). Por otra parte, la adición de NpCu incrementó nuevamente la cristalinidad lo que indicaría que las partículas estuvieron bien dispersas en la matriz y no causaron una disrupción en la cristalinidad de la matriz de PVA. Resultados parecidos fueron informados por Das y col. (2012) trabajando con una matriz electrohilada de PVA-PVP funcionalizada con grafeno.

Tabla 7.4. Análisis de tamaño de cristalito mediante la ecuación de Scherrer y grado de

Muestra	2θ (°)	FWHM	Tamaño del cristalito (nm)	Grado de cristalinidad (%)
PVA	19.41	0.77	10.9	64.5
PVA-PVP	19.53	1.19	4.4	43.4
PVA-PVPCu ₂	19.24	1.26	6.7	54.3

cristalinidad de las matrices a base de PVA obtenidas por electrohilado

La deconvolución de los patrones de difracción de las matrices electrohiladas de PVA, PVA-PVP y PVA-PVPCu₂ se muestra en la Figura 7.14.

El pico ubicado a $2\theta=19.6$ permaneció inalterado en todos los casos pero el hombro de PVA a 24.4° desapareció en presencia de PVP y un pico ancho centrado a 20.6° se evidenció con la adición de NpCu. Los picos propios de las partículas no se muestran en la Figura 7.14b.

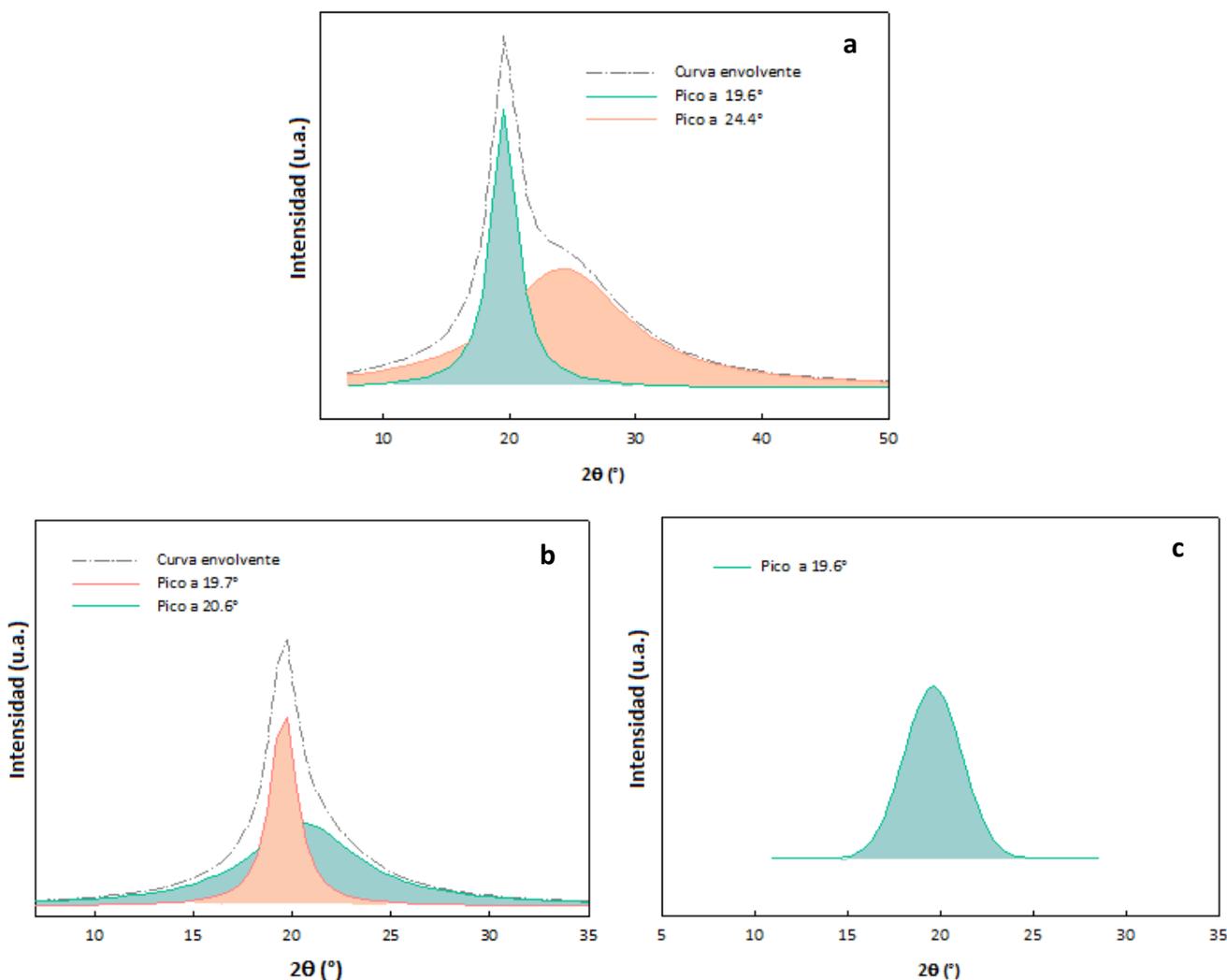


Figura 7.14. Deconvolución de los picos de difracción de RX de las matrices electrohiladas (a) PVA, (b) PVA-PVPCu₂ y (c) PVA-PVP.

7.4.6 Análisis de las matrices electrohiladas por ATR-FTIR

En la [Figura 7.14](#) se presentan los espectros ATR-FTIR de la matriz PVA-PVP electrohilada y los controles PVP en polvo y matrices de PVA 14% obtenidas por electrospinning o por moldeo.

Los cambios experimentados por el PVA luego del proceso electrohilado en los modos vibracionales característicos del polímero se analizaron mediante ATR-FTIR. Las muestras sometidas a electrohilado sufrieron importantes cambios en la región espectral 1800-1200 cm⁻¹ con respecto al PVA obtenido por moldeo, especialmente la atenuación de la banda ubicada a 1656 cm⁻¹ ([Figura 7.14a](#)). En la región espectral 3600-2800 cm⁻¹ asignada al modo vibracional de los grupos OH del polímero se observó un corrimiento del máximo

desde 3293 a 3273 cm^{-1} . Esta banda disminuye en intensidad con la incorporación de PVP indicando el entrecruzamiento con los grupos hidroxilo del PVA (Shankhwar y col., 2016).

Por otra parte, comparando el espectro de la matriz fibrosa PVA-PVP con la matriz PVA obtenida por electrohilado y con el PVP se pudo observar que el pico agudo a 1647 cm^{-1} correspondió a la banda del PVP, las regiones 3600-2700 cm^{-1} y 1160-800 cm^{-1} conservaron bandas características del PVA y en la región 1500-1160 cm^{-1} los picos sufrieron cambios que se corresponderían con interacciones entre ambos polímeros. El máximo del PVA electrohilado ubicado a 3293 cm^{-1} sufrió un corrimiento a 3305 cm^{-1} en presencia de PVP. Este hecho puede ser explicado por el reemplazo de las uniones hidroxilo-hidroxilo de las regiones amorfas del PVA con interacciones hidroxilo-carbonilo (Lewandowska, 2005; Teodorescu y col., 2019).

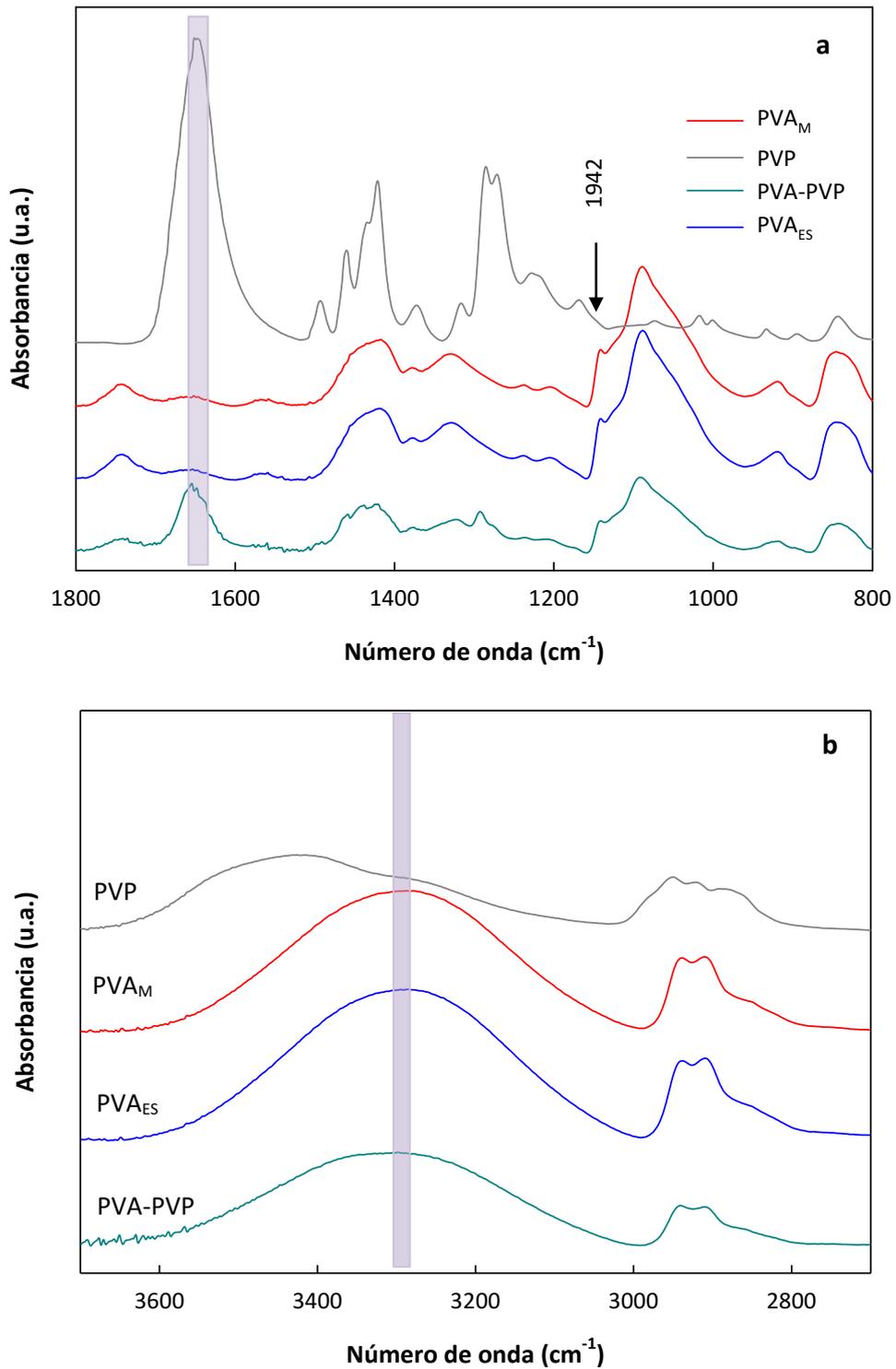


Figura 7.15. Espectros de absorción ATR-FTIR de las muestras PVA-PVP obtenidas por electrohilado y de los componentes puros en las regiones comprendidas entre: **a)** 1800-800 cm⁻¹ y **b)** 3600-2800 cm⁻¹.

El hombro bien definido a 1144 cm^{-1} , relacionado con la cristalinidad del PVA, apareció en los espectros de las matrices obtenidas por electrohilado, tanto en PVA como PVA-PVP (Tretinnikov y col., 2013; Villarruel y col., 2015). Este hecho sugiere que el PVP interactúa con solo con la región amorfa del PVA (Teodorescu y col., 2019).

Comparando las matrices PVA-PVP con y sin adición de NpCu, diferencias significativas se pusieron en evidencia. Así, el pico relacionado con la cristalinidad del PVA a 1142 cm^{-1} se acentuó en presencia de NpCu y se observó un corrimiento del máximo en la región $3600\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ hacia menores números de onda (Figura 7.15).

Analizando la interfase en los sistemas bicapa entre QAg₂ y PVA-PVPCu₂, se observó un espectro muy similar al del quitosano (Figura 7.13) excepto por la presencia del pico ubicado a 1730 cm^{-1} que en el PVA es el resultado de la vibración de estiramiento de la unión C=O del grupo acetato (Nawar y El-Mahalawy, 2020). La intensidad de este pico depende del grado de hidrólisis; la baja intensidad corresponde a una pureza de PVA del 99%. La banda de estiramiento C=O indicó la unión intermolecular de hidrógeno entre grupos hidroxilo de PVA y grupos carbonilo de PVP. El PVP contiene una fracción carbonil que acepta protones en su anillo de pirrolidona, mientras que los grupos hidroxilo se presentan en el PVA como grupos laterales. En las matrices PVA-PVP, la interacción de enlace de hidrógeno puede ocurrir entre estas dos fracciones acetato (Nawar y El-Mahalawy, 2020).

En la región espectral $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ se observaron cambios significativos en las bandas de estiramiento del alquilo C-H. La mayor intensidad de los picos en el PVA electrohilado indicó una mejora en la cristalinidad de la membrana fibrosa (Shankhwar y col., 2016).

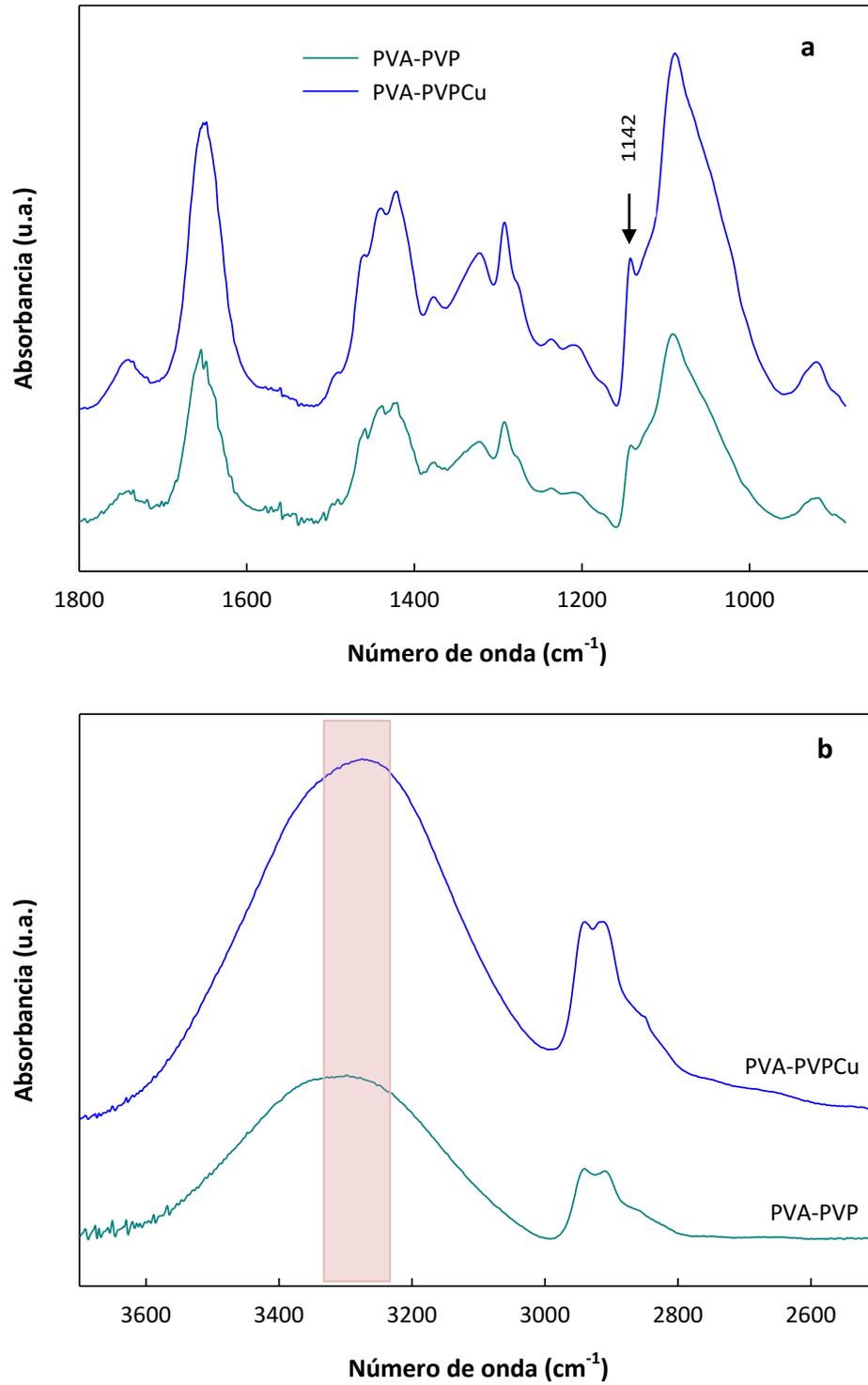


Figura 7.16. Espectros de absorción ATR-FTIR de las muestras PVA-PVP obtenidas por electrohilado con y sin adición de NpCu en las regiones comprendidas entre: **a)** 1800-800 cm^{-1} y **b)** 3600-2800 cm^{-1} .

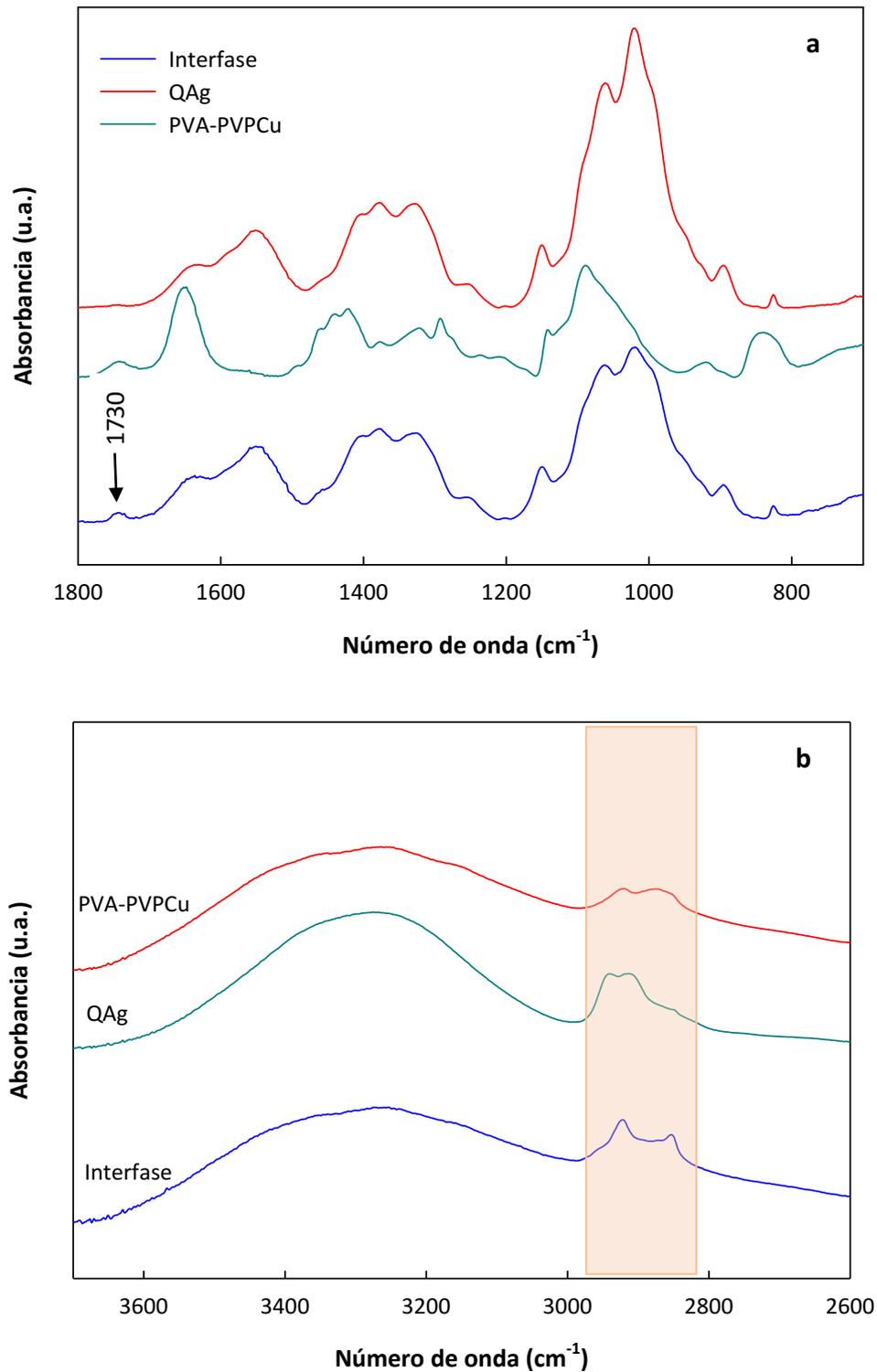


Figura 7.17. Espectros de absorción ATR-FTIR de la interfase del sistema bicapa QA₂+PVA-PVPCu y de cada una de las caras en las regiones comprendidas entre: **a)** 1800-800 cm⁻¹ y **b)** 3600-2800 cm⁻¹.

7.4.7 Capacidad antimicrobiana de las matrices electrohiladas

Se evaluó la capacidad antimicrobiana de las nanoestructuras fibrosas PVA-PVPCu y las bicapas formadas por una capa de Q con NpAg y PVA-PVP sin y con NpCu (QAg₂+PVA-PVP y QAg₂+PVA-PVPCu₂) frente a *Candida albicans*, *E. coli*, *Salmonella*, *S. aureus* y *S. epidermidis*. Los resultados se presentan en las Figuras 7.18. Se observó que las matrices fibrosas formadas exhibieron capacidad antibacteriana frente a los distintos microorganismos ensayados debido a la difusión de los iones Ag y/o Cu por contacto con el medio de cultivo como se explicó en el **Capítulo 6 Propiedades antimicrobianas**. Similares resultados fueron informados por Lamarra y col. (2020) trabajando con matrices cargadas con aceite esencial de cabreuva y López-Córdoba y col. (2016) para ensayos realizados con *E. coli* y *S. aureus*.

Candida albicans

PVA-PVPCu_x



QAg₂+PVA-PVP



QAg₂+PVA-PVPCu_x

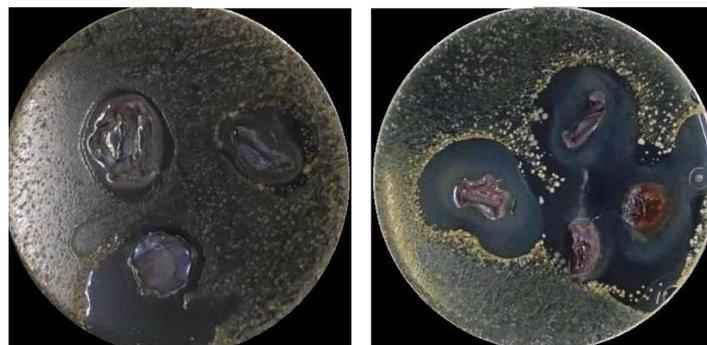
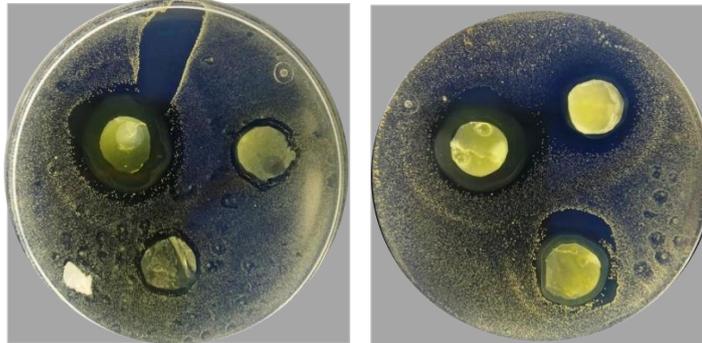


Figura 7.18. Fotografías de placas de Petri sembradas con *Candida albicans* mostrando los halos de inhibición generados por los discos de nanocompuestos formulados con mezclas de PVA-PVPCu_x y sistemas bicapa QAg₂+PVA-PVP y QAg₂+PVA-PVPCu_x. Las formulaciones con $x=1, 2$ que forman parte de los nanocompuestos se muestran de izquierda a derecha.

Staphylococcus aureus

PVA-PVPCu_x



QAg₂+PVA-PVP



QAg₂+PVA-PVPCu_x

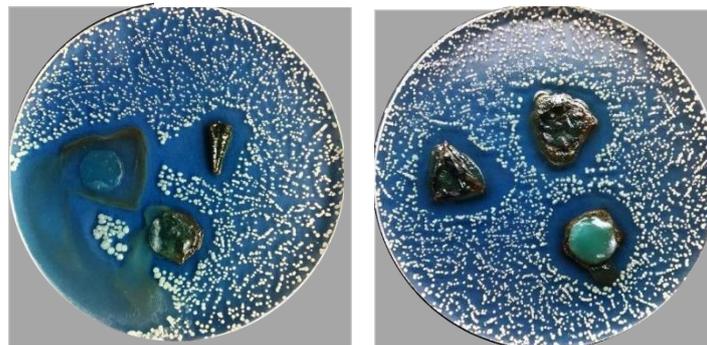


Figura 7.19. Fotografías de placas de Petri sembradas con *Staphylococcus aureus* mostrando los halos de inhibición generados por los discos de nanocompuestos formulados con mezclas de PVA-PVPCu_x, y sistemas bicapa QAg₂+PVA-PVP y QAg₂+PVA-PVPCu_x. Las formulaciones con $x=1, 2$ que forman parte de los nanocompuestos se muestran de izquierda a derecha.

Staphylococcus epidermidis

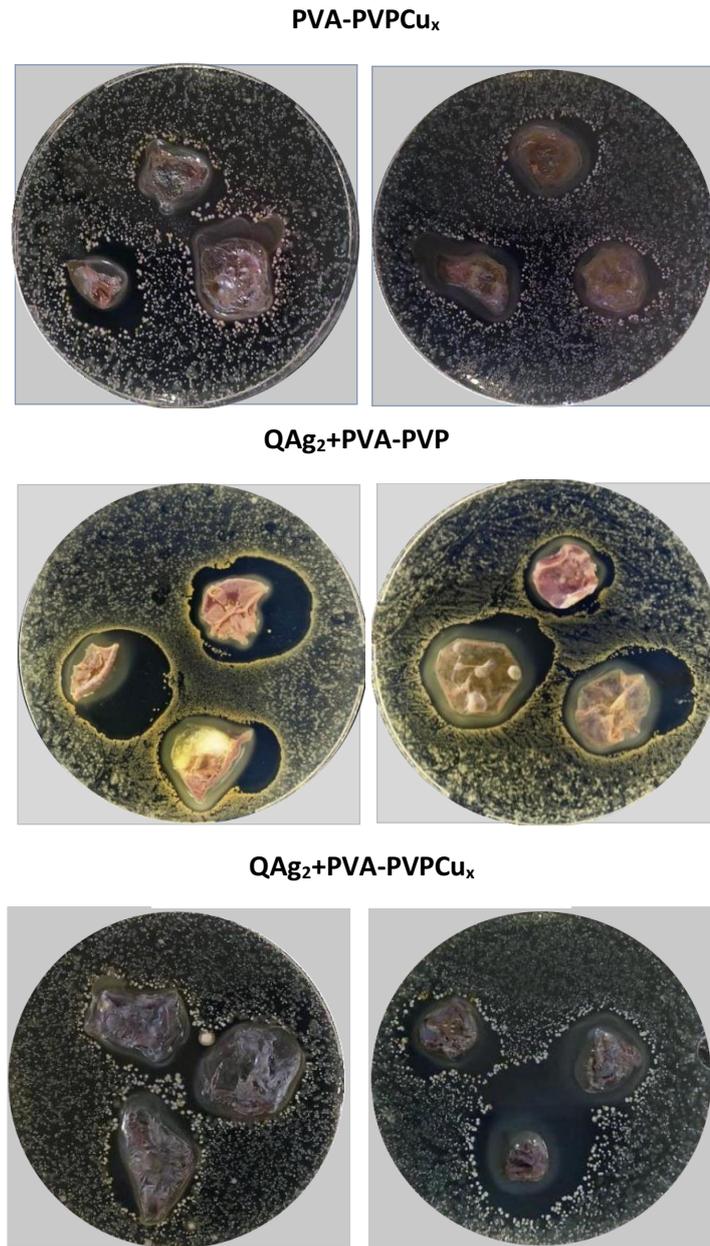
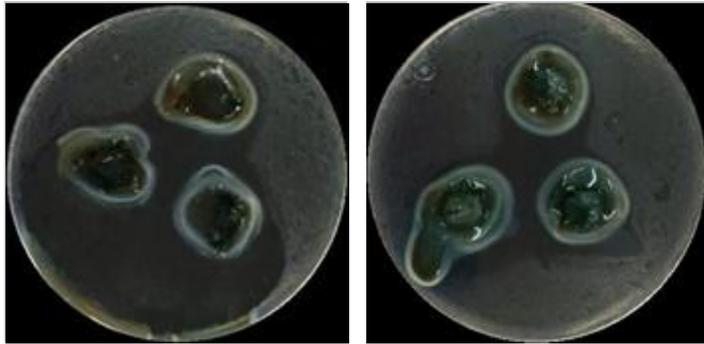


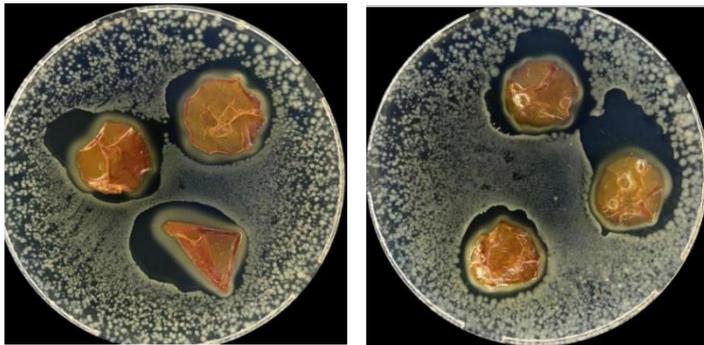
Figura 7.20. Fotografías de placas de Petri sembradas con *Staphylococcus epidermidis* mostrando los halos de inhibición generados por los discos de nanocompuestos formulados con mezclas de PVA-PVPCu_x y sistemas bicapa QAg₂+PVA-PVP QAg₂+PVA-PVPCu_x. Las formulaciones con x=1, 2 que forman parte de los nanocompuestos se muestran de izquierda a derecha.

Escherichia coli

PVA-PVPCu_x



QAg₂+PVA-PVP



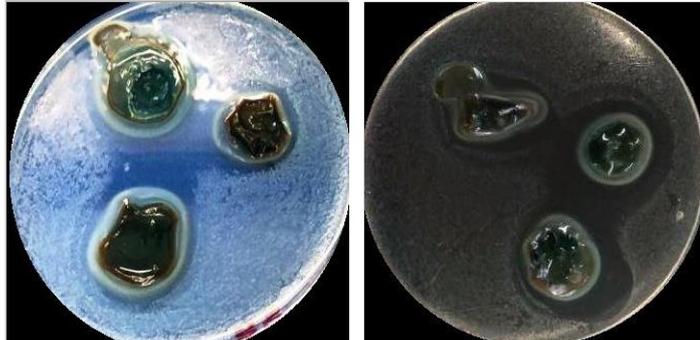
QAg₂+PVA-PVPCu_x



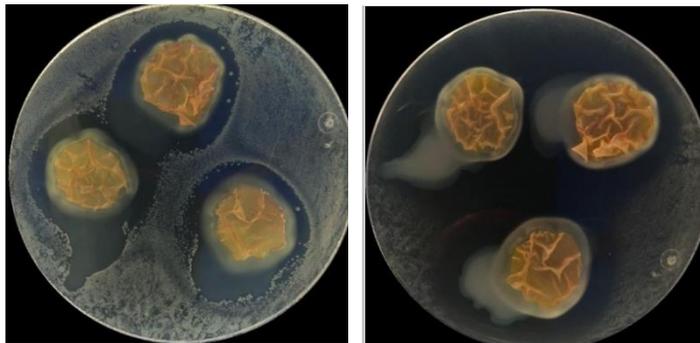
Figura 7.21. Fotografías de placas de Petri sembradas con *Escherichia coli* mostrando los halos de inhibición generados por los discos de nanocompuestos formulados con mezclas de PVA-PVPCu_x, sistemas bicapa QAg₂+PVA-PVP y QAg₂+PVA-PVPCu_x. Las formulaciones con x=1, 2 que forman parte de los nanocompuestos se muestran de izquierda a derecha.

Salmonella

PVA-PVPCu_x



QAg₂+PVA-PVP



QAg₂+PVA-PVPCu_x



Figura 7.22. Fotografías de placas de Petri sembradas con *Salmonella* mostrando los halos de inhibición generados por los discos de nanocompuestos formulados con mezclas de PVA-PVPCu_x, sistemas bicapa QAg₂+PVP-PVA y QAg₂+PVA-PVPCu_x. Las formulaciones con x=1, 2 que forman parte de los nanocompuestos se muestran de izquierda a derecha.

7.5 APLICACIÓN

7.5.1 Aplicación de matrices fibrosas a la retención de material particulado PM

El material particulado (PM) puede provenir de fuentes naturales o antropogénicas. Las partículas se emiten directamente a la atmósfera o se forman mediante la transformación de las emisiones gaseosas. El PM se clasifica comúnmente por su tamaño; por lo tanto, PM₁₀ es la fracción gruesa de PM, donde las partículas tienen diámetro aerodinámico menor que 10 μm ; y PM_{2.5} es la fracción fina, donde las partículas tienen diámetro aerodinámico menor que 2.5 μm . La composición química de las partículas troposféricas incluye iones inorgánicos, compuestos metálicos, carbono elemental, compuestos orgánicos y sustancias provenientes de la corteza terrestre.

Muchos estudios epidemiológicos y toxicológicos muestran que PM_{2.5} es un fuerte indicador de riesgo asociado a la exposición a PM de diversas fuentes y en diferentes entornos, señalando que la exposición a PM_{2.5} está asociada al desarrollo de inflamación sistémica, estrés oxidativo, alteración de los procesos eléctricos en el corazón, y disfunción vascular (Gomes y Florida-James, 2014; Lippmann, 2014; Lu y col., 2015).

Hay dos fuentes potenciales principales de contaminación atmosférica en el área de estudio, Gran La Plata. Una de las fuentes es un grupo de industria petroquímica (incluida la principal refinería de petróleo del país y una planta de coque de petróleo calcinado), conjuntamente con otras productoras como las centrales térmicas e industria metalúrgica, ubicadas en los distritos de Ensenada y Berisso. La otra fuente importante de contaminación del aire es el tráfico vehicular, principalmente en el centro de la ciudad de La Plata. El objetivo de este estudio es analizar los niveles de suspensión PM_{2.5} en el medio ambiente de Gran La Plata (Giuliani y col., 2021).

7.5.2 Muestreo de partículas, extracción y análisis

Para llevar a cabo el ensayo se usaron matrices electrohiladas tratadas térmicamente como material filtrante. Las muestras PVA-PVP y PVA-PVPCu₂ fueron sometidas a tratamiento térmico a 120°C durante 1 h en una estufa de convección forzada a fin de modificar la solubilidad de las mismas antes de ser usadas en el ensayo de retención de

material particulado. La temperatura y el tiempo de tratamiento se seleccionaron en base a un ensayo previo realizado sobre matrices de PVA (Pérez-Calderón y col., 2021).

Se utilizó un dispositivo de muestreo de material particulado (PM) TDA (CABA, Argentina) de bajo volumen conectados a una bomba para vacío de 2 etapas BB-01 (TDA) (Figura 7.23). El dispositivo fue ubicado en el sitio de monitoreo y el MP se recogió en el filtro formado por la membrana fibrosa PVA-PVPCu₂ de 47.0 mm de diámetro. El monitoreo se realizó durante 24 h controlando la fracción de partículas PM_{2.5}. El modo de muestreo del equipo es de tipo forzado, ya que la bomba hace que el aire ingrese a un flujo determinado, el cual es fijado previo al muestreo. El aire es arrastrado a través de un separador de partículas de acuerdo a su tamaño (impactador) con puntos de corte de 10 o 2.5 μm y luego a través de un medio filtrante, donde queda retenido el material particulado seleccionado. El punto de corte es función de la velocidad con la que la corriente de aire atraviesa el impactador e impacta en el blanco. La separación de partículas por tamaño de la corriente de aire se logra por impacto.

Los filtros se mantuvieron en un desecador con sílica gel hasta el muestreo con el fin de evitar la presencia de humedad. Los volúmenes de muestreo fueron seleccionados según la metodología de otros autores (Colman Lerner, 2013; Sosa y col., 2017) y con el fin de obtener cantidades determinables de masa de partículas en el balance (Balanza analítica Mettler AE240). El volumen fue de 24 m³ para el caudal de operación de 16.6 L min⁻¹.

Al final de cada muestreo, los filtros se colocaron en el desecador con sílica gel durante 48 h para eliminar cualquier rastro de humedad. La masa de partículas se determinó por método gravimétrico, por lo tanto, cada uno de los filtros fue ponderado antes y después del muestreo. La concentración de partículas en el aire ($\mu\text{g m}^{-3}$) fue calculada como la relación entre la masa de PM y el volumen muestreado.



Figura 7.23. (a) Muestreador TDA. Fotografías de mallas fibrosas PVA-PVPCu₂ obtenidas por electrohilado (b) antes del comienzo y (c) una vez concluido el proceso de monitoreo.



7.5.3 Tratamiento térmico de las matrices electrohiladas (filtros)

Como resultado del tratamiento térmico de las matrices electrohiladas a 120°C durante 1h, PVA-PVP y PVA-PVPCu₂ disminuyeron su solubilidad % y su capacidad de hinchamiento % después de su inmersión en agua durante 1h (Tabla 7.4).

Las diferencias en el hinchamiento después de su inmersión en agua durante 1 h no fueron significativas ($p > 0.05$) entre las muestras control y las sometidas a curado (Tabla 7.4). Sin embargo, se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la solubilidad de las muestras sometidas a TT y las no tratadas. Las fotografías muestran las membranas electrohiladas control y las sometidas a TT antes (Figura 7.23a) y después de su inmersión en agua donde adquirieron estructura de gel (Figura 7.23b).

Tabla 7.4. Propiedades relacionadas con la afinidad por el agua de las matrices PVA-PVP control y PVA-PVPCu₂ antes y después del tratamiento térmico a 120°C durante 1 h.

Formulación	Hinchamiento %	Solubilidad %
PVA-PVP control	463 (54) ^a	82.3 (7.1) ^b
PVA-PVP 120°C 1 h	366 (43) ^a	47.9 (5.7) ^a
PVA-PVPCu	499 (76) ^a	87.5 (2.7) ^b
PVA-PVPCu 120°C 1h	426 (53) ^a	32.4 (5.9) ^a

^aLetras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$).

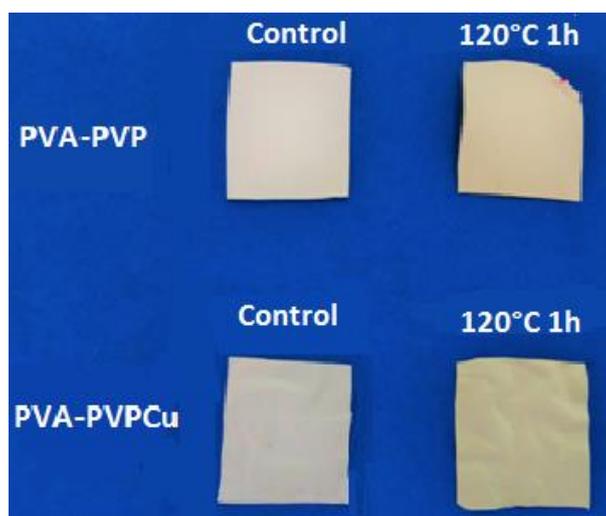


Figura 7.24. Fotografías de las membranas electrohiladas PVA-PVP y PVA-PVPCu₂ antes (control) y después del proceso de curado a 120°C durante 1 hora

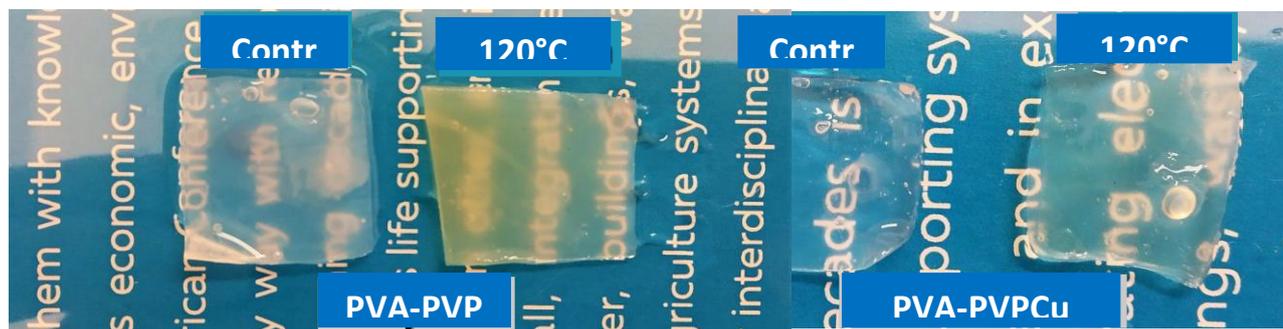


Figura 7.25. Fotografías de las membranas electrohiladas PVA-PVP y PVA-PVPCu₂, control y curadas a 120°C durante 1 hora, después del ensayo de hinchamiento y solubilidad por inmersión en agua durante 1 hora.

7.5.4 Calidad del aire

Asimismo, se compararon los niveles de PM medidos (Tabla 7.5) con los de la legislación local de la provincia de Buenos Aires, que recomienda $25 \mu\text{g m}^{-3}$ para PM_{2.5} y $50 \mu\text{g m}^{-3}$ para PM₁₀, como máximo anual permitido (OPDS, 2018). Sin embargo, los niveles

propuestos por la OMS son más exigentes, siendo $10 \mu\text{g m}^{-3}$ para PM2.5 y $20 \mu\text{g m}^{-3}$ para PM10 (WHO,2006) Al comparar la concentración de PM2.5 y PM10 (26.3 y $55 \mu\text{g m}^{-3}$, respectivamente) con los valores recomendados por la OPDS se determinó que los mismos superaron los valores de referencia en un 5.2 y 0.7%, respectivamente.

Tabla 7.5. Parámetros usados para determinar la concentración de material particulado menor que 2.5 y 10 μm retenido por los filtros electrohilados

Muestra	Diferencia masa (ug)	Tiempo (min)	Flujo (l min^{-1})	Volumen aire (m^3)	Concentración PM (ug m^{-3})
PM2.5	630	1440	16.6	24	26.3
PM10	1330	1440	16.6	24	55.4

7.5.5 Observación microscópica por SEM

En la [Figura 7.26](#) se muestran micrografías obtenidas por SEM de matrices electrohiladas aplicadas como medio filtrante de material particulado menor que 2.5 o 10 μm . Los filtros después del tratamiento térmico a 120°C durante 1 h se montaron en el muestreador TDA durante 24 h. Al finalizar este período fueron retirados, colocados en un desecador con sílica gel hasta peso constante. La diferencia de peso dividida por el volumen de aire muestreado durante las 24 h permitió calcular el nivel de PM.

Se observó que los filtros conservaron su estructura porosa y las fibras su microestructura y entrecruzamiento que permitieron la retención del material particulado. Según [Giuliani y col. \(2017\)](#) en la zona urbana predominan partículas con altos porcentajes de C y O, sobre todo en la fracción MP2.5, con formas esféricas individuales o agregados ([Figura 7.26](#)). Estas características apuntan a las emisiones de los procesos de combustión en vehículos a gasolina y diésel.

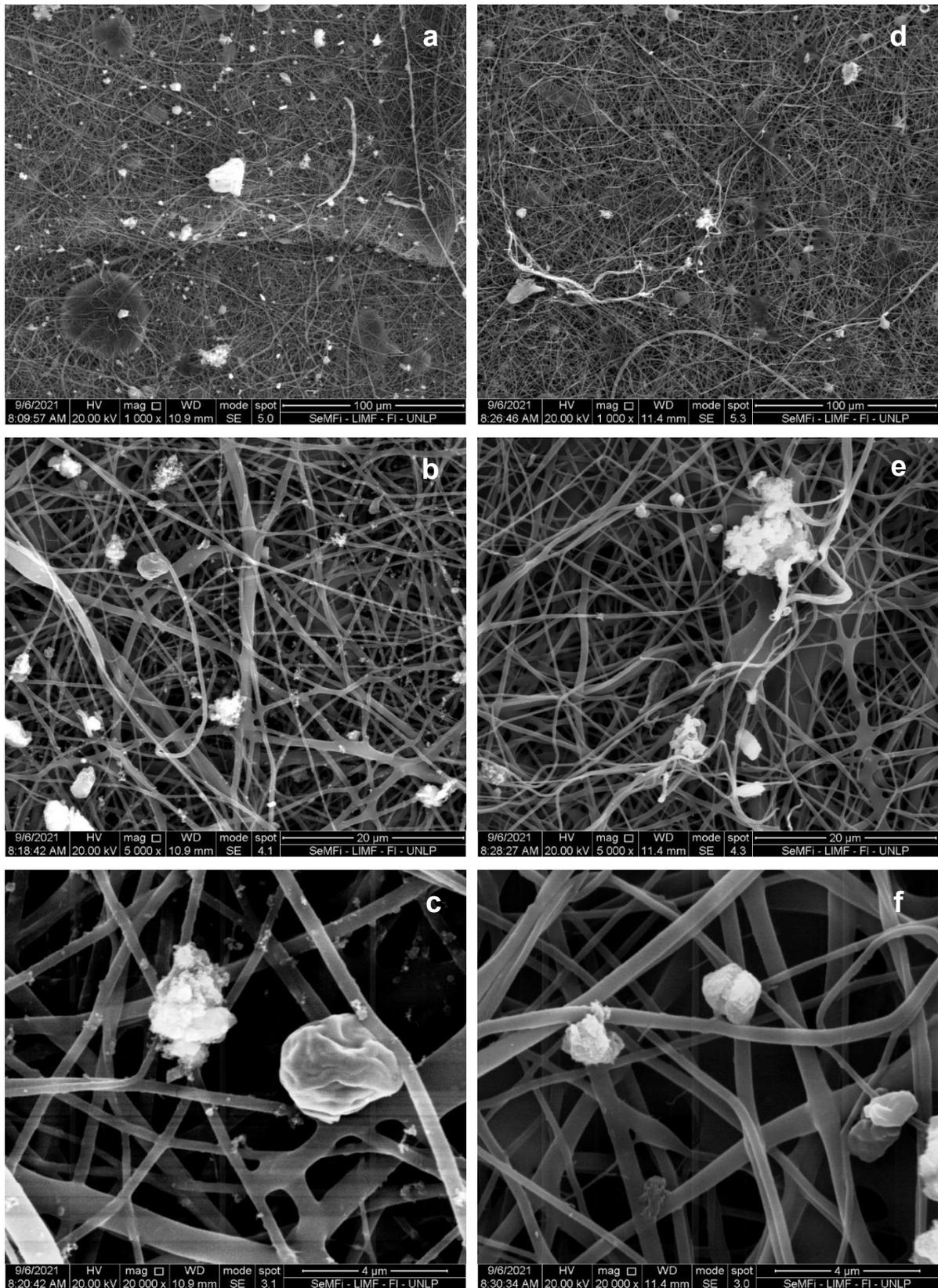


Figura 7.26. Micrografías de matrices electrohiladas PVA-PVPCu₂ tratadas a 120°C durante 1h aplicadas como medio filtrante de material particulado de 2.5 (a), (b), (c) v 10 μm (d), (e), (f). Los aumentos se muestran en cada micrografía.

7.6 CONCLUSIONES

Se obtuvieron membranas compuestas nanofibrosas lisas y homogéneas a partir de soluciones de polímero (12% p/v PVA y 8% p/v PVP). La conductividad eléctrica y la viscosidad de la solución permitieron obtener diámetros adecuados de las fibras y estas fueron más finas y estrechas con la adición de NpCu que produjo un aumento de la conductividad del 39%.

El entrecruzamiento entre el PVA y PVP se puso de manifiesto a través del análisis ATR-FTIR. La sustitución de PVA con PVP mejoró el rendimiento final del esfuerzo de las membranas.

El tratamiento térmico de las estructuras fibrosas mejoró la solubilidad permitiendo su uso en ambientes de alta humedad. La aplicación de las membranas fibrosas PVA-PVPCu₂ como filtros permitió retener material particulado de tamaño inferior que 2.5 y 10 μm con un caudal de 16.6 $\text{m}^3 \text{min}^{-1}$. Se determinó que la concentración de material particulado superó ligeramente los límites permitidos por la legislación local.

7.7 REFERENCIAS

- Abdelrazek, E. M., Elashmawi, I. S., & Labeeb, S. (2010). Chitosan filler effects on the experimental characterization, spectroscopic investigation and thermal studies of PVA/PVP blend films. *Physica B: Condensed Matter*, 405(8), 2021–2027. <https://doi.org/10.1016/j.physb.2010.01.095>
- Almetwally, A. A., El-Sakhawy, M., Elshakankery, M. H., & Kasem, M. H. (2018). Technology of Nano-Fibers: Production Techniques and Properties - Critical Review. *Journal of the Textile Association*, February.
- Angeles, M., Cheng, H.-L., & Velankar, S. S. (2008). Emulsion electrospinning: Composite fibers from drop breakup during electrospinning. *Polymers for Advanced Technologies*, 19, 728–733. <https://doi.org/10.1002/pat.1031>
- Arecchi, A., Mannino, S., & Weiss, J. (2010). Electrospinning of poly(vinyl alcohol) nanofibers loaded with hexadecane nanodroplets. *Journal of Food Science*, 75(6), 80–88. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01680.x>
- Babitha, S., Rachita, L., Karthikeyan, K., Shoba, E., Janani, I., Poornima, B., & Purna Sai, K. (2017). Electrospun protein nanofibers in healthcare: A review. *International Journal of Pharmaceutics*, 523(1), 52–90. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.03.013>
- Badrossamay, M. R., McIlwee, H. A., Goss, J. A., & Parker, K. K. (2010). Nanofiber assembly by rotary jet-spinning. *Nano Letters*, 10(6), 2257–2261. <https://doi.org/10.1021/nl101355x>
- Barnes, C. P., Sell, S. A., Boland, E. D., Simpson, D. G., & Bowlin, G. L. (2007). Nanofiber technology: Designing the next generation of tissue engineering scaffolds. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(14), 1413–1433. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.04.022>
- Basha, R. Y., Sampath Kumar, T. S., & Doble, M. (2017). Electrospun nanofibers of Curdlan (β -1, 3 Glucan) blend as a potential skin scaffold material. *Macromolecular Materials and Engineering*, 302(4), 1600417.
- Bognitzki, M., Czado, W., Frese, T., Schaper, A., Hellwig, M., Steinhart, M., Greiner, A., & Wendorff, J. H. (2016). Short communications: Trends on technological concepts. *Applied Nanotechnology: Materials and Applications*, 1, 109–113. <https://doi.org/10.1201/9781315366333>
- Camerlo, A., Bühlmann-Popa, A. M., Vebert-Nardin, C., Rossi, R. M., & Fortunato, G. (2014). Environmentally controlled emulsion electrospinning for the encapsulation of temperature-sensitive compounds. *Journal of Materials Science*, 49(23), 8154–8162. <https://doi.org/10.1007/s10853-014-8524-5>
- Chang, G., Zhu, X., Li, A., Kan, W., Warren, R., Zhao, R., Wang, X., Xue, G., Shen, J., & Lin, L. (2016). Formation and self-assembly of 3D nanofibrous networks based on oppositely charged jets. *Materials and Design*, 97, 126–130. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2016.02.069>
- Colman Lerner, J. E. (2013). *Contaminación ambiental: análisis y mitigación/remoción de material particulado (MP) y compuestos orgánicos volátiles (COVs) y semivolátiles (COSVs)* [Universidad Nacional de La Plata]. <https://doi.org/10.35537/10915/27002>
- Cornejo Bravo, J. M., Villarreal Gómez, L. J., & Serrano Medina, A. (2016). Electrospinning for Drug Delivery Systems: Drug Incorporation Techniques. *Electrospinning - Material, Techniques, and*

Capítulo 7: Nanoestructuras funcionalizadas electrohiladas

Biomedical Applications. <https://doi.org/10.5772/65939>

- Dai, H., Gong, J., Kim, H., & Lee, D. (2002). Novel Method for Preparing Ultra-Fine Alumina-Borate Oxide Fibres via an Electrospinning Technique. *Nanotechnol*, 13(5).
- Das, S., Wajid, A. S., Bhattacharia, S. K., Wilting, M. D., Rivero, I. V., & Green, M. J. (2013). Electrospinning of polymer nanofibers loaded with non covalently functionalized graphene. *Journal of Applied Polymer Science*, 128(6), 4040-4046.
- Deitzel, J. M., Kleinmeyer, J. D., Hirvonen, J. K., & Beck Tan, N. C. (2001). Controlled deposition of electrospun poly(ethylene oxide) fibers. *Polymer*, 42(19), 8163–8170. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(01\)00336-6](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(01)00336-6)
- Demir, M. M., Yilgor, I., Yilgor, E., & Erman, B. (2002). *Electrospinning of polyurethane*® bers. 43, 3303–3309.
- Dersch, R., Liu, T., Schaper, A. K., Greiner, A., & Wendorff, J. H. (2003). Electrospun nanofibers: Internal structure and intrinsic orientation. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 41(4), 545–553. <https://doi.org/10.1002/pola.10609>
- Duan, B., Dong, C., & Yuan, X. (2004). Journal of Biomaterials Science , Polymer Edition Electrospinning of chitosan solutions in acetic acid with poly (ethylene oxide). *J. Biomater. Sci.*, 15(6), 797–811. <https://doi.org/10.1163/156856204774196171>
- García-Moreno, P. J., Stephansen, K., Van Der Kruijs, J., Guadix, A., Guadix, E. M., Chronakis, I. S., & Jacobsen, C. (2016). Encapsulation of fish oil in nanofibers by emulsion electrospinning: Physical characterization and oxidative stability. *Journal of Food Engineering*, 183, 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.03.015>
- Giuliani, Daniela S.; Orte, Marcos; Martins, Eneique; Matamoros, Natalia; Colman Lerner, J. Esteban; Porta, A. (2017). Caracterización química y espectroscópica de material particulado en aire extramuros en la ciudad de la plata y alrededores. *IV Congreso Internacional Científico y Tecnológico-CONCYT* 2017, 1–13. https://digital.cic.gba.gob.ar/bitstream/handle/11746/6762/11746_6762.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Giuliani, D., Colman Lerner, J. E., & Porta, A. (2021). Human health risk associated to particulate matter and polycyclic aromatic hydrocarbon levels and their relation with preponderant sources in Gran La Plata, Argentina. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(26), 35226–35241. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13138-8>
- Gomes, E. C., & Florida-James, G. (2014). Lung Inflammation, Oxidative Stress and Air Pollution. *Lung Inflammation*, 1–28. <https://doi.org/10.5772/58252>
- Goonoo N, Bhaw-Luximon A, Rodriguez IA, W. D., & Sch€onherr H, Bowlin GL, J. D. (2014). Poly (ester-ether) s: II. Properties of electrospun nanofibres from polydioxanone and poly (methyl dioxanone) blends and human fibroblast cellular proliferation. *Biomater Sci*, 2, 339–351.
- Gordon, V., Marom, G., & Magdassi, S. (2015). Formation of hydrophilic nanofibers from nanoemulsions through electrospinning. *International Journal of Pharmaceutics*, 478(1), 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.11.038>
- Guarino, V., Alvarez-Perez, M., Cirillo, V., & Ambrosio, L. (2011). HMSC interaction with PCL and

Capítulo 7: Nanoestructuras funcionalizadas electrohiladas

- PCL/gelatin platforms: A comparative study on films and electrospun membranes. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 26(2), 144–160. <https://doi.org/10.1177/0883911511399410>
- Gupta, P., Elkins, C., Long, T. E., & Wilkes, G. L. (2005). Electrospinning of linear homopolymers of poly (methyl methacrylate): exploring relationships between fiber formation , viscosity , molecular weight and concentration in a good solvent. *Polymer*, 46, 4799–4810. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2005.04.021>
- Haghi, A. K., & Akbari, M. (2007). Trends in electrospinning of natural nanofibers. *Physica Status Solidi (A) Applications and Materials Science*, 204(6), 1830–1834. <https://doi.org/10.1002/pssa.200675301>
- Hu, X., Liu, S., Zhou, G., Huang, Y., Xie, Z., & Jing, X. (2014). Electrospinning of polymeric nano fibers for drug delivery applications. *Journal of Controlled Release*, 185, 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.018>
- Huang, S., Zhou, L., Li, M. C., Wu, Q., Kojima, Y., & Zhou, D. (2016). Preparation and properties of electrospun poly (vinyl pyrrolidone)/cellulose nanocrystal/silver nanoparticle composite fibers. *Materials*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/ma9070523>
- Jain, R., Shetty, S., & Yadav, K. S. (2020). Unfolding the electrospinning potential of biopolymers for preparation of nanofibers. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 57(January). <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101604>
- Jaipakdee, N., Pongjanyakul, T., & Limpongsa, E. (2018). Preparation and characterization of poly (vinyl alcohol)/poly (vinyl pyrrolidone) mucoadhesive buccal patches for delivery of lidocaine HCL. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 2018. <http://dx.doi.org/10.22159/ijap.2018v10i1.23208>
- Kamble, P., Sadarani, B., Majumdar, A., & Bhullar, S. (2017). Nanofiber based drug delivery systems for skin: A promising therapeutic approach. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 41, 124–133. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.07.003>
- Ki, C. S., Baek, D. H., Gang, K. D., Lee, K. H., Um, I. C., & Park, Y. H. (2005). Characterization of gelatin nanofiber prepared from gelatin-formic acid solution. *Polymer*, 46(14), 5094–5102. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2005.04.040>
- Kim, C. W., Kim, D. S., Kang, S. Y., Marquez, M., & Joo, Y. L. (2006). Structural studies of electrospun cellulose nanofibers. *Polymer*, 47(14), 5097–5107. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2006.05.033>
- Kishan, A. P., & Cosgriff-Hernandez, E. M. (2017). Recent advancements in electrospinning design for tissue engineering applications: A review. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 105(10), 2892–2905. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36124>
- Krstić, M., Radojević, M., Stojanović, D., Radojević, V., Uskoković, P., & Ibrić, S. (2017). Formulation and characterization of nanofibers and films with carvedilol prepared by electrospinning and solution casting method. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101, 160-166.
- Kumar, P. T. S., Abhilash, S., Manzoor, K., Nair, S. V., Tamura, H., & Jayakumar, R. (2010).

Capítulo 7: Nanoestructuras funcionalizadas electrohiladas

- Preparation and characterization of novel β -chitin/nanosilver composite scaffolds for wound dressing applications. *Carbohydrate Polymers*, 80(3), 761–767. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.12.024>
- Lakshmi Priya, M., Rana, D., Bhatt, A., & Ramalingam, M. (2017). Nanofiber composites in gene delivery. In *Nanofiber Composites for Biomedical Applications*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100173-8.00031-4>
- Lamarra, J., Rivero, S., & Pinotti, A. (2020). Nanocomposite bilayers based on poly(vinyl alcohol) and chitosan functionalized with gallic acid. *International Journal of Biological Macromolecules*, 146, 811–820. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.049>
- Lamarra, J., Calienni, M. N., Rivero, S., & Pinotti, A. (2020). Electrospun nanofibers of poly (vinyl alcohol) and chitosan-based emulsions functionalized with cabreuva essential oil. *International Journal of Biological Macromolecules*, 160, 307–318.
- Larsen, G., Velarde-Ortiz, R., Minchow, K., Barrero, A., & Loscertales, I. G. (2003). A method for making inorganic and hybrid (organic/inorganic) fibers and vesicles with diameters in the submicrometer and micrometer range via sol-gel chemistry and electrically forced liquid jets. *Journal of the American Chemical Society*, 125(5), 1154–1155. <https://doi.org/10.1021/ja028983i>
- Lewandowska, K. (2005). The miscibility of poly(vinyl alcohol)/poly(N-vinylpyrrolidone) blends investigated in dilute solutions and solids. *European Polymer Journal*, 41(1), 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2004.08.016>
- Li, D, Wang, Y., & Xia, Y. (2004). Electrospinning nanofibers as uniaxially aligned arrays and layer-by-layer stacked films. *Adv Mater*, 16, 361–366.
- Li, Dan, Wang, Y., & Xia, Y. (2003). Electrospinning of polymeric and ceramic nanofibers as uniaxially aligned arrays. *Nano Letters*, 3(8), 1167–1171. <https://doi.org/10.1021/nl0344256>
- Lippmann, M. (2014). Toxicological and epidemiological studies of cardiovascular effects of ambient air fine particulate matter (PM_{2.5}) and its chemical components: Coherence and public health implications. *Critical Reviews in Toxicology*, 44(4), 299–347. <https://doi.org/10.3109/10408444.2013.861796>
- López-Córdoba, A., Castro, G. R., & Goyanes, S. (2016). A simple green route to obtain poly(vinyl alcohol) electrospun mats with improved water stability for use as potential carriers of drugs. *Materials Science and Engineering C*, 69, 726–732. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.07.058>
- Lu, F., Xu, D., Cheng, Y., Dong, S., Guo, C., Jiang, X., & Zheng, X. (2015). Systematic review and meta-analysis of the adverse health effects of ambient PM_{2.5} and PM₁₀ pollution in the Chinese population. *Environmental Research*, 136, 196–204. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.06.029>
- Luo, C. J., Nangrejo, M., & Edirisinghe, M. (2010). A novel method of selecting solvents for polymer electrospinning. *Polymer*, 51(7), 1654–1662. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2010.01.031>
- Luo, C. J., Stride, E., & Edirisinghe, M. (2012). Mapping the influence of solubility and dielectric constant on electrospinning polycaprolactone solutions. *Macromolecules*, 45(11), 4669–4680.

Capítulo 7: Nanoestructuras funcionalizadas electrohiladas

<https://doi.org/10.1021/ma300656u>

- Madhavan, K., Frid, M. G., Hunter, K., Shandas, R., Stenmark, K. R., & Park, D. (2018). Development of an electrospun biomimetic polyurea scaffold suitable for vascular grafting. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 106(1), 278–290. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33853>
- McKee, M. G., Wilkes, G. L., Colby, R. H., & Long, T. E. (2004). Correlations of Solution Rheology with Electrospun Fiber Formation of Linear and Branched Polyesters. *Macromolecules*, 37(5), 1760–1767. <https://doi.org/10.1021/ma035689h>
- Mohan, S., Oluwafemi, O. S., Kalarikkal, N., Thomas, S., & Songca, S. P. (2016). Biopolymers – Application in Nanoscience and Nanotechnology. *Recent Advances in Biopolymers*. <https://doi.org/10.5772/62225>
- Nagarajan, S., Bechelany, M., & Kalkura, N. S. (2019). Chapter 20 - Electrospun Nanofibers for Drug Delivery in Regenerative Medicine. In *Applications of Targeted Nano Drugs and Delivery Systems*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814029-1.00020-X>
- Nawar, A. M., & El-Mahalawy, A. M. (2020). Heterostructure device based on Brilliant Green nanoparticles–PVA/p-Si interface for analog–digital converting dual-functional sensor applications. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 31(4), 3256–3273. <https://doi.org/10.1007/s10854-020-02874-1>
- Ohkawa, K., Cha, D., Kim, H., Nishida, A., & Yamamoto, H. (2004). Electrospinning of chitosan. *Macromolecular Rapid Communications*, 25(18), 1600–1605. <https://doi.org/10.1002/marc.200400253>
- OPDS. (2018). DECRETO-2018-1074-GDEBA-GPBA. In *Reglamento de la Ley N° 5965* (pp. 1–7). Gobierno de la Provincia de Buenos Aires. [https://www.opds.gba.gov.ar/sites/default/files/Decreto 1074 18.pdf](https://www.opds.gba.gov.ar/sites/default/files/Decreto%201074%2018.pdf)
- Orr, S. B., Chainani, A., Hippensteel, K. J., Kishan, A., Gilchrist, C., Garrigues, N. W., Ruch, D. S., Guilak, F., & Little, D. (2015). Aligned multilayered electrospun scaffolds for rotator cuff tendon tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 24(June), 117–126. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.06.010>
- Pan, C., Han, Y. H., Dong, L., Wang, J., & Gu, Z. Z. (2008). Electrospinning of continuous, large area, latticework fiber onto two-dimensional pin-array collectors. *Journal of Macromolecular Science, Part B: Physics*, 47(4), 735–742. <https://doi.org/10.1080/00222340802118382>
- Pangon, A., Saesoo, S., Saengkrit, N., Ruktanonchai, U., & Intasanta, V. (2016). Multicarboxylic acids as environment-friendly solvents and in situ crosslinkers for chitosan/PVA nanofibers with tunable physicochemical properties and biocompatibility. *Carbohydrate Polymers*, 138, 156–165.
- Pan, H., Li, L., Hu, L., & Cui, X. (2006). Continuous aligned polymer fibers produced by a modified electrospinning method. *Polymer*, 47(14), 4901–4904. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2006.05.012>
- Pérez-Calderón, J., Scian, A., Ducos, M., Santos, V., & Zaritzky, N. (2021). Performance of oxalic acid-chitosan/alumina ceramic biocomposite for the adsorption of a reactive anionic azo dye.

Capítulo 7: Nanoestructuras funcionalizadas electrohiladas

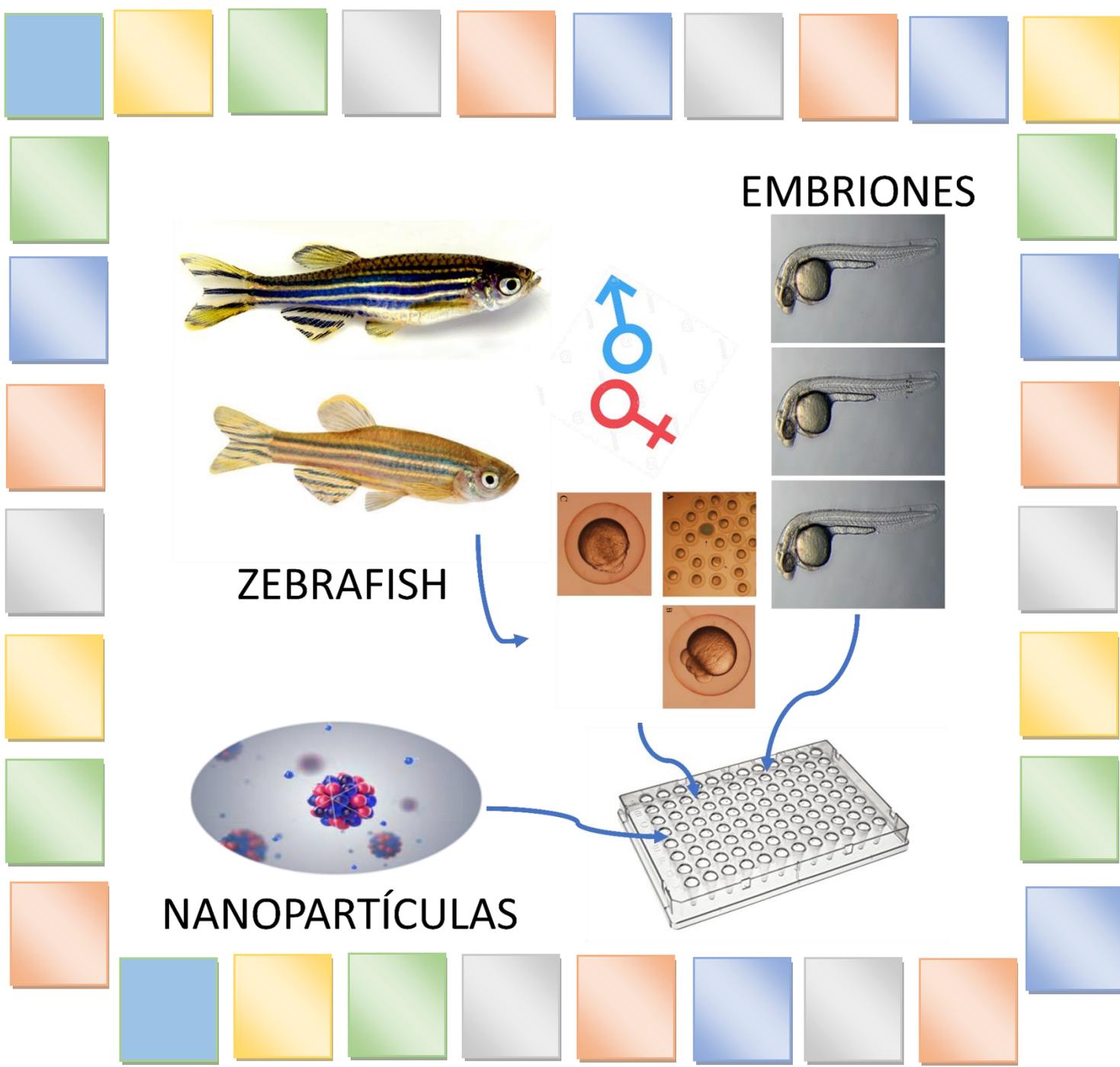
- Environmental Science and Pollution Research*, 1–21. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15123-7>
- Prasad T, Shabeena E, Vinod D, Kumary T, K. P. (2015). Characterization and in vitro evaluation of electrospun chitosan/polycaprolactone blend fibrous mat for skin tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med*, 26, 1–13.
- Qin, X. H. y Wang, S. Y. (2008). Electrospun nanofibers from crosslinked poly (vinyl alcohol) and its filtration efficiency. *Journal of Applied Polymer Science*, 109(2), 951-956.
- Rosas, G. (2008). Materials Characterizations and recent advances in the field of thermal analysis and rheology. *Curso Reología y Análisis Térmico Organizado Por D'Amico Sistemas S.A. y La Universidad Nacional de Quilmes*.
- Santos, C., Silva, C., Buttel, Z., Guimaraes, R., Pereira, S., Tamagnini, P., & Zille, A. (2014). Preparation and characterization of polysaccharides/ PVA blend nanofibrous membranes by electrospinning method. *Carbohydr Polym*, 99, 584–592.
- Sasmal, P., & Datta, P. (2019). Tranexamic acid-loaded chitosan electrospun nanofibers as drug delivery system for hemorrhage control applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 52(April), 559–567. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.05.018>
- Schiffman, J. D., & Schauer, C. L. (2007). One-step electrospinning of cross-linked Chitosan fibers. *Biomacromolecules*, 8(9), 2665–2667. <https://doi.org/10.1021/bm7006983>
- Shankhwar, N., Kumar, M., Mandal, B. B., Robi, P. S., & Srinivasan, A. (2016). Electrospun polyvinyl alcohol-polyvinyl pyrrolidone nanofibrous membranes for interactive wound dressing application. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 27(3), 247–262. <https://doi.org/10.1080/09205063.2015.1120474>
- Smit, E., Buttner, U., & Sanderson, R. D. (2005). Continuous yarns from electrospun fibers. *Polymer*, 46(8), 2419–2423. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2005.02.002>
- Son, W. K., Youk, J. H., Lee, T. S., & Park, W. H. (2004). Electrospinning of ultrafine cellulose acetate fibers: Studies of a new solvent system and deacetylation of ultrafine cellulose acetate fibers. *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics*, 42(1), 5–11. <https://doi.org/10.1002/polb.10668>
- Sosa, B. S., Porta, A., Colman Lerner, J. E., Banda Noriega, R., & Massolo, L. (2017). Human health risk due to variations in PM10-PM2.5 and associated PAHs levels. *Atmospheric Environment*, 160, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2017.04.004>
- Spasova, M., Manolova, N., Paneva, D., & Rashkov, I. (2004). Preparation of chitosan-containing nanofibres by electrospinning of chitosan/poly(ethylene oxide) blend solutions. *E-Polymers*, 056, 1–12. <https://doi.org/10.1515/epoly.2004.4.1.624>
- Srinivasan, G., & Reneker, D. H. (1995). Structure and morphology of small diameter electrospun aramid fibers. *Polymer International*, 36(2), 195–201. <https://doi.org/10.1002/pi.1995.210360210>
- Subbiah, T., Bhat, G. S., Tock, R. W., Parameswaran, S., & Ramkumar, S. S. (2004). *Electrospinning of Nanofibers*. <https://doi.org/10.1002/app.21481>
- Sun, B., Long, Y. Z., Liu, S. L., Huang, Y. Y., Ma, J., Zhang, H. Di, Shen, G., & Xu, S. (2013).

Capítulo 7: Nanoestructuras funcionalizadas electrohiladas

- Fabrication of curled conducting polymer microfibrillar arrays via a novel electrospinning method for stretchable strain sensors. *Nanoscale*, 5(15), 7041–7045. <https://doi.org/10.1039/c3nr01832f>
- Sun, Z., Zussman, E., Yarin, A. L., Wendorff, J. H., & Greiner, A. (2003). Compound Core-Shell Polymer Nanofibers by Co-Electrospinning. *Advanced Materials*, 15(22), 1929–1932. <https://doi.org/10.1002/adma.200305136>
- Teo, W. E., Gopal, R., Ramaseshan, R., Fujihara, K., & Ramakrishna, S. (2007). A dynamic liquid support system for continuous electrospun yarn fabrication. *Polymer*, 48(12), 3400–3405. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2007.04.044>
- Teodorescu, M., Bercea, M., & Morariu, S. (2019). Biomaterials of PVA and PVP in medical and pharmaceutical applications: Perspectives and challenges. *Biotechnology Advances*, 37(1), 109–131. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.008>
- Teodorescu, M., Bercea, M., & Morariu, S. (2018). Biomaterials of Poly(vinyl alcohol) and Natural Polymers. *Polymer Reviews*, 58(2), 247–287. <https://doi.org/10.1080/15583724.2017.1403928>
- Teodorescu, M., Bercea, M., & Morariu, S. (2019). Biomaterials of PVA and PVP in medical and pharmaceutical applications: Perspectives and challenges. *Biotechnology Advances*, 37(1), 109–131. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.008>
- Theron, A., Zussman, E., & Yarin, A. L. (2001). Electrostatic field-assisted alignment of electrospun nanofibres. *Nanotechnology*, 12(3), 384.
- Tiwari, A. P., & Rohiwal, S. S. (2018). Synthesis and Bioconjugation of Hybrid Nanostructures for Biomedical Applications. In *Hybrid Nanostructures for Cancer Theranostics*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813906-6.00002-0>
- Tiwari, S. K., & Venkatraman, S. S. (2012). Importance of viscosity parameters in electrospinning: Of monolithic and core-shell fibers. *Materials Science and Engineering C*, 32(5), 1037–1042. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.02.019>
- Torres-Martinez, E. J., Cornejo Bravo, J. M., Serrano Medina, A., Pérez González, G. L., & Villarreal Gómez, L. J. (2018). A Summary of Electrospun Nanofibers as Drug Delivery System: Drugs Loaded and Biopolymers Used as Matrices. *Current Drug Delivery*, 15(10), 1360–1374. <https://doi.org/10.2174/1567201815666180723114326>
- Tretinnikov, O. N., Sushko, N. I., & Zagorskaya, S. A. (2013). Detection and quantitative determination of the crystalline phase in poly(vinyl alcohol) cryogels by ATR FTIR spectroscopy. *Polymer Science - Series A*, 55(2), 91–97. <https://doi.org/10.1134/S0965545X13020089>
- Tzezana, R., Zussman, E., & Levenberg, S. (2008). A layered ultra-porous scaffold for tissue engineering, created via a hydrospinning method. *Tissue Engineering - Part C: Methods*, 14(4), 281–288. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2008.0201>
- Villarruel, S., Giannuzzi, L., Rivero, S., & Pinotti, A. (2015). Changes induced by UV radiation in the presence of sodium benzoate in films formulated with polyvinyl alcohol and carboxymethyl cellulose. *Materials Science and Engineering C*, 56, 545–554. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.07.003>
- Walser, J., Stok, K. S., Caversaccio, M. D., & Ferguson, S. J. (2016). Direct electrospinning of 3D

Capítulo 7: Nanoestructuras funcionalizadas electrohiladas

- auricle-shaped scaffolds for tissue engineering applications. *Biofabrication*, 8(2), 1–12. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/8/2/025007>
- Wang, C. Y., Liu, J. J., Fan, C. Y., Mo, X. M., Ruan, H. J., & Li, F. F. (2012). The effect of aligned core-shell nanofibres delivering NGF on the promotion of sciatic nerve regeneration. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 23(1–4), 167–184. <https://doi.org/10.1163/092050610X545805>
- WHO. (2006). *Air quality guidelines for particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulphur dioxide. Global update 2005*. World Health Organization.
- Xue, J., Wu, T., Dai, Y., & Xia, Y. (2019). Electrospinning and electrospun nanofibers: Methods, materials, and applications [Review-article]. *Chemical Reviews*, 119(8), 5298–5415. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00593>
- Xue, J., Xie, J., Liu, W., & Xia, Y. (2017). Electrospun Nanofibers: New Concepts, Materials, and Applications. *Accounts of Chemical Research*, 50(8), 1976–1987. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.7b00218>
- Yadav, K. S., Kapse-Mistry, S., Peters, G. J., & Mayur, Y. C. (2019). E-drug delivery: a futuristic approach. *Drug Discovery Today*, 24(4), 1023–1030. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.02.005>
- Yu, D.-G., Zhu, L.-M., White, K., & Branford-White, C. (2009). Electrospun nanofiber-based drug delivery systems. *Health*, 01(02), 67–75. <https://doi.org/10.4236/health.2009.12012>
- Zander, N. E., Orlicki, J. A., Rawlett, A. M., & Beebe, T. P. (2013). Electrospun polycaprolactone scaffolds with tailored porosity using two approaches for enhanced cellular infiltration. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 24(1), 179–187. <https://doi.org/10.1007/s10856-012-4771-7>
- Zhang, Y., Huang, X., Duan, B., Wu, L., Li, S., & Yuan, X. (2007). Preparation of electrospun chitosan/poly(vinyl alcohol) membranes. *Colloid and Polymer Science*, 285(8), 855–863. <https://doi.org/10.1007/s00396-006-1630-4>



Capítulo 8

Estudios de toxicidad y citotoxicidad

Parte I: TOXICIDAD

8.1 INTRODUCCIÓN

El pez cebra o *zebra fish* (*Danio rerio*) es un pez tropical, teleosteo de agua dulce perteneciente a la familia Cyprinidae. El desarrollo de este organismo (embriones y larvas) es rápido y a las 24 horas se observa la segmentación del cerebro y se forman estructuras como el tubo neural, la notocorda y los somitos (precursores de músculo y esqueleto). Para los cinco días de desarrollo se han formado órganos sensoriales como los ojos y los oídos (Figura 8.1). Asimismo, han aparecido el corazón, el hígado, los riñones y el páncreas, además de que los sistemas circulatorio, digestivo y nervioso son perfectamente funcionales (Kimmel 1995).

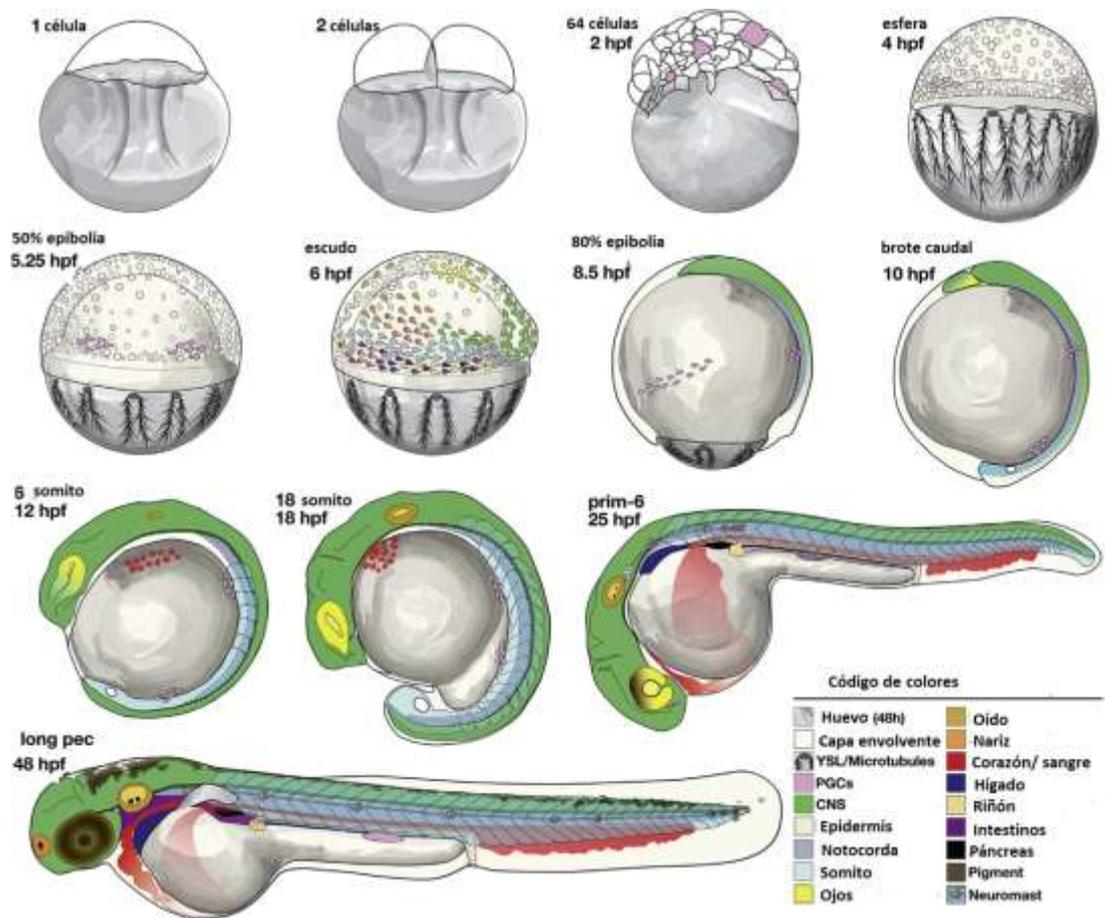


Figura 8.1. Esquema ilustrativo del desarrollo embrionario del pez cebra (*Danio rerio*). Adaptado de Pathak y Barresi (2020).

El uso del modelo del *zebra fish* se ha incrementado considerablemente en el análisis de sustancias tóxicas (Chun y col., 2017; Da y col., 2018; Eryilmaz y col., 2018; Sangabathuni y col., 2017; Vicario-Parés y col., 2018; Bai y Tang, 2020). Se utiliza ampliamente para monitorear contaminantes orgánicos como microplásticos, pesticidas y antibióticos (Qiao y col., 2019; Wang y col., 2018). Numerosas características hacen del *zebra fish* un modelo alternativo notable para estudios toxicológicos de nanomateriales.

En primer lugar, como un organismo multicelular, el *zebra fish* puede proporcionar información más completa en términos de cinética, migración y transformación de nanomateriales que los ensayos de cultivo celular *in vitro*, aunque experimentos *in vitro* se utilizan comúnmente para evaluar el potencial efecto toxicológico de los nanomateriales y se reconocen como eficaces para estudios de toxicidad y genotoxicidad a nivel celular (Gad 2015). En segundo lugar, el *zebra fish* es pequeño en tamaño y simple en cultivo, por lo que es un modelo disponible en laboratorios. Tiene un ciclo de vida más corto y mayor fecundidad que los roedores. Generalmente alcanzan la madurez reproductiva en 3-6 meses postfertilización en condiciones adecuadas, como temperatura, alimentación y densidad de cría (Spence y col., 2008). Las hembras adultas producen embriones a diario y una hembra generalmente puede producir 100-300 embriones a la vez (Castranova y col., 2011). La gran fecundidad del *zebra fish* mejora el análisis y el poder estadístico de los experimentos. En tercer lugar, la embriogénesis y los procesos de desarrollo del *zebra fish* han sido bien estudiados (Kimmel y col., 1995). El rápido desarrollo en comparación con otros modelos de animales representa una ventaja para evaluar la toxicidad (Westerfield 2007). La transparencia durante las etapas embrionarias facilita la observación de los efectos tóxicos, tales como letalidad, toxicidad reproductiva y teratogenicidad (Choi y col., 2016; Ma y col., 2018; Mesquita y col., 2017; Pecoraro y col., 2017).

Debido a que los resultados de toxicidad aguda de embriones y adultos son muy consistentes entre sí, la fase embrionaria ha sido reconocida como una de los métodos alternativos a los ensayos clásicos de toxicidad aguda en peces (Embry y col., 2010). Bioensayos específicos se llevan a cabo de acuerdo con las guías para los ensayos de

toxicidad en peces promulgadas por la Organización de Cooperación Económica y Desarrollo (OCDE TG 236) (OCDE, 2013; Sobanska y col., 2018).

8.2 OBJETIVOS

Evaluar la toxicidad de las suspensiones de nanopartículas, soluciones de quitosano y PVA y nanocompuestos a base de quitosano cargados con nanopartículas utilizando larvas de peces *zebra fish* (*Danio rerio*) como modelo.

8.3 MATERIALES Y MÉTODOS

8.3.1 Obtención de embriones de pez cebra

Para el cuidado de los peces cebra se trabaja en un acuario típico para su cría con unas estanterías que contienen las peceras que los albergan. La cámara donde se encuentran los peces es un lugar cerrado sin ventanas, para evitar que entre la luz solar ya que dispone de un foto-período que simula su ambiente natural – 12 h de luz y 12 h de oscuridad –determinado por un mecanismo regulador de iluminación artificial. Es importante mantener el foto-período para poder controlar la reproducción, puesto que es un factor que está implicado en los procesos fisiológicos, bioquímicos, y en el propio comportamiento del animal. La temperatura de la cámara tiene que estar permanentemente a 28°C por tratarse de peces tropicales. Las peceras se distribuyen de acuerdo a la edad de los peces, alevines, juveniles y adultos (Figura 8.2).

Para obtener los embriones, las hembras y los machos adultos de entre 8 y 12 meses de edad seleccionados para cruce fueron mantenidos separados en acuarios a 28°C la noche anterior al desove. A la mañana siguiente, hembras y machos se juntaron para el desove en una canasta en una proporción 1 a 3, respectivamente (Figura 8.2). Las canastas permitieron que los ovocitos caigan al fondo del acuario evitando que los adultos pudieran alcanzarlos y comerlos. Los ovocitos fueron recolectados y lavados con agua.

La fecundación de los ovocitos de pez cebra ocurre en el medio externo y las etapas del desarrollo embrionario se suceden rápidamente en el interior de una membrana externa acelular denominada corion. Tras 48 hpf, debido a la acción simultánea de enzimas que provocan el “reblandecimiento del corion” (Deok-Ho y col., 2005) y los

movimientos espontáneos de la cola, el embrión se libera del interior del corion, mediante un proceso denominado eclosión.



Figura 8.2. Fotografías de las peceras mostrando los peces cebra y las canastas donde se produce el desove.

Los embriones se colocaron en placas de Petri en un medio salino E3 y fueron incubados en estufa a 28°C. Este medio posee una composición precisa, definida en el año 1992 por la OCDE (Tabla 8.1).

Tabla 8.1. Composición del medio salino E3

Composición del medio E3	Concentración
NaCl	5 mM
KCl	0.17 mM
CaCl ₂ - CaCl ₂ 2H ₂ O	0.33 mM
MgSO ₄ - MgSO ₄ 2H ₂ O	0.33 mM
Azul de metileno*	10 ⁻⁵ % (p/v)

*Usado para evitar la proliferación de algas

Las observaciones de los embriones se realizaron utilizando una lupa estereoscópica (Arcano ZTX 1:4 zoom) evaluando los parámetros morfológicos (Figura 8.3). Se verificó el movimiento del embrión dentro del huevo, la correcta formación de los ojos, la cola separada del cuerpo, entre otros. Los huevos coagulados fueron descartados. Huevos con 1 día de post-fecundación (dpf) se colocaron en placas de 96 pocillos a razón de 3 huevos por pocillo en medio salino E3.



Figura 8.3. Esquema representativo del proceso de selección de las larvas de *zebra fish* para la determinación de toxicidad de una sustancia.

A los 4 dpf las larvas se expusieron a las muestras a ensayar, las cuales fueron suspensiones de nanopartículas de cobre, plata, óxido de titanio, solución de quitosano y películas Q y nanocompuestos a base de Q.

8.3.2 Muestras a ensayar

Para el caso de las soluciones y suspensiones, las mismas se prepararon a las concentraciones usadas fueron las especificadas en los **Capítulos 2, 3, 4 y 5**.

Luego se tomaron 25µl de cada una y se lo colocaron en un *well* completando hasta 250 µl con el medio salino E3 (Tabla 8.1). A continuación se colocaron tres larvas en cada *well*.

En el caso de las películas, se cortaron muestras de 0.5 cm con una agujereadora de aproximadamente 2 mg y se solubilizaron completamente en 1 ml en un *Eppendorf*. Luego se tomaron 25 µl y se procedió de la misma forma que se explicó previamente.

Teniendo en cuenta las concentraciones de quitosano (1%), PVA (1%) y de los metales Ag, Cu y Ti en esa película y la dilución usada, se calcularon las concentraciones que

provocaron modificaciones en los parámetros medidos de las larvas de *zebra fish* (Tabla 8.2).

Tabla 8.2. Concentración de los compuestos usados y sus diluciones expresada en mg/ml

Compuestos	TC	1/10	1/100
Q (mg/ml)	1.0	$1.0 \cdot 10^{-1}$	$3.3 \cdot 10^{-2}$
QTi	1.0+0.3	$(1.0+0.3) \cdot 10^{-1}$	$(1.0+0.3) \cdot 10^{-2}$
QAg	1.0+0.09	$(1.0+0.09) \cdot 10^{-1}$	$(1.0+0.09) \cdot 10^{-2}$
QCu	1.0+0.08	$(1.0+0.08) \cdot 10^{-1}$	$(1.0+0.08) \cdot 10^{-2}$
NpTi	0.30	$0.30 \cdot 10^{-1}$	$0.30 \cdot 10^{-2}$
NpAg	0.093	$0.093 \cdot 10^{-1}$	$0.093 \cdot 10^{-2}$
NpCu	0.076	$0.076 \cdot 10^{-1}$	$0.076 \cdot 10^{-2}$

La toxicidad se verificó midiendo la actividad de nado a los 0, 24 y 48 hpi (Figura 8.4) en un equipo WMicrotracker. El método utilizado para evaluar la movilidad se basó en el descrito por Risi y col. (2019). Se usó un sistema de registro de actividad locomotora, WMicrotrackerTM ONE (PhylumTech, Santa Fe, Argentina), que detecta interrupciones de un haz de luz infrarroja (Figura 8.4). El equipo permite identificar moléculas afectadas por el movimiento de las larvas. Cuando las larvas se mueven a través del haz de luz, se genera una fluctuación transitoria en la señal recibida por el fototransistor y el movimiento se detecta mediante el análisis digital de la salida del fototransistor. Las larvas se retiraron de las placas de cultivo y se lavaron tres veces con solución salina K (NaCl 51 mM, KCl 32 mM) y se colocaron en placas de microtitulación de 96 pocillos.

Finalmente, a las 48 hpi se realizó el recuento de larvas vivas y muertas por observación microscópica y se determinó el valor de dosis letal 50 (DL₅₀) para cada una de las muestras ensayadas usando el programa Statplus. Los resultados obtenidos fueron graficados con el programa GraphPad Prism.

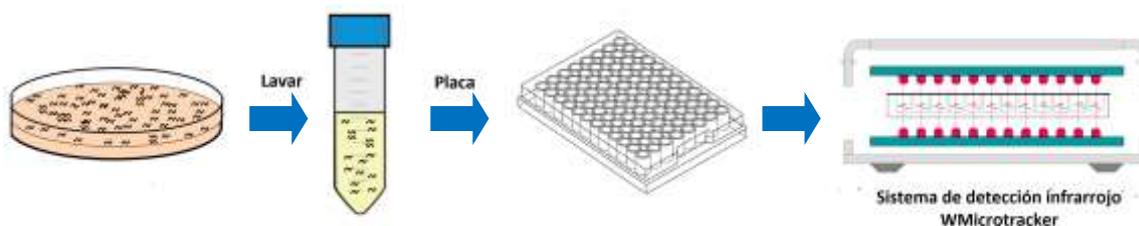


Figura 8.4. Esquema representativo del proceso de preparación de larvas de *zebra fish* para la determinación de movimiento espontáneo en un WMicrotracker. Adaptado de Risi y col. (2019).

8.3.3 Aspectos éticos

La utilización de los embriones de *zebra fish* para los ensayos se produjo antes de las 120 h post-fertilización (hpf). Los protocolos correspondientes a los ensayos en embriones y larvas de *zebra fish* fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales en Experimentación (CICUAL), N° de dictamen: 014-15 (embriones) y 013-15 (larvas).

8.4 RESULTADOS

8.4.1 Movimiento espontáneo

El movimiento espontáneo de las larvas se evaluó al inicio del ensayo (0 hdi), a las 24 y a las 48 hpi (Figura 8.5). Se observó que el contacto de las larvas con PVA o con las nanopartículas y sus diluciones produjo una excitación en las larvas que llevó a un considerable aumento en sus movimientos corporales incrementando de esta forma la actividad de nado pero los valores no fueron significativamente diferentes del comportamiento de las larvas en el control E3. A las 24 sólo se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) con aquellas incubadas con NpCu 1/10 y 1/100 mientras que a las 48 hpi se produjo una desexcitación, coincidiendo la actividad de nado con el nivel de actividad del control. De esta forma, se considera que las concentraciones correspondientes a las diluciones 1/100 no interfirieron con el movimiento de las larvas.

En el caso de las películas solubilizadas, Q y Q 1/10 como las mayores concentraciones de los nanocompuestos solubilizados llevaron a diferencias en el movimiento muy significativas ($p < 0.001$). Este comportamiento mantuvo la misma tendencia a las 24 hpi excepto para QAg 1/10 y a las 48 hpi se replicó con QT_i 1/10.

Evaluación del movimiento espontáneo

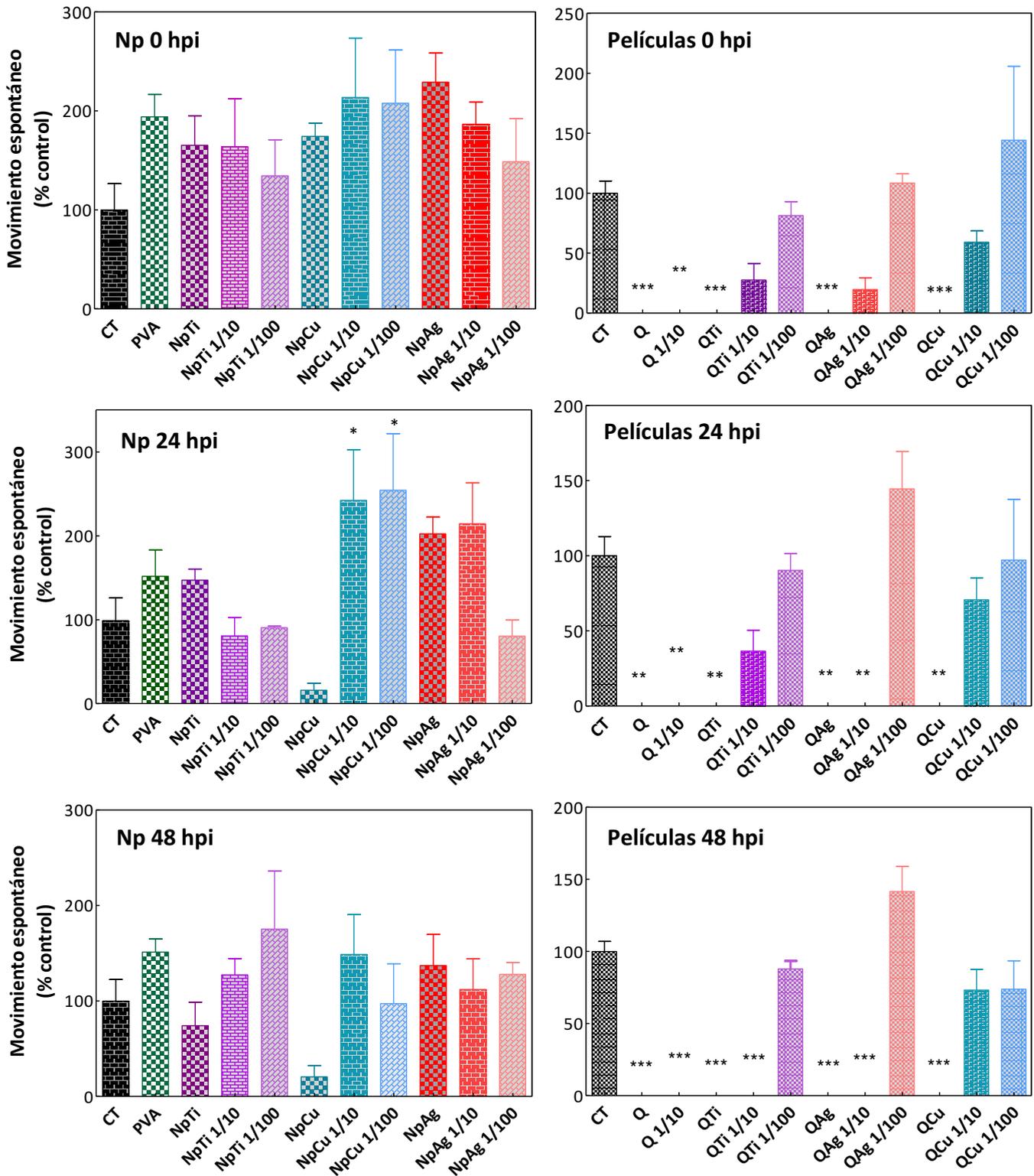


Figura 8.5. Movimiento espontáneo (% del control) de larvas de *zebra fish* determinado a diferentes tiempos en horas post-inicio (hpi) del tratamiento con suspensiones de nanopartículas (NpTi, NpAg y NpCu) y sus diluciones 1/10 y 1/100 y con películas de Q, de PVA, y con nanocompuestos a base de quitosano (QTi, QAg y QCu) y sus diluciones. El medio salino E3 fue usado como control. Los datos son mostrados como media \pm SD. El análisis estadístico fue realizado por ANOVA y el test de Dunnett, comparando todas las muestras contra el control (* $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$)

8.4.2 Morfología

Para la evaluación de la morfología se usó una escala de 0 a 4, donde 0 indica deterioro no visible y 4 muerte según se muestra en la [Figura 8.6](#). En el caso de la incubación de larvas con nanopartículas, se observaron diferencias muy significativas ($p < 0.0001$) en la morfología entre el control y las tratadas con NpCu y su dilución NpCu 1/10. Por otra parte las películas solubilizadas (Q, Q 1/10, QT_i, QAg, QCu) llevaron los valores de toxicidad a 4. Las diluciones de las películas solubilizadas QT_i 1/100, QAg 1/100 y QCu 1/10 y 1/100 no presentaron diferencias significativas con el control E3 ([Figura 8.7](#) y [Figura 8.8](#)).

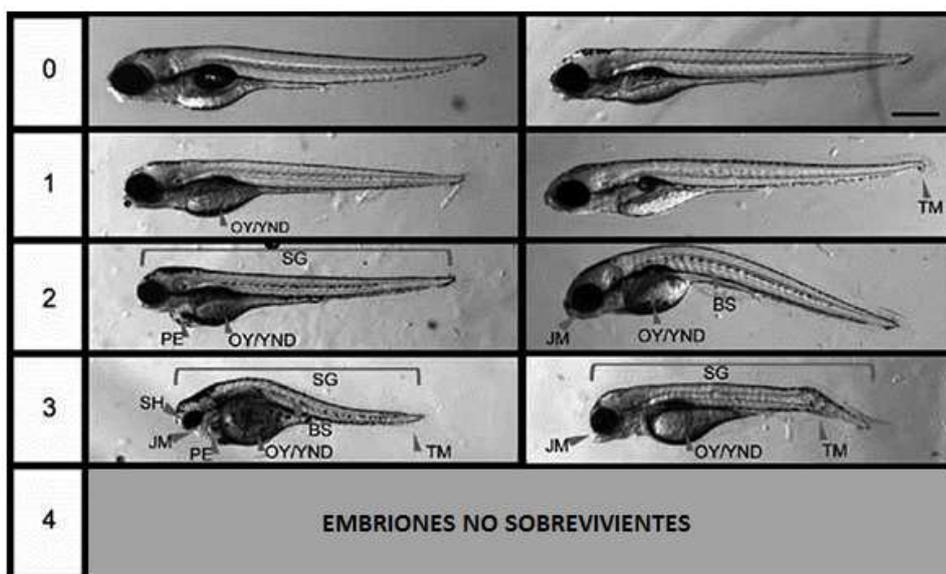


Figura 8.6. Representación del desarrollo de toxicidad inducida por nanopartículas en embriones *zebra fish* a 4, 24, 48, 96 y 120 h post-fertilización. Se otorgó un puntaje a embriones por severidad de defectos morfológicos, supervivencia y efectos tóxicos adversos. Rangos de puntos desde 0 a 4, con 0 indicando deterioro no visible y 4 muerte. Desarrollo de malformaciones incluyen YND, TM, JM, PE, BS y OY. BS, columna doblada; JM, malformación de la mandíbula; OY, yema opaca; PE, edema pericárdico; TM, malformación de la cola; YND, yema no absorbida. Adaptado de Bar-Ilan y col. (2009).

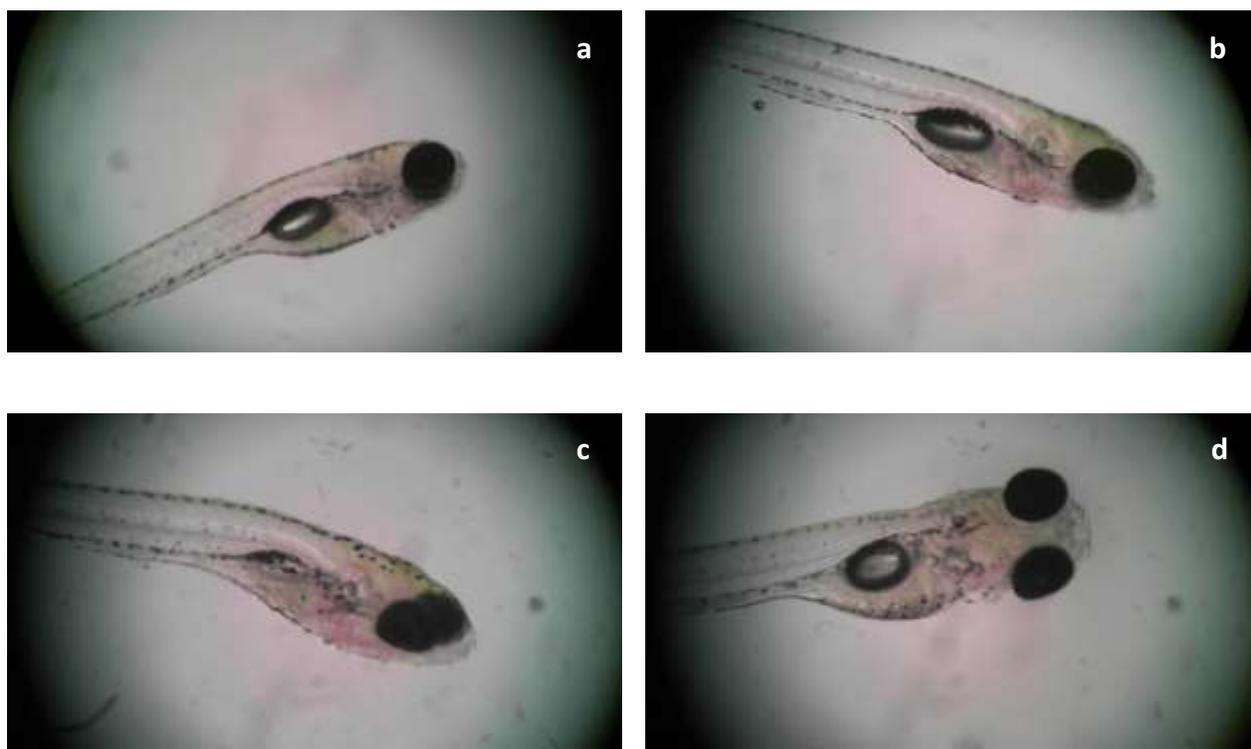


Figura 8.7. Imágenes de larvas de *zebra fish* de 7 dpf (4x) después de 48 hpi immobilizadas en carboximetilcelulosa de sodio: **(a)** y **(b)** control sin tratamiento, **(c)** tratadas con QAg 1/100 y **(d)** tratadas con QCu 1/100.

Evaluación de morfología 48 hpi

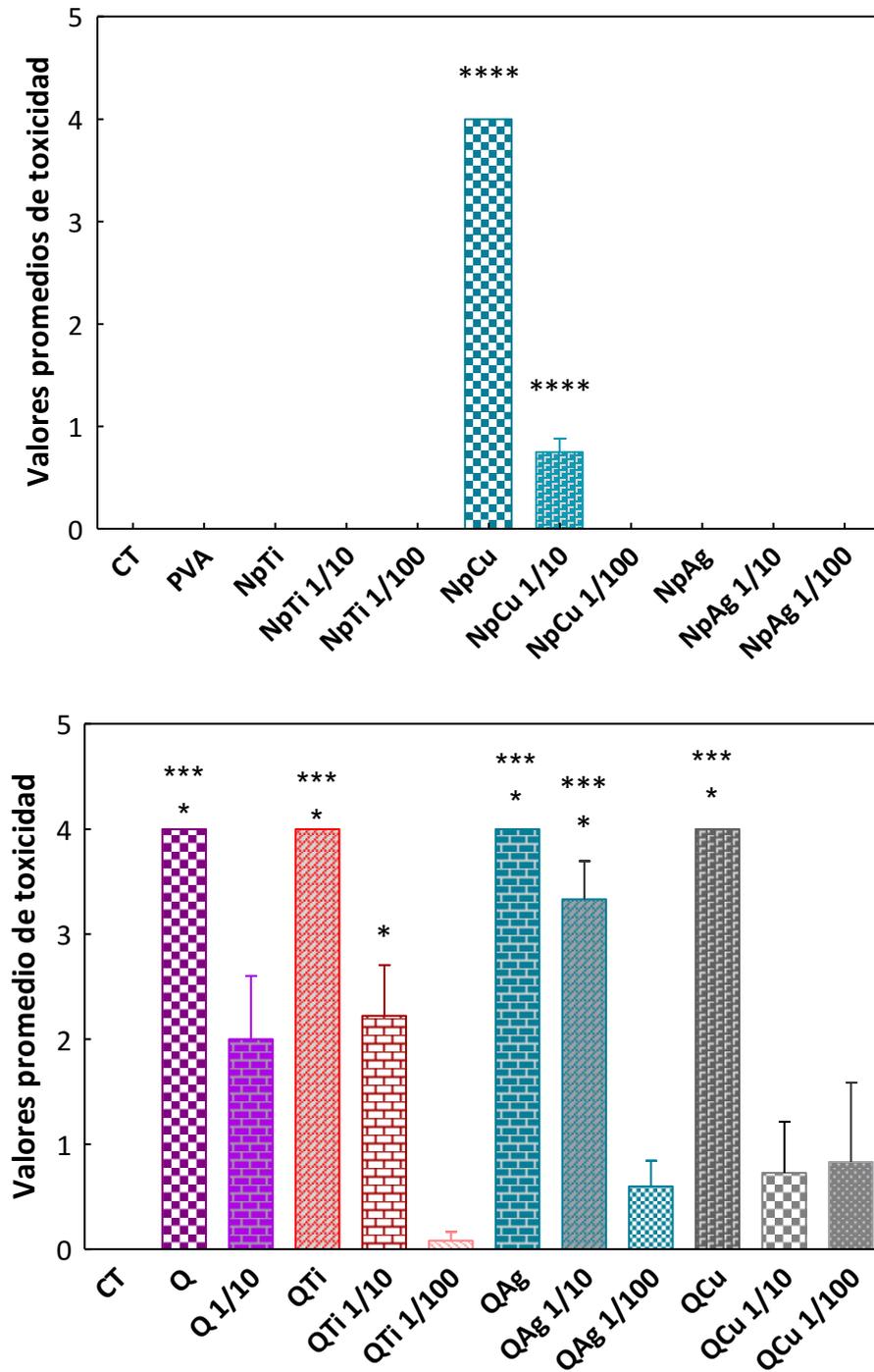


Figura 8.8. Valores promedio de toxicidad de larvas de *zebra fish* después de 48 hpi del tratamiento con nanopartículas de cobre, plata y titanio, y películas de PVA, quitosano y nanocompuestos a base de quitosano (QTi, QAg y QCu) y sus diluciones 1/10 y 1/100. El medio salino E3 fue usado como control. Los datos son mostrados como media \pm SD. El análisis estadístico fue realizado por ANOVA y el test de Dunnett, comparando todas las muestras contra el control (* $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$)

8.4.3 Frecuencia cardíaca (FC)

La frecuencia cardíaca (FC) se evaluó solo para las larvas de *zebra fish* incubadas con las películas que no produjeron cambios significativos en la morfología a las 48 hpi (Figura 8.9). Se analizó la frecuencia cardíaca de larvas tratadas con nanocompuestos solubilizados QAg 1/100, QT_i 1/100, y QCu 1/10 y 1/100. Los valores de FC fueron superiores al control (100%) pero no presentaron diferencia significativas excepto para la dilución QAg 1/100 ($p < 0.05$).

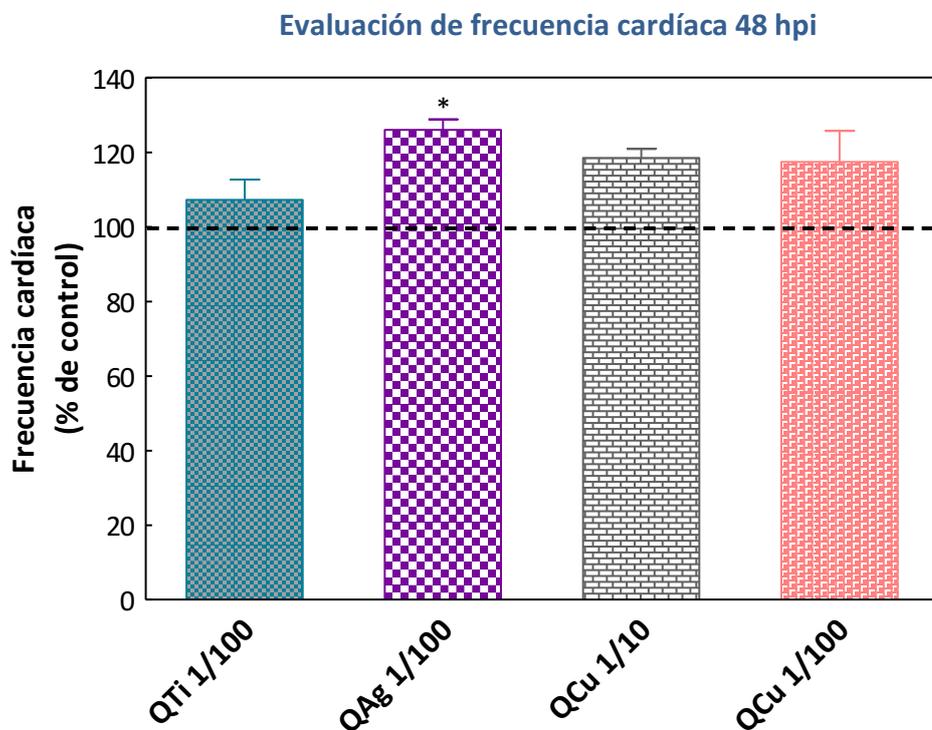


Figura 8.9. Frecuencia cardíaca de larvas de *zebra fish* después de 48 hpi del tratamiento con diluciones 1/10 y 1/100 de nanocompuestos a base de quitosano (QT_i, QAg y QCu). El medio salino E3 fue usado como control. Los datos son mostrados como media \pm SD. El análisis estadístico fue realizado por ANOVA y el test de Dunnett, comparando todas las muestras contra el control ($*p < 0.05$)

8.4.4 Evaluación de la mortalidad

En la evaluación de la mortalidad a distintos tiempos: 0, 24 y 48 hpi se observaron diferencias significativas solo en el caso de las NpCu que produjeron la muerte de casi el 100% de las larvas a las 24 hpi (Figura 8.10). Las NpAg causaron la muerte de menos del 20% de la población mientras que la incubación en presencia del resto de las nanopartículas no llevó la mortalidad a diferencias significativas con respecto al control E3.

Analizando el tratamiento en presencia de los nanocompuestos solubilizados, las curvas de las diluciones 1/100 de QAg, QTi y QCu se superpusieron con la del control mientras que la correspondiente a QCu 1/10 presentó un valor del 13% a las 48hpi. Con el tratamiento con quitosano y el resto de las diluciones de los nanocompuestos la viabilidad no superó el 50% de la población de larvas.

La bibliografía existente acerca de estudios de toxicidad de nanomateriales en embriones de peces cebra es muy reciente y consiste fundamentalmente en el análisis de toxicidad de nanopartículas metálicas, principalmente de oro y plata (Asharani y col., 2008; Cunningham y col., 2013).

Chou y col. (2020) realizaron una evaluación toxicológica de quitosano de bajo peso molecular (QBPM) sobre *zebra fish*. Los autores informaron que los QBPM atacaron y perturbaron la membrana de las células epiteliales para inducir la muerte de larvas. La locomoción de las larvas incubadas con QBPM mostró un comportamiento perturbado hasta la ruptura de la yema. Estos resultados demostraron que el QBPM podría causar daño epitelial en la yema y comportamiento anormal inducido antes de la muerte de las larvas de pez cebra. Además, encontraron que la toxicidad del QBPM podría ser neutralizada por el buffer Na₂HPO₄. La exposición de células a PBS o un tratamiento combinado de Na₂HPO₄ con QBPM, invirtió la viabilidad celular a valores superiores al 100%.

Evaluación de la mortalidad

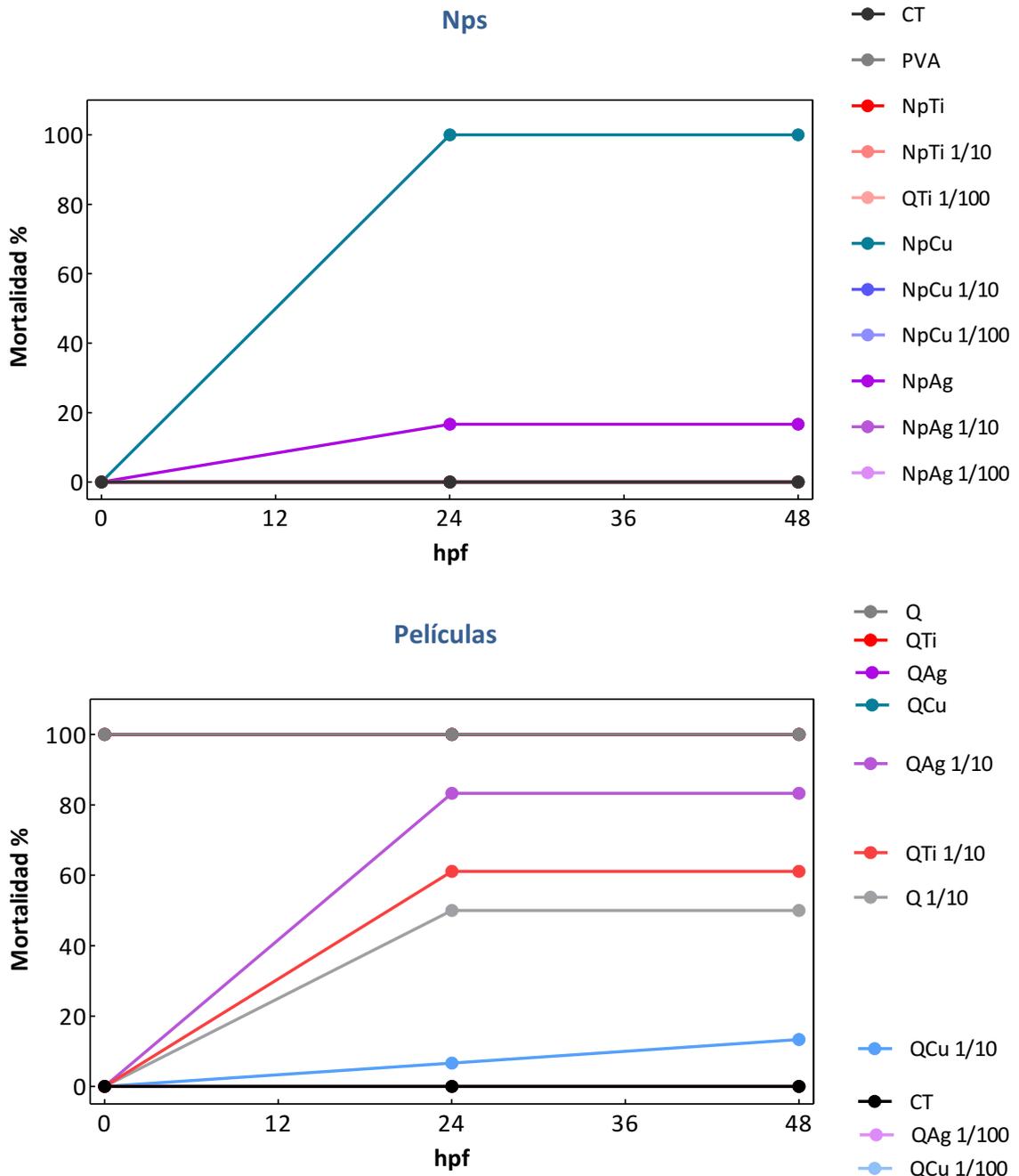


Figura 8.10. Mortalidad % de larvas de *zebra fish* determinado a diferentes tiempos en hpi después del tratamiento con suspensiones de PVA, de nanopartículas (NpTi, NpAg y NpCu) y sus diluciones 1/10 y 1/100 y con películas de Q y nanocompuestos a base de quitosano (QTi, QAg y QCu) y sus diluciones. El medio salino E3 fue usado como control. Los datos son mostrados como media \pm SD. El análisis estadístico fue realizado por ANOVA y el test de Dunnett, comparando todas las muestras contra el control (* $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$).

Kovrižnych y col. (2013) compararon la toxicidad aguda de 31 diferentes nanomateriales (incluidos ocho metales puros, 10 óxidos metálicos) en *zebra fish* adultos y encontraron que las Np de metal y óxido metálico, como NpCu, óxido de magnesio (NpMgO) y NpNi, causaron mortalidad acumulativa.

Bai y col. (2010) estudiaron los efectos de nanopartículas de cobre sobre el desarrollo de embriones de *zebra fish*. Los autores encontraron que el mecanismo de la toxicidad de nano-Cu se relacionó con sus propiedades fisicoquímicas, especialmente tamaño y solubilidad, que rigen las formas existentes de nano-Cu. Las nanopartículas y las especies liberadas podrían desempeñar un papel combinado en la toxicidad para embriones y larvas de pez cebra.

NpCu y NpAg fueron tóxicos para el *zebra fish* con valores de concentración letal media (LC₅₀) de aproximadamente 3 mg/L (Kovrižnych y col., 2013). Tang y col. (2020) investigaron las toxicidades de rutilo NpTiO₂ en embriones y adultos. Los resultados mostraron que la exposición a 100 mg/L NpTiO₂ no tuvo ningún efecto sobre la tasa de eclosión de los embriones de *zebra fish* sin una clara deformidad.

Qiang y col. (2020) informaron que cualquier bioacumulación observada de plata en embriones puede haberse debido tanto a NpAg como a iones de plata. Diferentes autores han informado que la exposición a NpAg o iones plata pueden inducir anomalías fenotípicas similares, como la formación de edema (Ribeiro y col., 2014), natación más lenta por inflamación de la vejiga (Powers y col., 2011), disminución de la actividad de la enzima ATPasa (Osborne y col., 2015) y alteración de la expresión de genes similares asociados con la fosforilación oxidativa, los procesos detoxificantes y la síntesis de proteínas (Osborne y col., 2016; Van Aerle y col., 2015; Xin y col., 2015).

Prakash y col. (2019) midieron la longitud corporal, el número de latidos cardíacos y el porcentaje de supervivencia de peces cebra en presencia de nanopartículas de TiO₂ incorporadas en óxido de grafeno reducido (RGO). El nanocompuesto RGO/TiO₂ mostró una toxicidad muy baja para los embriones a una concentración menor de 30 µg/ml. La toxicidad de los nanocompuestos aumentó con el aumento de la concentración hasta 1.0 mg/ml generando especies reactivas de oxígeno (ROS) y causando teratogenicidad y cardiotoxicidad.

8.5 CONCLUSIONES

La película de quitosano solubilizada y su dilución 1/10 resultaron tóxicas para embriones de *zebra fish*, afectando la locomoción, la frecuencia cardíaca y causando la muerte.

Dado que en este caso se solubilizaron por completo las películas y nanocompuestos debido a la dificultad para conocer la concentración de nanopartículas liberadas en cada caso sería necesario realizar más ensayos con menores concentraciones ya que la solubilidad de los nanocompuestos en general no superó el 25%. O sea el caso ensayado constituye un valor extremo de concentración. También podría probarse un tratamiento combinado de Na_2HPO_4 para revertir la toxicidad o solubilizar el quitosano en ácido láctico en vez de ácido acético que resultaría nocivo para las larvas.

En el caso de las nanopartículas las concentraciones más bajas NpCu/Ag/Ti 1/100 fueron las más inocuas tomando en consideración todos los parámetros analizados.

Los resultados obtenidos confirmaron que el *zebra fish* es un modelo adecuado para estudiar la toxicidad aguda de las nanopartículas.

Parte II: CITOTOXICIDAD

8.6 INTRODUCCIÓN

Las terapias farmacológicas basadas en nanopartículas se han diversificado ampliamente y ya se pueden elaborar nanoestructuras con una gran variedad de fármacos. Los materiales que se utilizan para ellas son de naturaleza variable y depende del uso que se les pretenda dar repercutirá en su composición. Si las nanopartículas son capaces de atravesar membranas biológicas o ser transportadas hacia el interior de las células y alcanzar sitios que los sistemas convencionales de liberación no logran alcanzar, es importante conocer los efectos tóxicos a nivel celular que pueden estar relacionados a su exposición.

Dentro de los eventos tóxicos, que pueden comprometer la función celular por agentes xenobióticos como las nanopartículas, el estrés oxidante celular es un proceso biológico importante en el que hay un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes a nivel celular.

Asimismo, el desarrollo de los biomateriales, considerando el sensible ambiente biológico al que están destinados, requiere su evaluación citotóxica. Es uno de los estudios *in vitro* usados más comúnmente para determinar la biocompatibilidad de un material y presenta una correspondencia de un 97% con los ensayos *in vivo*. Es un estudio simple, rápido y económico que proporciona una valiosa información sobre los materiales potencialmente aplicables.

8.7 MATERIALES Y MÉTODOS

8.7.1 Ensayos de regeneración celular

Para observar la regeneración celular se utilizó un ensayo similar al descrito por [Bucci y col. \(2017\)](#). En este ensayo las células de la línea HaCat-a fueron incubadas durante 24 horas hasta llegar a un conteo de 4×10^4 células por pocillo. Luego de esto se hizo una estría sobre la monocapa formada en el pocillo (césped), para luego cambiar el medio (DMEM) y agregar en pocillos diferentes las películas y las suspensiones. El contacto se mantuvo durante 24 horas. Una vez realizado el proceso se retiraron el medio y las películas, se tiñeron las células con azul de metileno y se observó si se había producido la

regeneración celular. La estría se observó bajo un microscopio (aumento 5X). A las 36 y 72 h después de la herida, las imágenes digitales de las células fueron captadas por un microscopio de contraste de fase (Nikon) equipado con una cámara CCD digital (EOS 1000D, Canon, Milán, Italia).

8.7.2 Ensayos de citotoxicidad *in vitro*

Los ensayos de citotoxicidad *in vitro* se realizaron siguiendo el protocolo descrito por [Bucci y col. \(2017\)](#). Para ello se incubaron células de la línea HaCat-a derivadas de keratinocitos humanos en estado exponencial no confluyente. Las células fueron crecidas en medio RPMI (Roswell Park Cancer Institute) a las cuales se les suplementó suero fetal bovino al 10% v/v y una mezcla de antibióticos y antimicóticos preparada al 1% (penicilina g, estreptomycin y anfotericina B) y 2mM de glutamina al 2%. Se prepararon por separado en placas de 96 pocillos (*wells*) obteniendo una concentración de 5×10^3 células por *well*. Se mantuvieron a una temperatura de 37°C en estufa con 5% de dióxido de carbono (CO₂) hasta que se observó una confluencia del 85%. Las células se pusieron en contacto con 100 µl de las muestras a ensayar diluidas en el mismo medio (sin SFB) por un período de 24 horas en estufa a 37°C. Posteriormente, las muestras fueron removidas y reemplazadas por medio RPMI fresco con 0.5 mg/ml de MTT para determinar la viabilidad celular, durante 30 minutos (hasta que se observaron diversos puntos de color púrpura sobre la monocapa celular). Posteriormente se removió el sobrenadante, se lavó cada pocillo con 200 µl de buffer PBS 1X, y se agregaron 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) a cada uno de ellos ([Bucci y col., 2017](#)). Finalmente, la placa fue revelada en un lector de microplaca Cytation a 570 nm.

La enzima succinato-deshidrogenasa de las células viables con mitocondrias activas escinden el anillo de tetrazolio mediante una reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) de color amarillo a un producto visible de color violeta denominado formazán. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular ([Wagemarker y col., 2015](#)). La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

Para evaluar el efecto citotóxico de los diferentes compuestos usados en la preparación de las películas y los nanocompuestos formulados, se prepararon soluciones de quitosano

1% p/v, poli(vinil alcohol) 1% p/v, polivinil pirrolidona 1% p/v, ácido acético 1% v/v y ácido ascórbico 10% v/v. Asimismo se evaluaron las suspensiones filmogénicas usadas para formular los nanocompuestos con distintas proporciones de nanopartículas de plata, cobre y óxido de titanio así como las suspensiones de nanopartículas y sus diluciones 1/10 y 1/100 (Figura 8.11).

La evaluación de la citotoxicidad de las películas y nanocompuestos se hizo siguiendo un protocolo similar al utilizado por Wang y col. (2013). Para ello, las películas obtenidas se pusieron en contacto directo con el medio de cultivo celular durante 24 horas, para luego realizar los ensayos de citotoxicidad como se mencionó previamente.

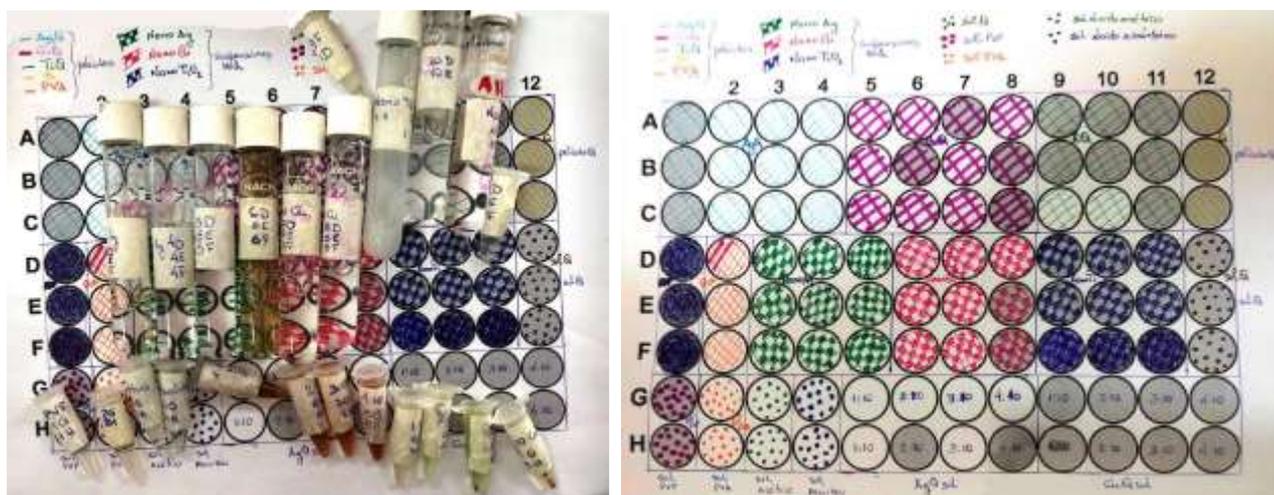


Figura 8.11. Distribución de las muestras en la placa de 96 pocillos o wells

8.8 RESULTADOS

8.8.1 Ensayos de regeneración celular

En las Figuras 8.12-8.14 se observan las fotografías obtenidas de los distintos ensayos de regeneración.

Como ya se explicó en la Sección 8.7 de Materiales y métodos se hizo una estría en el césped de células tal como se observa en la Figuras 8.12-8.14. A partir del ensayo de regeneración celular, se pudo establecer que en presencia de las soluciones de PVA 1% o PVP 1% no se produjo regeneración celular no presentando diferencias con respecto al

control de células (Figura 8.12). El contacto con la película Q 1% podría haber producido cierta regeneración pero los resultados no fueron concluyentes.

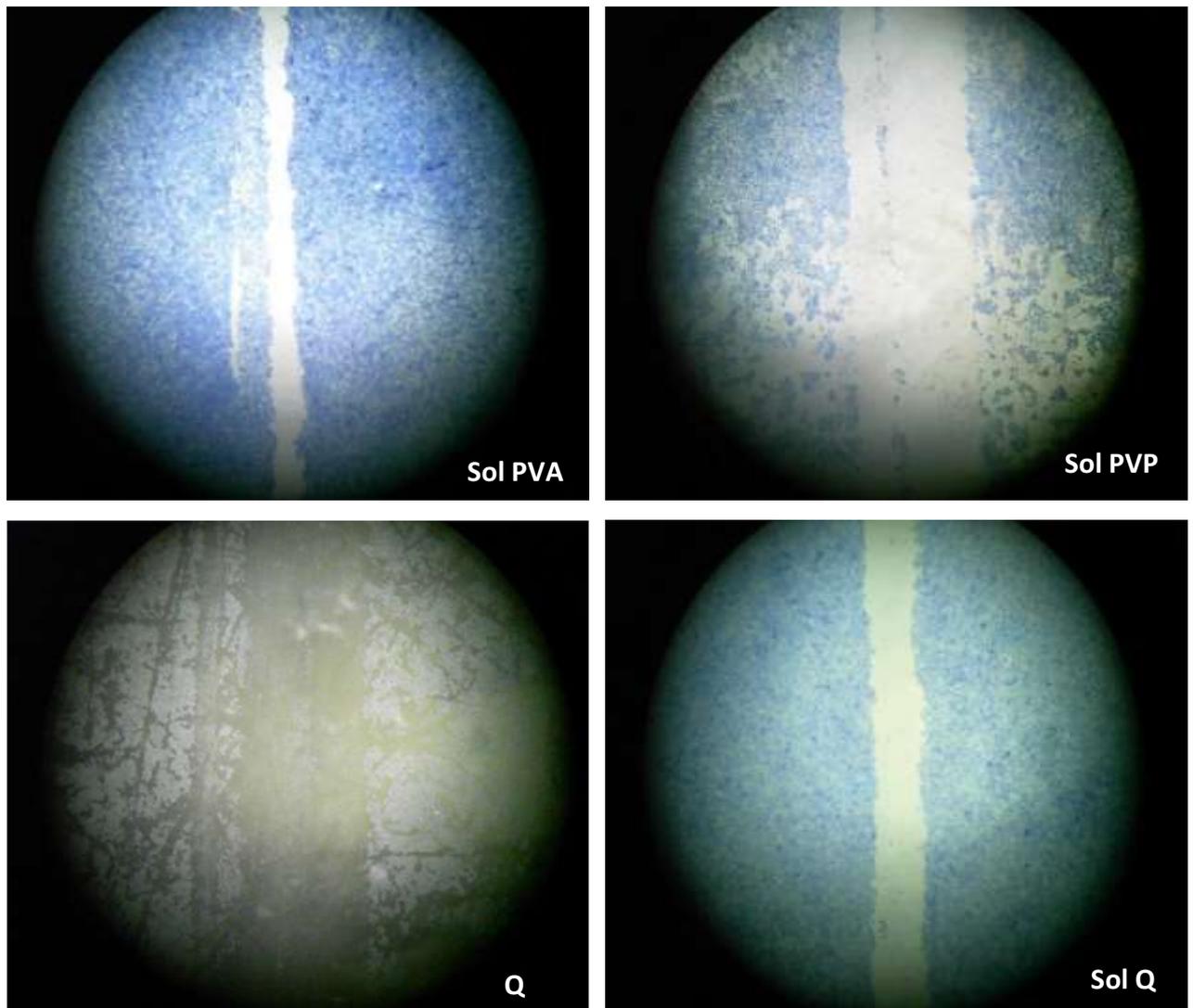


Figura 8.12. Imágenes digitales de regeneración de células incubadas a 37°C durante 24 h con soluciones de PVA, PVP y Q 1% y películas de quitosano.

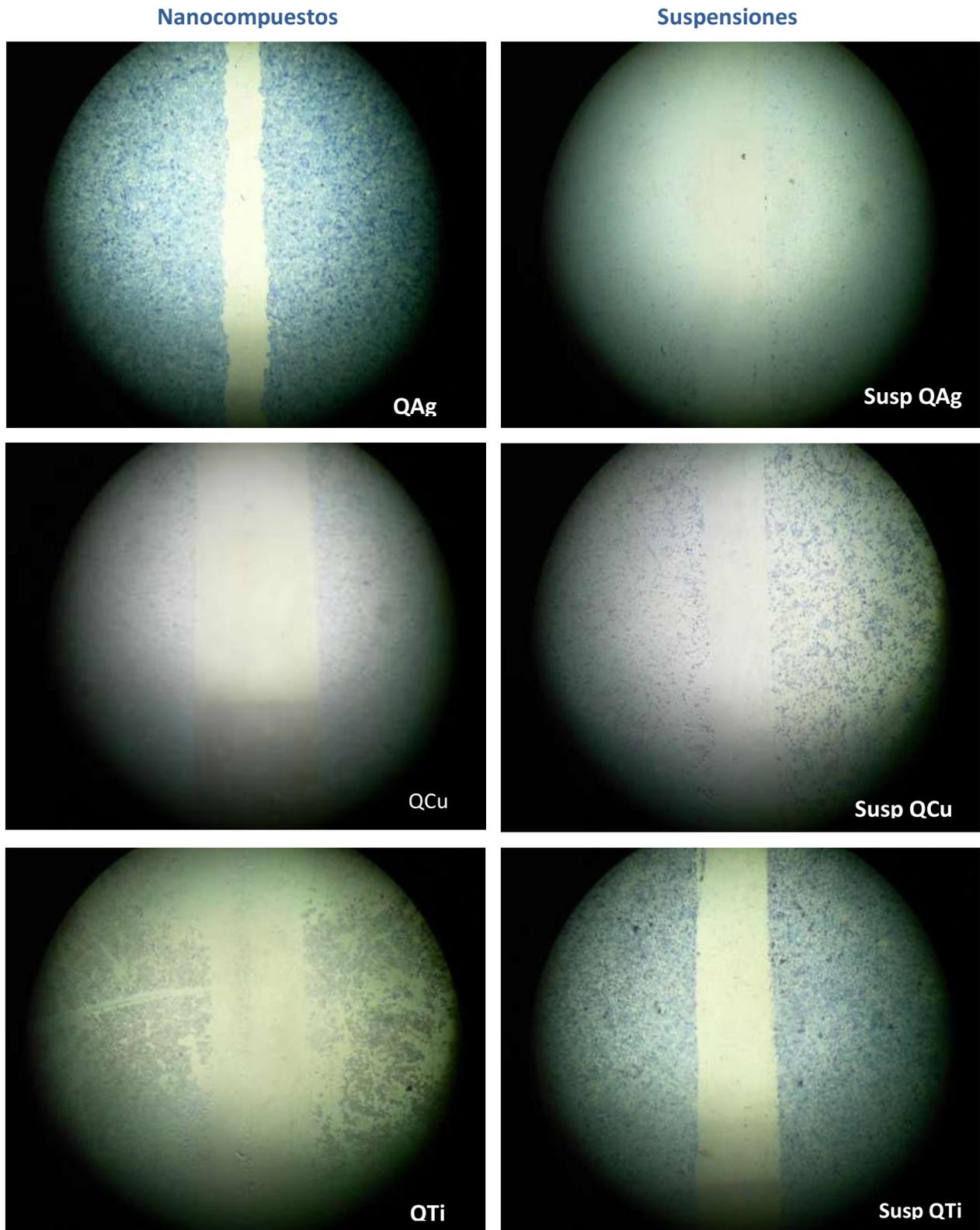


Figura 8.13. Imágenes digitales de regeneración de células incubadas a 37°C durante 24 h con suspensiones de nanopartículas estabilizadas con Q 1% y nanocompuestos a base de quitosano.

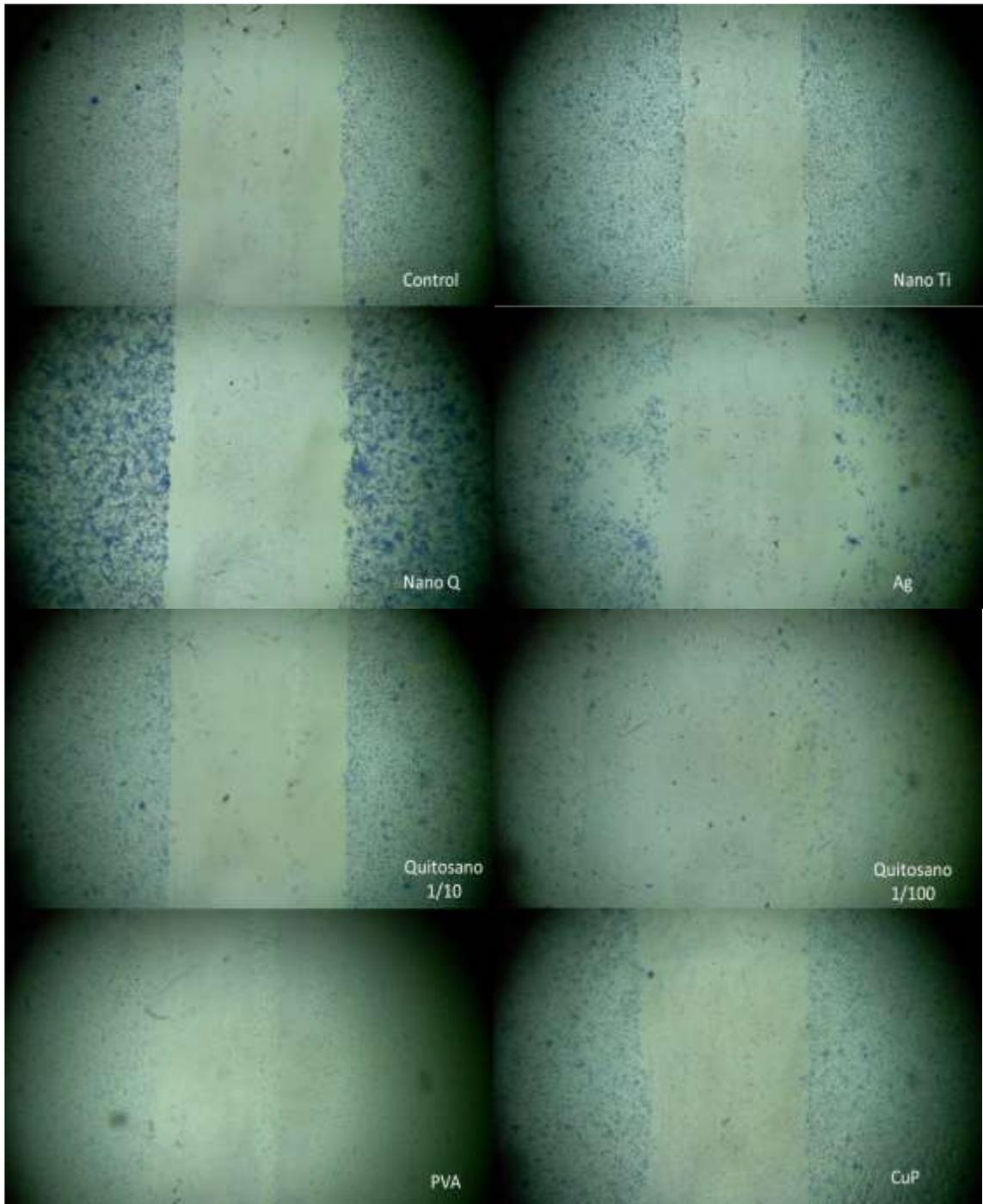


Figura 8.14. Imágenes digitales de regeneración de células incubadas a 37°C durante 24 h con suspensiones de nanopartículas y de quitosano y sus diluciones.

Las suspensiones formuladas no produjeron una regeneración celular visible en la zona de la estría excepto para el caso de la dilución de quitosano 1/100 donde parece haberse producido una leve regeneración celular pero más ensayos se necesitarían para verificar este resultado (Figura 8.14).

8.8.2 Viabilidad celular

La [Figura 8.15-8.18](#) muestra el porcentaje de viabilidad de las células de la línea HaCat-a derivada de keratinocitos humanos después de 24 horas de contacto con los compuestos mencionados anteriormente, así como sus respectivas diluciones. Con las soluciones ensayadas, las células experimentaron una disminución de la viabilidad con respecto al control pero no fue significativa ($p < 0.05$) excepto en el caso del ácido acético. En esos casos la viabilidad fue superior al 75% ([Figura 8.15](#)).

Las suspensiones de nanopartículas con proporción creciente de nanopartículas llevó a una disminución de la viabilidad celular especialmente significativa en el caso de la suspensión de NpAg ([Figura 8.16](#)). Con respecto a estos resultados hay que puntualizar que en la mayoría de los estudios realizados *in vitro*, se ha observado que la respuesta celular se encuentra afectada de una manera dependiente a la concentración de las Np. De forma general se puede decir que las Np de TiO₂ no afectaron a la viabilidad celular, sin embargo muchos resultados aparentemente diferentes han sido descritos por diferentes grupos de investigación. Por ello estos datos observados están en concordancia con ciertos estudios y en contradicción con otros.

Para las Np estabilizadas con quitosano se registró un aumento en la viabilidad celular que fue mayor para las diluciones 1/10 y 1/100. A su vez en las suspensiones filmogénicas con mayores proporciones de quitosano (QAg₁, QCu₁ y QT₁₀) se observó una biocompatibilidad superior a través de los resultados del ensayo de MTT.

Las suspensiones de Np no modificadas produjeron una reducción de la viabilidad celular especialmente en los casos de NpCu y NpTi en comparación con el control ([Figura 8.17](#)). Según [Huang y Yang \(2004\)](#), el incremento en la biocompatibilidad sería debido tanto a la reducción de los iones plata liberados como a la biocompatibilidad del quitosano por sí mismo. Los iones Ag⁺ quedarían atrapados en la matriz polimérica por interacciones con los grupos funcionales del polielectrolito especialmente grupos amino.

Una tendencia similar fue informada por [Cinteza y col. \(2018\)](#) trabajando con nanopartículas de plata combinadas con quitosano.

En todos los casos en los cuales se evaluó la citotoxicidad de las películas la viabilidad celular fue superior al 50% lo cual indica que estos materiales son aptos para ser utilizados como biomateriales (Pereira da Silva y col. 2016) (Figura 8.18).

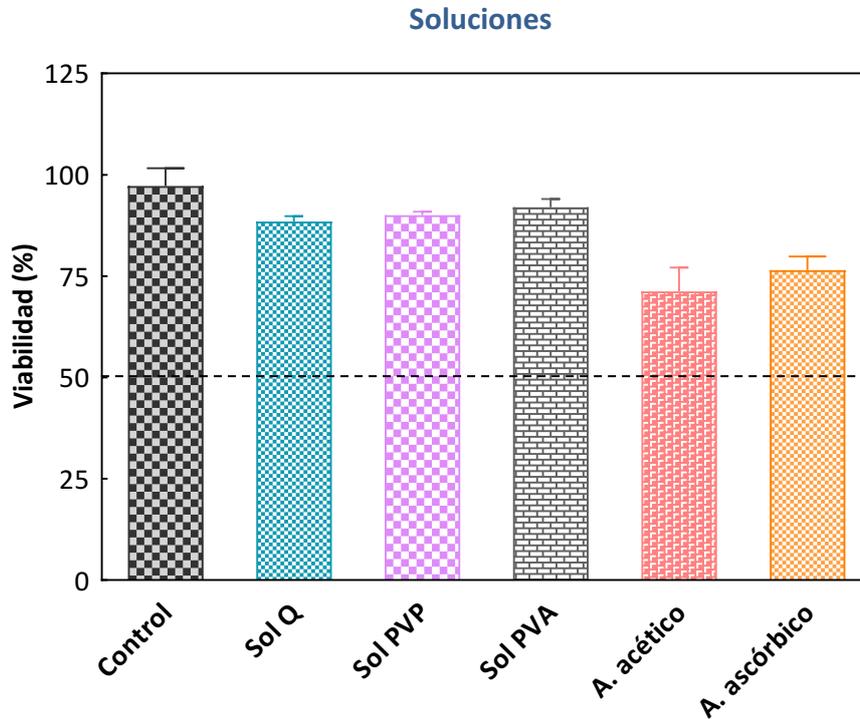


Figura 8.15. Porcentaje de viabilidad de las células de la línea HaCat-a derivadas de keratinocitos humanos frente a la solución control (1g l^{-1}) y a las soluciones usadas en la formulación de los nanocompuestos.

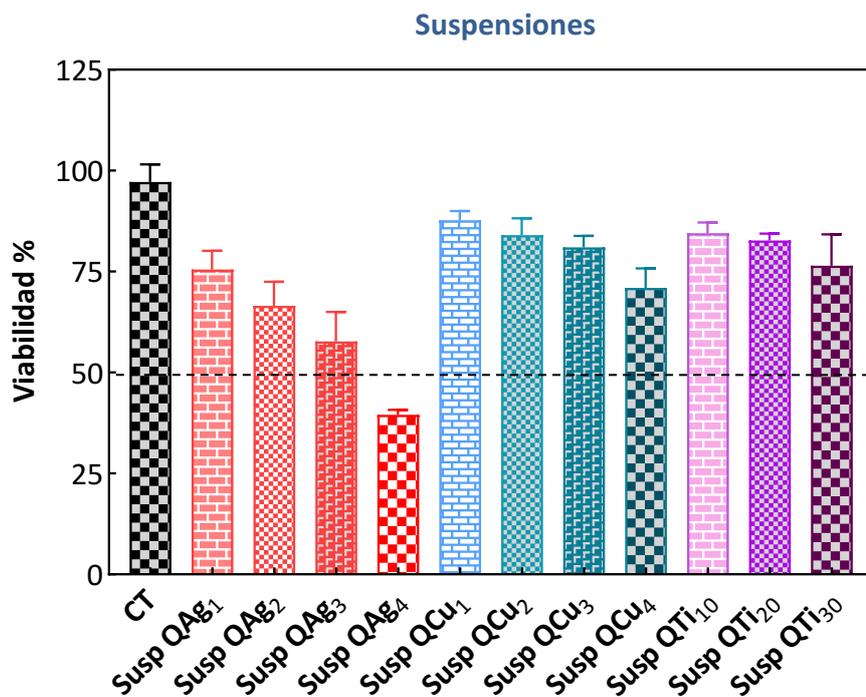


Figura 8.16. Porcentaje de viabilidad de las células de la línea HaCat-a derivadas de keratinocitos humanos frente a la solución CT (1g l^{-1}) y las suspensiones filmogénicas de los nanocompuestos con distintas proporciones de nanopartículas de plata, cobre y óxido de titanio.

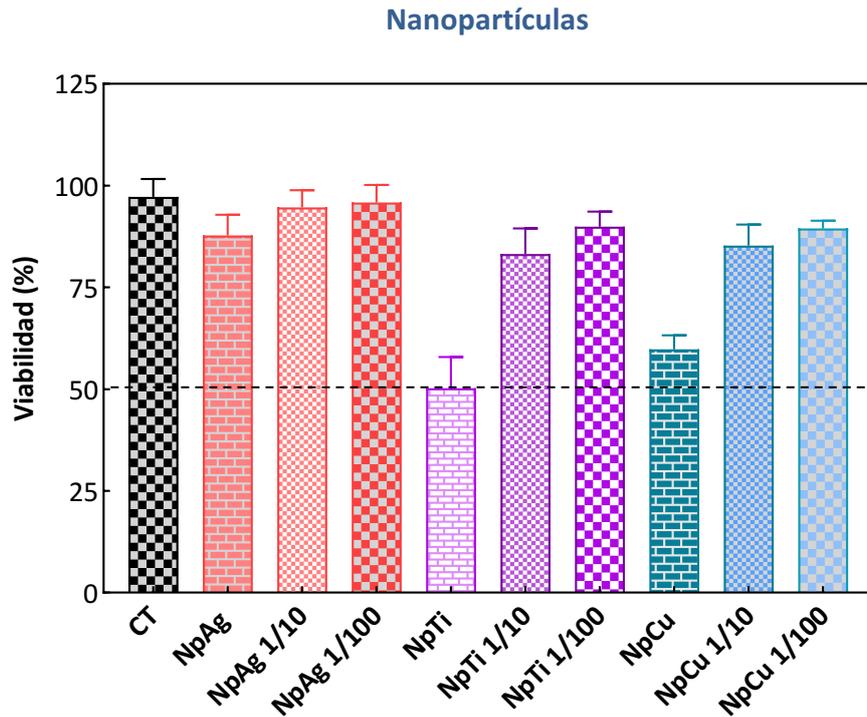


Figura 8.17. Porcentaje de viabilidad de las células de la línea HaCat-a derivadas de keratinocitos humanos frente a la solución CT (1g l^{-1}) y las suspensiones de nanopartículas de plata, cobre y óxido de titanio y sus diluciones 1/10 y 1/100.

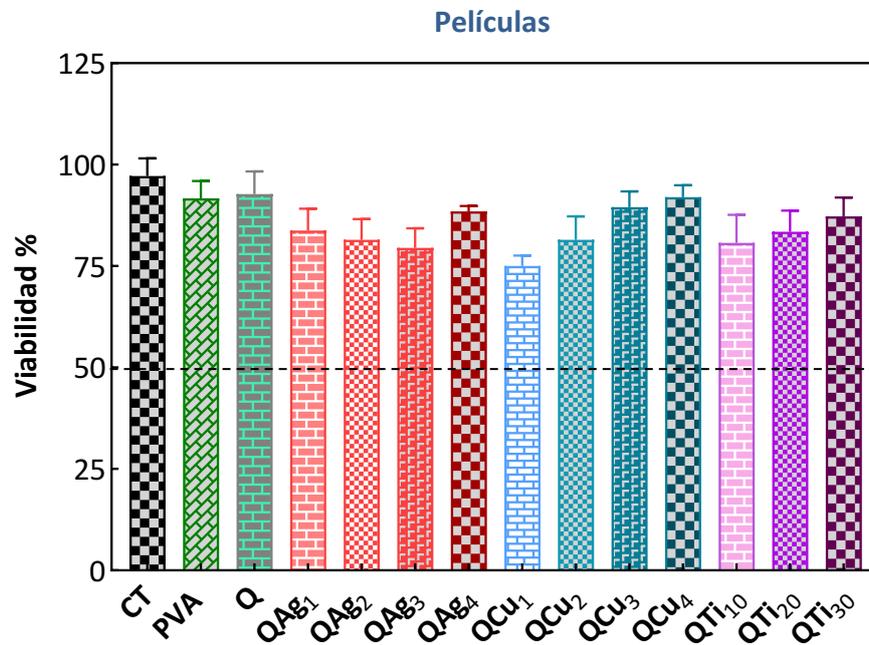


Figura 8.18. Porcentaje de viabilidad de las células de la línea HaCat-a derivadas de keratinocitos humanos frente a la solución CT (1g l^{-1}) y películas de PVA, Q y nanocompuestos con distintas proporciones de nanopartículas de plata, cobre y óxido de titanio.

8.9 CONCLUSIONES

El procedimiento *in vitro* resultó adecuado para estudiar la citotoxicidad de los nanocompuestos basados en quitosano y las suspensiones de nanopartículas tanto aisladas como combinadas con quitosano.

Las películas funcionalizadas permitieron una alta viabilidad de las células de la línea HaCat-a y solo resultaron citotóxicas las suspensiones con mayor contenido de nanopartículas. Sin embargo ni los nanocompuestos ni las suspensiones mostraron capacidad para producir regeneración celular al cabo de 24 horas de contacto.

A pesar de que el quitosano se ha estudiado ampliamente para el desarrollo de vendas para heridas y nanoestructuras biológicas para ingeniería de tejidos, el biopolímero tiene una variabilidad intrínseca debido a su origen natural. El quitosano cambia de acuerdo a la composición o proceso de fabricación, por lo que la biocompatibilidad *in vitro* de apósitos a base de quitosano debería ser evaluada a nivel celular y molecular.

8.10 REFERENCIAS

- Asharani, P. V., Lian Wu, Y., Gong, Z., & Valiyaveetil, S. (2008). Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotechnology*, 19(25). <https://doi.org/10.1088/0957-4484/19/25/255102>
- Bai, C., & Tang, M. (2020). Toxicological study of metal and metal oxide nanoparticles in zebrafish. *Journal of Applied Toxicology*, 40(1), 37–63. <https://doi.org/10.1002/jat.3910>
- Bai, W., Tian, W., Zhang, Z., He, X., Ma, Y., Liu, N., & Chai, Z. (2010). Effects of copper nanoparticles on the development of zebrafish embryos. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 10(12), 8670–8676. <https://doi.org/10.1166/jnn.2010.2686>
- Bar-Ilan, O., Albrecht, R. M., Fako, V. E., & Furgeson, D. Y. (2009). Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos. *Small*, 5(16), 1897–1910. <https://doi.org/10.1002/sml.200801716>
- Bucci, P., Prieto, M. J., Milla, L., Calienni, M. N., Martinez, L., Rivarola, V., & Montanari, J. (2018). Skin penetration and UV-damage prevention by nanoberries. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 17(5), 889-899. <https://doi.org/10.1111/jocd.12436>
- Castranova, D., Lawton, A., Lawrence, C., Baumann, D. P., Best, J., Coscolla, J., Doherty, A., Ramos, J., Hakkesteeg, J., Wang, C., Wilson, C., Malley, J., & Weinstein, B. M. (2011). The effect of stocking densities on reproductive performance in laboratory zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish*, 8(3), 141–146. <https://doi.org/10.1089/zeb.2011.0688>
- Cinteza, L. O., Scamorosenco, C., Voicu, S. N., Nistor, C. L., Nitu, S. G., Trica, B., ... & Petcu, C. (2018). Chitosan-stabilized Ag nanoparticles with superior biocompatibility and their synergistic antibacterial effect in mixtures with essential oils. *Nanomaterials*, 8(10), 826.
- Choi, J. S., Kim, R. O., Yoon, S., & Kim, W. K. (2016). Developmental Toxicity of Zinc Oxide Nanoparticles to Zebrafish (*Danio rerio*): A transcriptomic analysis. *PLoS ONE*, 11(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160763>
- Chou, C. M., Mi, F. L., Horng, J. L., Lin, L. Y., Tsai, M. L., Liu, C. L., Lu, K. Y., Chu, C. Y., Chen, Y. T., Lee, Y. L. A., & Cheng, C. H. (2020). Characterization and toxicology evaluation of low molecular weight chitosan on zebrafish. *Carbohydrate Polymers*, 240(April 2019), 116164. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116164>
- Chun, H. S., Park, D., Eun Lim, S., Jeong, K. H., Park, J. S., Park, H. J., Kang, S., Kang, K. S., Park, H. G., An, H. R., Huh, Y. S., & Lee, Y. C. (2017). Two zinc-aminoclays' in-vitro cytotoxicity assessment in HeLa cells and in-vivo embryotoxicity assay in zebrafish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 137(November 2016), 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.11.022>
- Cunningham, S., Brennan-Fournet, M. E., Ledwith, D., Byrnes, L., & Joshi, L. (2013). Effect of nanoparticle stabilization and physicochemical properties on exposure outcome: Acute toxicity of silver nanoparticle preparations in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science and Technology*, 47(8), 3883–3892. <https://doi.org/10.1021/es303695f>
- Da Silva, G. H., Clemente, Z., Khan, L. U., Coa, F., Neto, L. L. R., Carvalho, H. W. P., Castro, V. L., Martinez, D. S. T., & Monteiro, R. T. R. (2018). Toxicity assessment of TiO₂-MWCNT nanohybrid material with enhanced photocatalytic activity on *Danio rerio* (Zebrafish) embryos.

- Ecotoxicology and Environmental Safety*, 165(March), 136–143.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.08.093>
- Embry, M. R., Belanger, S. E., Braunbeck, T. A., Galay-Burgos, M., Halder, M., Hinton, D. E., Léonard, M. A., Lillicrap, A., Norberg-King, T., & Whale, G. (2010). The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. *Aquatic Toxicology*, 97(2), 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.12.008>
- Eryilmaz, O., Ateş, P. S., Ünal, İ., Üstündağ, Ü. V., Bay, S., Alturfan, A. A., Yiğitbaşı, T., Emekli-Alturfan, E., & Akalın, M. (2018). Evaluation of the interaction between proliferation, oxidant–antioxidant status, Wnt pathway, and apoptosis in zebrafish embryos exposed to silver nanoparticles used in textile industry. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 32(1), 3–9. <https://doi.org/10.1002/jbt.22015>
- Felice, F., Zambito, Y., Belardinelli, E., Fabiano, A., Santoni, T., & Di Stefano, R. (2015). Effect of different chitosan derivatives on in vitro scratch wound assay: A comparative study. *International Journal of Biological Macromolecules*, 76, 236–241.
- Gad, S. C. (2006). *Animal models in toxicology* (2nd Editio). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420014204>
- Huang, H., & Yang, X. (2004). Synthesis of polysaccharide-stabilized gold and silver nanoparticles: a green method. *Carbohydrate Research*, 339, 2627–2631.
- Kim, D. H., Hwang, C. N., Sun, Y., Lee, S. H., Kim, B., & Nelson, B. J. (2006). Mechanical analysis of chorion softening in prehatching stages of zebrafish embryos. *IEEE Transactions on Nanobioscience*, 5(2), 89–94. <https://doi.org/10.1109/TNB.2006.875054>
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203(3), 253–310. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>
- Kovřížnych, J. A., Sotníkova, R., Zeljenková, D., Rollerová, E., Szabová, E., & Wimmerová, S. (2013). Acute toxicity of 31 different nanoparticles to zebrafish (*Danio rerio*) tested in adulthood and in early life stages - Comparative study. *Interdisciplinary Toxicology*, 6(2), 67–73. <https://doi.org/10.2478/intox-2013-0012>
- Lee, K. J., Browning, L. M., Nallathamby, P. D., Osgood, C. J., & Xu, X. H. N. (2013). Silver nanoparticles induce developmental stage-specific embryonic phenotypes in zebrafish. *Nanoscale*, 5(23), 11625–11636. <https://doi.org/10.1039/c3nr03210h>
- Ma, Y. B., Lu, C. J., Junaid, M., Jia, P. P., Yang, L., Zhang, J. H., & Pei, D. S. (2018). Potential adverse outcome pathway (AOP) of silver nanoparticles mediated reproductive toxicity in zebrafish. *Chemosphere*, 207, 320–328. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.019>
- Mesquita, B., Lopes, I., Silva, S., Bessa, M. J., Starykevich, M., Carneiro, J., Galvão, T. L. P., Ferreira, M. G. S., Tedim, J., Teixeira, J. P., & Fraga, S. (2017). Gold nanorods induce early embryonic developmental delay and lethality in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues*, 80(13–15), 672–687. <https://doi.org/10.1080/15287394.2017.1331597>

- OECD, G. for the T. of C. (2013). Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. In *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals* (p. 22). <https://doi.org/10.1787/9789264203709-en>
- Osborne, O. J., Lin, S., Chang, C. H., Ji, Z., Yu, X., Wang, X., Lin, S., Xia, T., & Nel, A. E. (2015). Organ-Specific and Size-Dependent Ag Nanoparticle Toxicity in Gills and Intestines of Adult Zebrafish. *ACS Nano*, *9*(10), 9573–9584. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b04583>
- Osborne, O. J., Mukaigasa, K., Nakajima, H., Stolpe, B., Romer, I., Philips, U., Lynch, I., Mourabit, S., Hirose, S., Lead, J. R., Kobayashi, M., Kudoh, T., & Tyler, C. R. (2016). Sensory systems and ionocytes are targets for silver nanoparticle effects in fish. *Nanotoxicology*, *10*(9), 1276–1286. <https://doi.org/10.1080/17435390.2016.1206147>
- Pathak, N. H., & Barresi, M. J. F. (2019). Zebrafish as a model to understand vertebrate development. In *The Zebrafish in Biomedical Research: Biology, Husbandry, Diseases, and Research Applications*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812431-4.00045-2>
- Pecoraro, R., Salvaggio, A., Marino, F., Caro, G. Di, Capparucci, F., Lombardo, B. M., Messina, G., Scalisi, E. M., Tummino, M., Loreto, F., D'Amante, G., Avola, R., Tibullo, D., & Brundo, M. V. (2017). Metallic nano-composite toxicity evaluation by zebrafish embryo toxicity test with identification of specific exposure biomarkers. *Current Protocols in Toxicology*, *2017*, 1.14.1-1.14.13. <https://doi.org/10.1002/cptx.34>
- Powers, C. M., Slotkin, T. A., Seidler, F. J., Badireddy, A. R., & Padilla, S. (2011). Silver nanoparticles alter zebrafish development and larval behavior: Distinct roles for particle size, coating and composition. *Neurotoxicology and Teratology*, *33*(6), 708–714. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2011.02.002>
- Prakash, J., Venkatesan, M., Sebastian Prakash J, J., Bharath, G., Anwer, S., Veluswamy, P., Prema, D., Venkataprasanna, K. S., & Venkatasubbu, G. D. (2019). Investigations on the in-vivo toxicity analysis of reduced graphene oxide/TiO₂ nanocomposite in zebrafish embryo and larvae (*Danio rerio*). *Applied Surface Science*, *481*(March), 1360–1369. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2019.03.287>
- Qiang, L., Arabeyyat, Z. H., Xin, Q., Paunov, V. N., Dale, I. J. F., Mills, R. I. L., Rotchell, J. M., & Cheng, J. (2020). Silver nanoparticles in Zebrafish (*Danio rerio*) embryos: Uptake, growth and molecular responses. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(5), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms21051876>
- Qiao, R., Lu, K., Deng, Y., Ren, H., & Zhang, Y. (2019). Combined effects of polystyrene microplastics and natural organic matter on the accumulation and toxicity of copper in zebrafish. *Science of the Total Environment*, *682*, 128–137. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.163>
- Ribeiro, F., Gallego-Urrea, J. A., Jurkschat, K., Crossley, A., Hassellöv, M., Taylor, C., Soares, A. M. V. M., & Loureiro, S. (2014). Silver nanoparticles and silver nitrate induce high toxicity to *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio*. *Science of the Total Environment*, *466–467*, 232–241. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.06.101>
- Risi, G., Aguilera, E., Ladós, E., Suárez, G., Carrera, I., Álvarez, G., & Salinas, G. (2019). *Caenorhabditis elegans* infrared-based motility assay identified new hits for nematicide drug

- development. *Veterinary Sciences*, 6(1). <https://doi.org/10.3390/VETSCI6010029>
- Sangabathuni, S., Murthy, R. V., Chaudhary, P. M., Subramani, B., Toraskar, S., & Kikkeri, R. (2017). Mapping the glyco-gold nanoparticles of different shapes toxicity, biodistribution and sequestration in adult zebrafish. *Scientific Reports*, 7(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03350-3>
- Scopel, C. F. V., Sousa, C., Machado, M. R. F., & Dos Santos, W. G. (2021). Bpa toxicity during development of zebrafish embryo. *Brazilian Journal of Biology*, 81(2), 437–447. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.230562>
- Sobanska, M., Scholz, S., Nyman, A. M., Cesnaitis, R., Gutierrez Alonso, S., Klüver, N., Kühne, R., Tyle, H., de Knecht, J., Dang, Z., Lundbergh, I., Carlon, C., & De Coen, W. (2018). Applicability of the fish embryo acute toxicity (FET) test (OECD 236) in the regulatory context of Registration, Evaluation, Authorisation, and Restriction of Chemicals (REACH). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 37(3), 657–670. <https://doi.org/10.1002/etc.4055>
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., & Smith, C. (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*, 83(1), 13–34. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x>
- Tang, T., Zhang, Z., & Zhu, X. (2019). Toxic effects of TiO₂ NPs on Zebrafish. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(4). <https://doi.org/10.3390/ijerph16040523>
- Van Aerle, R., Lange, A., Moorhouse, A., Paszkiewicz, K., Ball, K., Johnston, B. D., De-Bastos, E., Booth, T., Tyler, C. R., & Santos, E. M. (2013). Molecular mechanisms of toxicity of silver nanoparticles in zebrafish embryos. *Environmental Science and Technology*, 47(14), 8005–8014. <https://doi.org/10.1021/es401758d>
- Vicario-Parés, U., Lacave, J. M., Reip, P., Cajaraville, M. P., & Orbea, A. (2018). Cellular and molecular responses of adult zebrafish after exposure to CuO nanoparticles or ionic copper. *Ecotoxicology*, 27(1), 89–101. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1873-5>
- Wang, F., Gao, J., Chen, L., Zhou, Z., Liu, D., & Wang, P. (2018). Enantioselective bioaccumulation and metabolism of lactofen in zebrafish *Danio rerio* and combined effects with its metabolites. *Chemosphere*, 213, 443–452. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.052>
- Wang, Y., & Tang, M. (2018). Review of in vitro toxicological research of quantum dot and potentially involved mechanisms. *Science of the Total Environment*, 625, 940–962. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.334>
- Westerfield, M. (2007). *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)* (O.: D. by the Z. I. R. C. Eugene, OR: Printed by the University of Oregon Press: Distributed by the Zebrafish International Resource Center, Eugene (ed.); 5th Editio). University of Oregon Press.
- Xin, Q., Rotchell, J. M., Cheng, J., Yi, J., & Zhang, Q. (2015). Silver nanoparticles affect the neural development of zebrafish embryos. *Journal of Applied Toxicology*, 35(12), 1481–1492. <https://doi.org/10.1002/jat.3164>



Capítulo 9

Biodegradación de matrices activas

9.1. INTRODUCCIÓN

Durante los últimos 60 años, los polímeros sintéticos se han utilizado para la fabricación de materiales de envasado debido a la facilidad de producción; la fuente de obtención de estos materiales es principalmente la industria petroquímica. El excesivo uso de polímeros sintéticos ha generado problemas ecológicos debido a su alta resistencia a la biodegradación (Mohee y col., 2008).

Dentro de los polímeros sintéticos, los plásticos son los materiales más utilizados en la vida diaria. Esta producción excesiva de polímeros sintéticos exige generar alternativas sustentables a partir de recursos renovables. El uso de estos polímeros provoca impactos ambientales adversos como la emisión de dióxido de carbono (CO₂) y la acumulación a largo plazo en el medio ambiente debido a su falta de biodegradabilidad (Tokiwa y col., 2009; Pathak y col., 2014; Jain y col., 2015) que lleva a la acumulación de millones de toneladas de desechos plásticos (Pathak y col., 2014; Emadian y col., 2017)..

Se estima que 34 millones de toneladas de desechos plásticos son acumulados cada año en todo el mundo, de los cuales el 93% se eliminan en redes colectoras hídricas y océanos (Pathak y col., 2014). Aunque algunos miembros de la Unión Europea (UE) han prohibido la disposición final en fuentes hídricas, aproximadamente el 50% de los desechos plásticos todavía se eliminan en cuerpos de agua. Países como Alemania, Países Bajos, Suecia, Dinamarca y Austria lograron con éxito la recuperación del 80 al 100% de los desechos plásticos. Sin embargo, solo pudieron reciclar un 28% en promedio (Unión Europea, 2013). La Figura 9.1 ilustra las potenciales vías de transporte de desechos plásticos y sus posibles interacciones con el medio ambiente, donde se observa el proceso lento de degradación de macroplásticos a microplásticos primarios y secundarios que a su vez interactúan con el ecosistema marino, produciendo un impacto negativo a largo plazo para las especies endémicas del lugar.

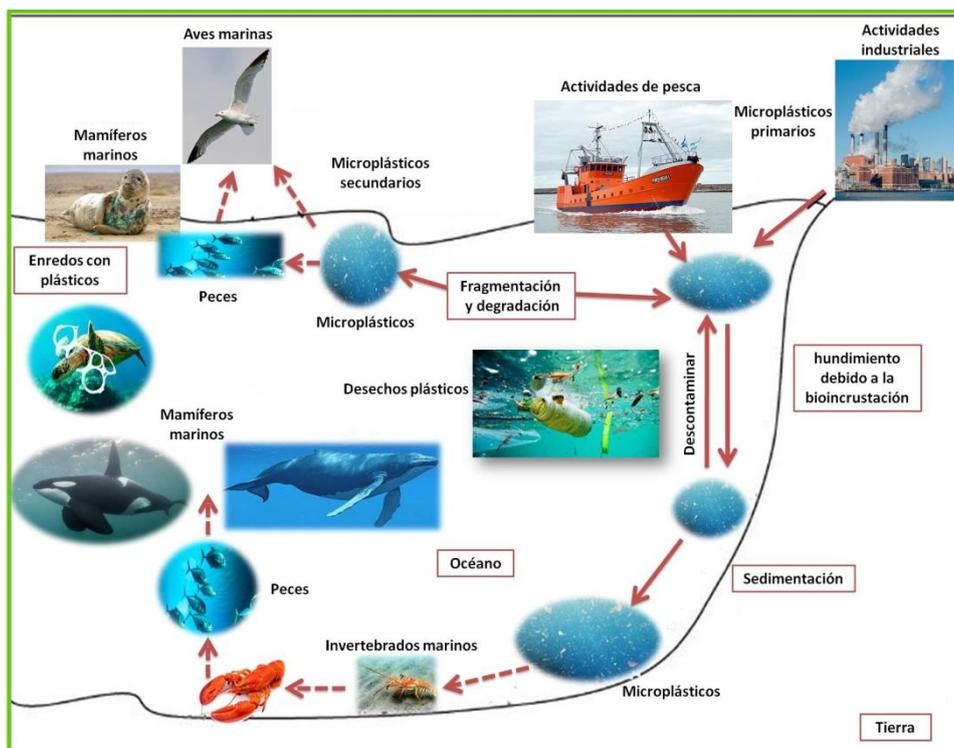


Figura 9.1. Posibles vías de transporte de desechos plásticos y sus interacciones biológicas. Adaptado de Wright y col. (2013); Ivar Do Sul y col. (2014); Li y col.(2016).

Las propiedades de los materiales sintéticos ofrecen seguridad para la protección y conservación de las propiedades de los productos o alimentos debido a sus excelentes propiedades de barrera (baja permeabilidad al oxígeno y vapor de agua) y baja sensibilidad a la luz (Khaneghah y col., 2018; Al-Tayyar y col., 2020). Recientemente, los envases elaborados usando materiales biodegradables y/o de base biológica han aumentado debido a las nuevas estrategias ambientales, las cuales buscan solucionar problemas de saneamiento ecológico provocados por el uso excesivo de materiales sintéticos (Bi y col., 2019; Youssef y col., 2019; Al-Tayyar y col., 2020).

Países con economías emergentes como la Argentina disponen de rellenos sanitarios tradicionales para la eliminación de residuos sólidos usando las técnicas convencionales de disposición final. Por otro lado, países como China, Indonesia, Filipinas, Sri Lanka y Vietnam generaron más del 50% de la contaminación plástica global en el medio marino (Li y col., 2016; Singh y col., 2016; Emadian y col., 2017). Aunque las tecnologías para recuperar los desechos plásticos han mejorado, un aumento de la población mundial que

llegará a 9 mil millones en el 2050 provocará una mayor demanda de producción y finalmente un aumento en la cantidad de desechos plásticos (EU, 2013).

Reconociendo el reto de lograr materiales con un bajo impacto medio ambiental, surgen alternativas interesantes para desincentivar la producción de plásticos sintéticos derivados de los hidrocarburos, entre las cuales se puede mencionar el uso de polímeros biodegradables obtenidos de fuentes renovables, a los que se conoce como biopolímeros. La utilización de recursos renovables como los subproductos de las industrias agrícolas y pesqueras son cada vez más estudiadas para la generación de materiales con alto poder de biodegradabilidad en diferentes ambientes, permitiendo que estos polímeros sean más aceptados en comparación con los plásticos convencionales que solo tienden a la degradación generando compuestos recalcitrantes debido a la fragmentación (Emadian y col., 2017).

El uso de materiales poliméricos biodegradables constituye una alternativa viable al problema de los plásticos convencionales ya que impulsa el desarrollo de tecnologías sustentables, ecológicas y económicamente atractivas (Mohanty y col., 2000). La completa degradación biológica que sufren estos materiales permite un mejor control de los residuos plásticos generados, ya que los mismos pueden ser tratados junto con los demás desechos orgánicos durante el compostaje y ser posteriormente utilizados como abono en la agricultura, horticultura y forestación. Por otra parte, el gas metano (CH₄) que se libera durante el proceso de biodegradación constituye una fuente de energía limpia.

Dentro de los envases desarrollados con materiales biodegradables se destacan los que tienen uso en sectores agroalimentarios, comestibles, entre otros. Algunos tipos de materiales son las matrices bionanocompuestas, que generalmente se crean a partir de polímeros de origen biológico (polisacáridos, proteínas, lípidos) (Gutiérrez y Alvarez, 2018; Al-Tayyar y col., 2020; El-Sayed y col., 2020).

El término biodegradación no debe ser confundido con degradación. La degradación polimérica únicamente es experimentada por los materiales que en condiciones orgánicas generan la fragmentación física y modificación estructural. La norma ASTM D 5488-944 define la biodegradabilidad como la capacidad de un material de descomponerse en dióxido de carbono, metano, agua y componentes orgánicos o biomasa, en el cual el

mecanismo predominante es la acción enzimática de microorganismos (Meneses y col., 2007). Los materiales que sufren biodegradación son afectados por procesos inducidos por la suma de aspectos como la luz solar, presencia de seres vivos (hongos y bacterias) y condiciones ambientales como humedad y temperatura, generando una modificación y debilitamiento de la estructura del polímero (Mohee y col., 2008). La Figura 9.2 muestra la diferencia entre degradación y biodegradación.

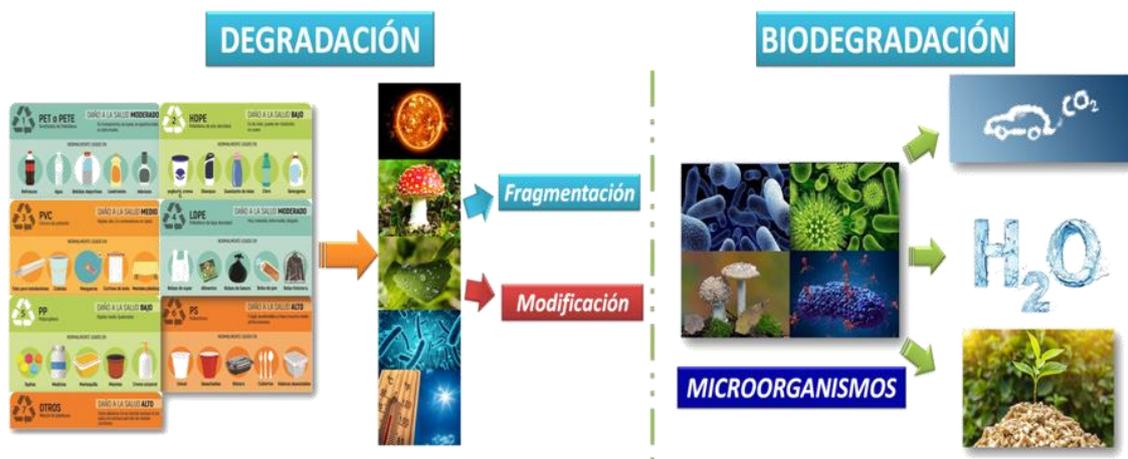


Figura 9.2. Esquema representativo de los ensayos de degradación y biodegradación. Adaptado de Mohee y col. (2008).

Otro concepto relacionado con la biodegradación comprende las transformaciones y deterioro de polímeros por la acción metabólica de organismos vivos a causa de la actividad enzimática y los productos de secreción de estos. La principal consecuencia que experimenta el polímero es un cambio paulatino de su estructura química con modificaciones en sus propiedades macroscópicas y microestructurales. Los cambios más apreciables macroscópicamente son el color y la textura, debido a la formación de pequeñas porosidades en la estructura de la matriz, grietas y aparición de rugosidades en la superficie.

La biodegradación ocurre en una serie de etapas de acuerdo a Lucas y col. (2008), entre las que se pueden distinguir:

Capítulo 9: Biodegradación de matrices nanocompuestas a base de quitosano

- *Biodeterioro*: En este proceso la acción de comunidades microbianas en conjunto descomponen al polímero en fracciones.
- *Depolimerización*: Este paso está descrito por la acción de enzimas secretadas por microorganismos (enzimas y radicales libres) capaces de romper las moléculas poliméricas reduciendo progresivamente su peso molecular, generando oligómeros, dímeros y monómeros.
- *Biofragmentación*: Algunas de las moléculas generadas en el paso anterior pueden ser reconocidas por receptores de las membranas celulares de los microorganismos actuantes y así cruzar la membrana citoplasmática de las mismas. Las moléculas que no logran superar esa barrera permanecen en la matriz extracelular, lugar en donde pueden sufrir otras modificaciones químicas.
- *Asimilación*: En este proceso, las moléculas transportadas a través de la membrana citoplasmática se integran al metabolismo de los microorganismos para producir energía, nueva biomasa, vesículas de almacenamiento y diversos metabolitos primarios y secundarios.
- *Mineralización*: El último paso del proceso de biodegradación en el cual se liberan hacia el exterior moléculas pequeñas como CO₂, H₂O y CH₄.

Los materiales con tendencia a la biodegradación son los biopolímeros sintetizados a partir de biomasa (residuos agroindustriales) como la celulosa o el quitosano, de origen microbiano como el ácido poli-láctico (PLA) y el polihidroxialcanoato (PHA) o algunos materiales producidos a partir de combustibles fósiles, incluidos los materiales alifáticos como el succinato de polibutileno (PBS) y el alcohol polivinílico (PVA) (Tokiwa y col., 2009; Mekonnen y col., 2013; Emadian y col., 2017).

Según Emadian y col. (2017), la producción general de polímeros biodegradables ha ido creciendo a lo largo de los años. En el 2011 representó un 1.4% de la producción global (3.3 millones de toneladas de polímeros biodegradables para una producción de 235 millones de toneladas) y para el 2020 la producción de polímeros biodegradables fue de 400 millones de toneladas aproximadamente. En el caso de los polímeros de base biológica (biopolímeros) la producción aumentó aproximadamente un 4% en el 2020 en comparación al 2% del 2014, lo que significa que la capacidad de producción de

biopolímeros crecerá más rápido que la producción total de polímeros para los siguientes años.

En la Figura 9.3 se muestra un estimado para el 2024 de la producción global de polímeros, en la cual los plásticos biodegradables liderarán con un 55% (European Bioplastic Nova Institute, 2019).

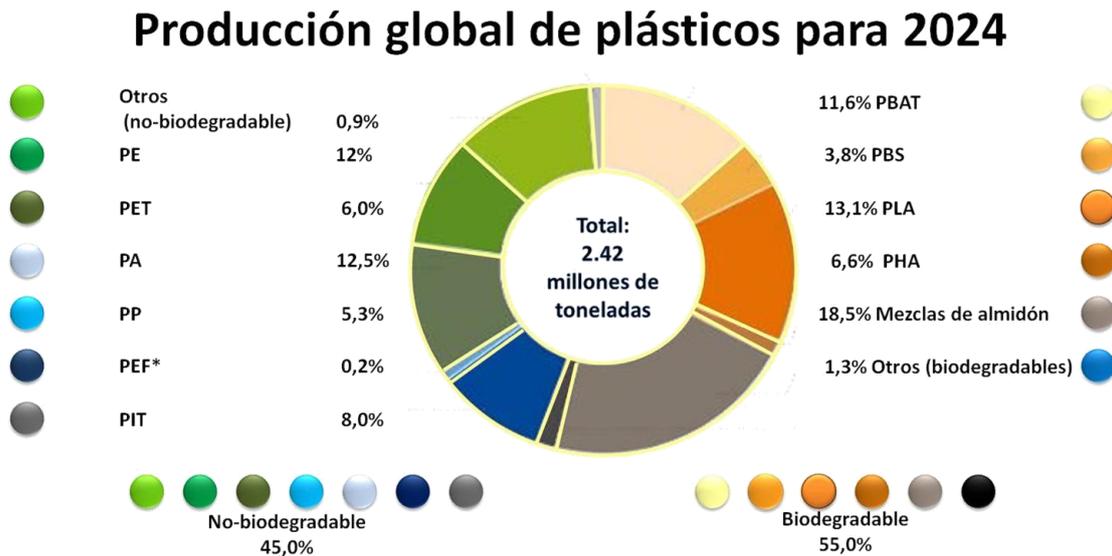


Figura 9.3. Capacidad de producción global de bioplásticos para el año 2024. Adaptada de European Bioplastic Nova Institute (2019).

Por lo expuesto anteriormente, se ha generado un mayor interés en el estudio y caracterización de materiales biodegradables conociendo los cambios que experimentan durante el proceso de biodegradación. Un ejemplo de los cambios estructurales son las rupturas de los grupos lábiles de la cadena polimérica por acción de un agente externo de naturaleza física o química. En el caso del almidón los enlaces α 1-4 son susceptibles de sufrir ataques por las amilasas y los enlaces α 1-6 por las glucosidasas; la celulosa es atacada por las peroxidasas, secretadas por algunos hongos, y por endo y exoenzimas producidas por bacterias (Makaríos-Laham y col., 1995).

En general, los polímeros con cadenas más cortas, porciones amorfas y fórmulas menos complejas son más susceptibles de sufrir la biodegradación por microorganismos. Además, el entorno en el que se colocan los polímeros, juega un factor clave para su

biodegradación. El pH, la temperatura, la humedad y el contenido de oxígeno se encuentran entre los factores ambientales más importantes en la biodegradación de los polímeros (Kale y col., 2007).

La afinidad de los microorganismos por el material polimérico depende de diversos factores estructurales y funcionales, porosidad, cristalinidad, rugosidad, hidrofiliicidad y textura, entre otros. En el caso de una matriz nanocompuesta la biodegradación será más lenta (Eubeler y col., 2010; Pantani y col., 2013; Souza y col., 2016).

La cristalinidad es una propiedad que se debe destacar en la degradación del polímero (De Paoli, 2009; Gorrasi y col., 2013). El grado de cristalinidad afecta la transparencia a la luz, la permeabilidad al vapor de agua u oxígeno y las propiedades mecánicas (Figura 9.4) (Sermantiwanit y col., 2012; Pantani y col., 2013; Azizi y col., 2014; Souza y col., 2016). El aumento en el grado de cristalinidad da como resultado una mayor barrera a la luz, una ralentización de la degradabilidad fotoquímica, disminución de la difusión de oxígeno y líquidos a través de la matriz biopolimérica, haciendo que las reacciones de óxido-reducción sean más lentas (De Paoli, 2009; Souza y col., 2016).

Diversos autores (Azeredo y col., 2011; Duncan 2011; Azizi y col., 2014; Souza y col., 2016) han reportado el uso de nanofibras como refuerzo dando como resultado cambios en la cristalinidad del polímero. Se observó que la biodegradación es dependiente del grado de interacción química entre la matriz biopolimérica y el nanomaterial seleccionado.



Figura 9.4. Efecto de la cristalinidad sobre las propiedades del polímero. Adaptado de Souza y Fernando (2016).

Rimdusit y col. (2008) evaluaron la influencia de montmorillonita (MMT) en la biodegradabilidad de los nanocompuestos de metilcelulosa (MC). Estos autores variaron el contenido de nanoarcilla entre 0 y 10% (p/p) observando que la incorporación de la arcilla influyó negativamente en la biodegradación a pesar de las mejoras en las propiedades estructurales. Los autores atribuyeron a las capas de silicato en la superficie de la película la responsabilidad de ocultar parte de las cadenas de MC, lo que dificulta la biodegradación. Resultados similares fueron informados por Lee y col. (2002).

Los procesos implicados en la biodegradación hidrolítica son complejos, en la medida en que las interacciones de organismos vivos con polímeros sensibles (biodegradables), como polisacáridos, poliésteres, sus copolímeros alifáticos y aromáticos, y poliamidas juegan un papel significativo. Estos polímeros pueden degradarse a través de diversos mecanismos (foto degradación, degradación térmica, mecánica y química), que pueden actuar solos o combinados, a menudo sinérgicamente (Laycock y col., 2017). La velocidad de la degradación hidrolítica depende de muchos otros factores, incluyendo la longitud de la cadena de polímeros, cristalinidad, distribución del peso molecular, hinchamiento, tamaño, forma y geometría de la matriz de polímeros, geometría de poros, dimensiones globales del dispositivo, condiciones de procesamiento y difusividad del agua en la matriz (Lucas y col., 2008; Vroman y Tighzert, 2009; Reddy y col., 2013; Laycock y col., 2017).

Existen en bibliografía diferentes métodos para evaluar la biodegradabilidad de las películas. Entre ellos, se destacan la determinación del CO₂ generado a intervalos regulares con el fin de determinar la producción del gas debido a la acción de microorganismos. El porcentaje de biodegradación se estima mediante la relación entre el CO₂ generado a partir del material ensayado y la cantidad teórica máxima que puede producirse a partir del material evaluado (Rimdusit y col., 2008). Otros métodos empleados para evaluar la biodegradación de un material consisten en realizar un seguimiento del cambio en el peso molecular promedio del polímero con el tiempo de exposición (Zhang y col., 1996).

Vázquez-Rodríguez y Beltrán-Hernández (2004) concluyeron que la normalización de las pruebas de biodegradabilidad enfrenta un problema inherente a cualquier intento de simulación ambiental *in vitro*. La posibilidad de construir métodos robustos, reproducibles

y por lo tanto susceptibles de normalización en el laboratorio disminuye cuando se pretende integrar un mayor número de variables para reflejar la complejidad real de los fenómenos naturales. Otro de los aspectos que deben tenerse en cuenta son las modificaciones químicas producidas en las películas, como los tratamientos que ocasionan la reticulación de la matriz permitiendo obtener una malla estable y más resistente al proceso de biodegradación (Weian y col., 2005; Rimdusit y col., 2008). Se esperaría que matrices con estructuras más densas requirieran más tiempo para biodegradarse, ya que bajo estas condiciones las enzimas son menos accesibles a los grupos hidrolizables (Lamarra, 2019; Rivero, 2012).

Aunque se han publicado numerosos datos sobre la aplicación de quitosano en los campos biomédicos, muy pocos estudios y artículos de revisión han investigado la estabilidad a largo plazo de los productos basados en Q (Szymańska y Winnicka, 2015; Matica y col., 2017).

Si bien los polímeros objeto de este estudio son reconocidos como polímeros biodegradables, las investigaciones referidas a la biodegradación de películas a base de quitosano con incorporación de nanopartículas son hasta el momento escasas. Por este motivo, el estudio de la biodegradación de los materiales desarrollados podría ser una guía en futuras estrategias para mejorar el diseño de materiales nanoestructurados.

La atención científica e industrial se ha centrado en el desarrollo de polímeros biodegradables y sus biocompuestos derivados. El desafío actual es diseñar materiales con estabilidad estructural y funcional durante el almacenamiento y uso, así como susceptibles de sufrir degradación microbiana tras su eliminación sin impacto ambiental adverso (Alvarez y col., 2006).

9.2. OBJETIVOS

- Evaluar la biodegradación de las películas desarrolladas, estudiando el efecto producido por el agregado de las nanopartículas: plata (NpAg), cobre (NpCu) y dióxido de titanio (NpTiO₂) a través de diferentes métodos macroscópicos como pérdida de peso, inspección visual y fotográfica, observaciones de la microestructura usando microscopía SEM, además de analizar las interacciones por ATR-FTIR.
- Comparar los resultados obtenidos de la biodegradación de las matrices nanocompuestas con los correspondientes materiales de referencia como películas de quitosano y de alcohol polivinílico (PVA).

9.3. MATERIALES

Para la realización del ensayo definitivo de biodegradabilidad de las matrices desarrolladas, se realizó un pre-ensayo con el fin de estandarizar el método de riego y observar el proceso de degradación. En este ensayo también se prepararon películas de quitosano con alcohol polivinílico (PVA) y agregados de nanopartículas de Ag y Cu. En base a este ensayo preliminar: i) se acotó el número de matrices a ensayar a las matrices base (QAg, QCu, QT_i, Q y PVA); ii) se ajustó el método y el volumen de riego y se planificó el calendario de riego. Las matrices nanocompuestas ensayadas fueron las preparadas y caracterizadas en los capítulos anteriores: películas quitosano-nanopartículas de plata (QAg), quitosano-nanopartículas de cobre (QCu), quitosano-dióxido de titanio modificado con ácido tungstofosfórico (QT_i).

Las características fisicoquímicas y la composición de la tierra usada se indican a continuación: materia orgánica: 3.5-4.5%, humedad: 17-19%, cenizas: 76-79%, relación C/N: 11.5 y conductividad eléctrica: 0.5-1 mS cm⁻¹ y pH: 7. Las características fisicoquímicas y la composición del compost utilizado fueron: materia orgánica: 15-20%, humedad: 35-40%, cenizas: 40-45%, relación C/N: 7.7, conductividad eléctrica: 1.1 mS cm⁻¹ y pH: 6.2

9.4. METODOLOGÍA

Partiendo de estas conclusiones previas, se planificó y se ejecutó el estudio experimental definitivo de biodegradación de las matrices antes mencionadas, mediante la metodología descrita en la Norma [ASTM D5988-03, \(2003\)](#), realizando los ensayos bajo condiciones análogas a las ambientales (temperatura, humedad, riego y componentes orgánicos e inorgánicos).

Teniendo en cuenta las modificaciones realizadas sobre la matriz de quitosano resulta necesario analizar la influencia de las mismas sobre el grado y la velocidad de la biodegradación. Por esta razón, se seleccionaron las películas biopoliméricas con el agregado de la mayor concentración de nanopartículas para cada uno de los elementos (Ag, Cu y TiO₂), empleando como control las películas individuales de quitosano y de PVA.

Capítulo 9: Biodegradación de matrices nanocompuestas a base de quitosano

Para llevar a cabo los experimentos se prepararon películas de 4 cm de diámetro con espesores en el rango de 60-70 μm , las que se colocaron en un soporte formado por una malla plástica. Las muestras se enterraron en recipientes de 300 g a una profundidad de 5 cm desde la superficie a fin de asegurar el proceso de degradación anaeróbica (Figura 9.6).

Como medio degradante se utilizó la propia microflora presente el suelo utilizado, cuya composición se describió anteriormente. Siguiendo la metodología descrita en la Norma ASTM D5988-03, (2003), se adicionó 1 g de compost por cada 25 g de tierra.

Los recipientes se rotularon y se acondicionaron en un invernadero a temperatura y humedad relativa controlada de 20°C y 50%, respectivamente, tomadas como condiciones ambientales medias (Figura 9.7). En todos los casos las matrices se regaron periódicamente con un pulverizador manteniendo un volumen de agua constante.

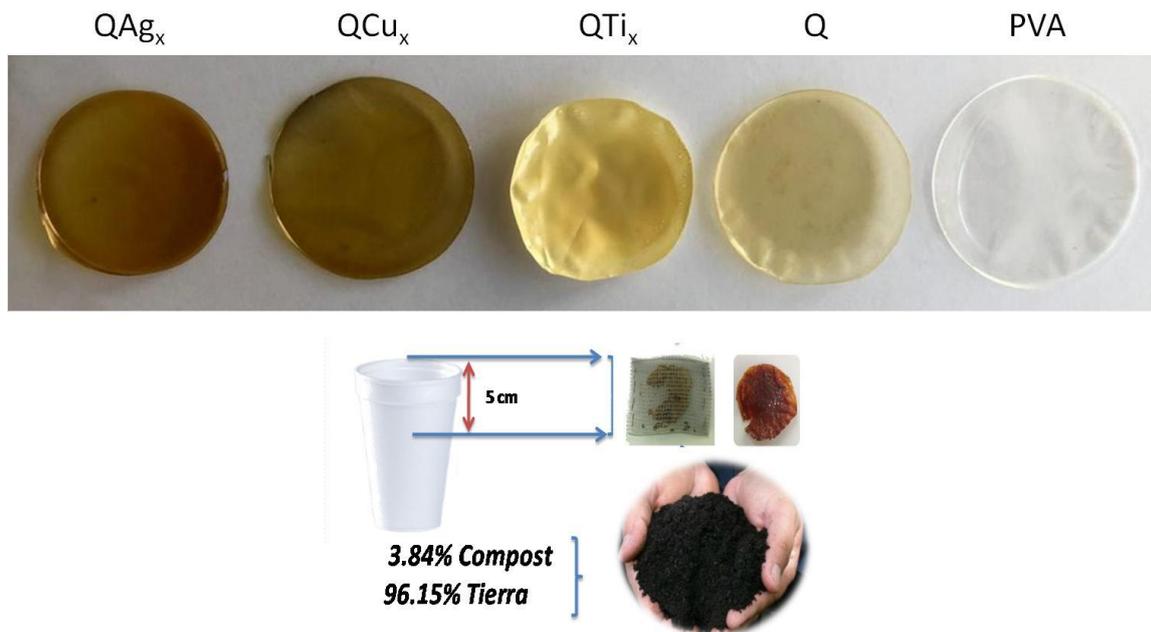


Figura 9.6. Esquema representativo de las matrices ensayadas ($x=4$) y de los recipientes para llevar a cabo el proceso de biodegradación.

Capítulo 9: Biodegradación de matrices nanocompuestas a base de quitosano



Figura 9.7. Esquema representativo de la disposición de las matrices en los recipientes con el medio degradante y en el invernadero acondicionado a 20°C y 50% HR.



Figura 9.8. Esquema representativo del procedimiento de limpieza, extracción y secado realizados sobre las matrices a distintos tiempos de biodegradación.

La determinación de la variación de peso se realizó por el método gravimétrico a diferentes tiempos en una balanza analítica, lo que permitió una primera evaluación acerca de la idoneidad del medio para la biodegradación al que se expusieron las matrices. Las muestras se extrajeron en forma semanal, y una vez desenterradas, se llevaron a estufa durante 24 horas a fin de secar y facilitar la limpieza de la tierra adherida a la superficie, evitando pérdida o errores en el pesaje por humedad. Las muestras se limpiaron cuidadosamente con brocha de cerdas suaves, evitando dañar o fracturar la estructura y minimizando los errores asociados a cuantificar masa adicional debido a la presencia de partículas ajenas a la matriz, como tierra, material orgánico, etc. Una vez las matrices estuvieron secas y limpias, se determinó el porcentaje de pérdida de peso.

9.4.1 Estudios morfológicos y estructurales

El análisis morfológico de las películas degradadas se realizó por microscopía electrónica de barrido con un SEM FEI QUANTA 200. La muestra no requirió metalizado. Asimismo se siguió el proceso de biodegradación a través de un análisis de espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier acoplado con un accesorio de reflexión total atenuada difusa (ATR-FTIR) tal como se describió en capítulos previos. Se realizaron inspecciones visuales de las películas luego de haberlas extraído de los recipientes a distintos tiempos de ensayo y se tomaron fotografías de las mismas.

9.5. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

9.5.1 Estudio de las propiedades macroscópicas

En la [Figura 9.9](#) se muestra el progreso de la pérdida de peso para cada una de las películas sometidas al tratamiento de biodegradación, hasta un tiempo promedio de aproximadamente 200 días. Un hecho importante a resaltar es la escasa precisión de esta técnica debido a los errores asociados a la toma de la muestra, sobre todo en las etapas más avanzadas de la biodesintegración del material. Estudios similares fueron realizados por varios autores ([Lamarra, 2019](#); [Ludueña y col., 2012](#); [Rivero, 2012](#)).

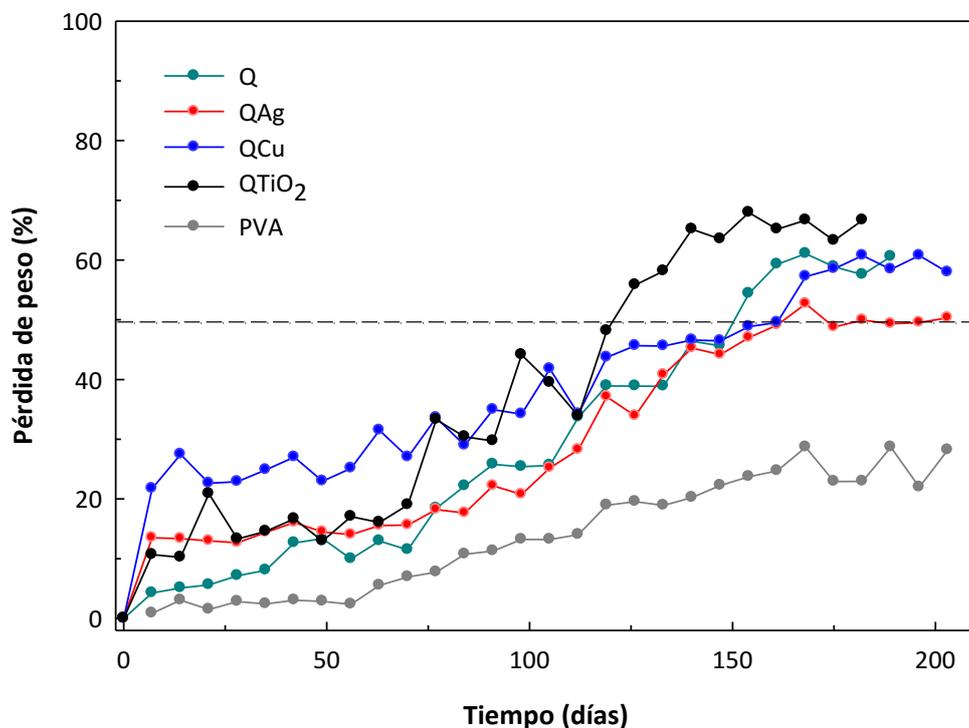


Figura 9.9. Pérdida de peso en función del tiempo de las matrices control Q, PVA y de los nanocompuestos a base de quitosano con Nps metálicas (Cu/Ag/TiO₂), expuestos a un medio con carga orgánica y nutrientes para su biodegradación. Los valores informados corresponden al promedio de dos repeticiones por muestra durante 200 días en promedio.

Según se observa en la [Figura 9.9](#), la pérdida de peso (PP%) experimentada por la película control Q fue mayor en relación a las matrices nanocompuestas excepto la QCu. A partir de los 80 días desde el inicio del ensayo, la pendiente de pérdida de peso del Q se

incrementó llegando a los 180 días con una pérdida del 70% del peso inicial. Resultados similares fueron encontrados por [Xu et al. \(1996\)](#).

El quitosano por su naturaleza semicristalina resultó más difícil de ser atacado que los nanocompuestos y mantuvo su estabilidad química pero después de ese período de tiempo y posiblemente debido a la formación de oligosacáridos cambió su patrón de comportamiento. La región amorfa absorbe grandes cantidades de agua, haciéndola más susceptible al ataque de los microorganismos aumentando así la tasa de biodegradación. A pesar de su comportamiento ligeramente disímil, las matrices a base de quitosano alcanzaron el 50% de pérdida de peso en el rango comprendido entre 100 y 150 días, aproximadamente.

La matriz de PVA, cuya cristalinidad fue del 60%, fue más resistente que el Q a la biodegradación (GC 32%) y al cabo de 180 días de incubación perdió el 25% de su peso original.

Similares resultados fueron obtenidos por [Al-Tayyar y col. \(2020\)](#) trabajando con quitosano y quitosano modificado realizando los ensayos de degradación en una solución de PBS a 37°C. En la bibliografía la PP% determinada fue disímil posiblemente debido a diferencias en las condiciones del ensayo o diferencias en las formulaciones de cada matriz, así como método de preparación del material y el porcentaje de soluto en la solución filmogénica. Según [Thakur y col. \(2018\)](#) varios agentes afectan la velocidad de degradación del quitosano como temperatura, humedad, naturaleza ácida y química del polímero, entre otros ([Kale y col., 2007](#)). Otros agentes que pueden influir sobre la velocidad de degradación son la cristalinidad, el peso molecular, la composición del copolímero y el tamaño del polímero ([Ho y col., 1999](#); [Li y col, 2016](#)).

Con respecto a las matrices nanocompuestas, las formulaciones que contenían nanopartículas de plata y cobre (QAg y QCu) presentaron una pérdida de peso prácticamente constante en los primeros 70-80 días ([Figura 9.9](#)), pero siempre la curva de PP% de la QCu se mantuvo por encima de QAg. La pérdida de peso al final del ensayo no presentó diferencias significativas según el test de comparación ($p < 0.5$) (48.9% para QCu y 47.2% para QAg).

Capítulo 9: Biodegradación de matrices nanocompuestas a base de quitosano

Si bien ambos nanocompuestos mostraron signos de degradación, las matrices QAg y QCu tuvieron un comportamiento ligeramente diferente en la velocidad del proceso. Se pueda señalar en este punto que la diferencia podría ser atribuida al método de obtención de los nanocompuestos. La matriz QAg fue obtenida *in situ* con las nanopartículas formando un sistema coloidal muy estable donde no se observó un proceso de decantación. Por el contrario, la matriz QCu fue formulada a partir de una solución de sulfato de cobre en PVP para estabilizar las nanopartículas y luego una mezcla con la solución de quitosano. Las NpCu experimentaron una completa decantación al cabo de unas horas. Podría esperarse que la matriz más estable, con mayor interacción entre los componentes como la QAg ofrezca mayor resistencia a la biodegradación y presente menor pérdida de peso en las etapas iniciales del proceso.

En ese sentido, la matriz de quitosano con nanopartículas de TiO₂ (QTi) mostró un comportamiento similar pero con una menor pérdida de peso que los otros nanocompuestos (Figura 9.9). Al finalizar el ensayo la biodegradación la PP% fue 60.6%. Por otro lado, la cinética de degradación de la matriz de PVA, expresada como pérdida de peso, resultó más lenta comparada con las formulaciones a base de quitosano y después de 200 días de incubación la PP% fue del 25%. Este fenómeno puede asociarse a que el polímero sintético dificulta el ataque de los microorganismos en los primeros estadios de los procesos de degradación.

Según los resultados obtenidos, como era de esperarse las películas control Q tuvieron mayor tendencia a la biodegradación que las matrices de PVA. Esto se atribuyó a la naturaleza biopolimérica del quitosano.

En todos los casos, entre los 135 y 140 días de incubación se observó una meseta o amesetamiento en la pérdida de peso de las muestras. Un comportamiento similar fue observado por [Avila y col. \(2014\)](#).

De acuerdo a [Fukushima y col. \(2013\)](#), los nanocompuestos de ácido poliláctico (PLA) con diferentes arcillas incorporadas en concentraciones entre 5% y 10% en peso, mostraron variación en su proceso de biodegradación. En este caso, la adición de nanopartículas aceleró la degradación del polímero, particularmente con un mayor

contenido de arcilla, lo que fue atribuido a la acción catalítica de los grupos hidroxilo de la superficie de las capas de silicato.

La [Figura 9.10](#) muestra el crecimiento de plantas cuyas semillas se encontraban en el medio de biodegradación usado.



Figura 9.10. Crecimiento de plantas en el medio de biodegradación.

Modificaciones macroscópicas en los materiales como la rugosidad de la superficie, la formación de agujeros y grietas, los cambios de color, el desarrollo de microorganismos sobre la superficie, también permiten un monitoreo de la biodegradación ([Lucas y col., 2008](#)). En las [Figuras 9.11, 9.11, 9.12, 9.13 y 9.15](#) se muestran las fotografías de las matrices Q, QAg, QCu, QTi y PVA tomadas siguiendo el proceso de degradación.

En la [Figura 9.11](#) se observa que las matrices Q que originalmente eran transparentes, flexibles y de color ligeramente amarillo, se tornaron más oscuras con un ligero tono amarillado con pérdida de la transparencia y la flexibilidad luego de una semana de incubación, características que se acentuaron en el transcurso del tiempo. Asimismo la matriz experimentó un encogimiento de su superficie, un aumento de la rugosidad al igual que un deterioro del material con pérdida visible de masa.

Según [Matica y col. \(2017\)](#) la degradación del quitosano se explica debido a la existencia de grupos amino y a los enlaces glicosídicos que son más susceptibles de sufrir degradación ([Dash y col., 2011](#)). La biodegradación del quitosano conduce a la formación

Capítulo 9: Biodegradación de matrices nanocompuestas a base de quitosano

de oligosacáridos no tóxicos. Es posible que estos oligosacáridos, con longitudes variables, puedan incorporarse en las vías metabólicas o excretarse.

Zhang y Neau (2001) observaron que la tasa de biodegradación aumenta cuando la cristalinidad disminuye. Los residuos de acetilo distribuidos a lo largo de la cadena afectan su cristalinidad y, en consecuencia, la tasa de biodegradación. Las cadenas de Q más pequeñas se biodegradan de manera más eficiente que las de mayor masa molecular (Rinaudo, 2006; Croisier y Jérôme, 2013).

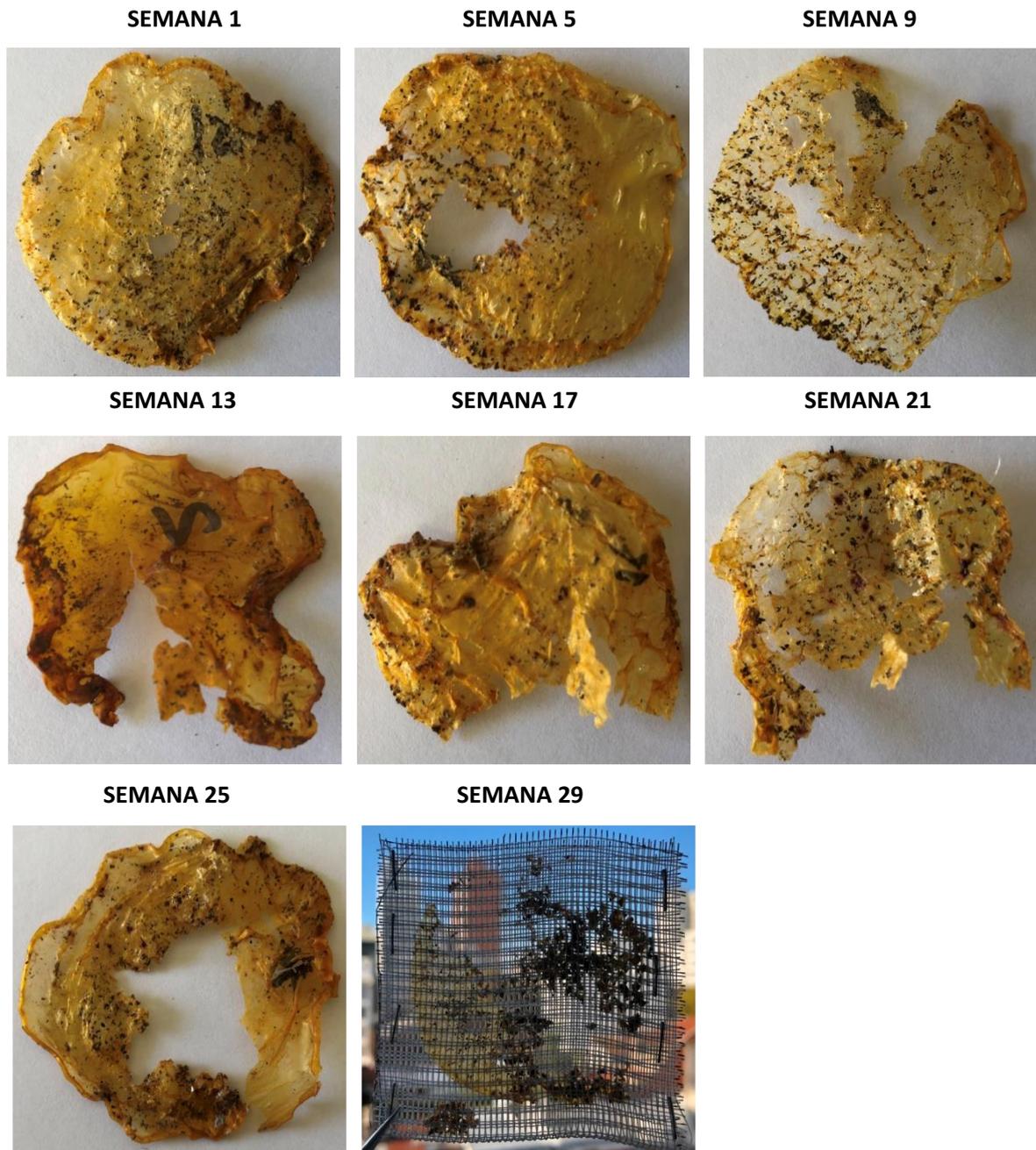


Figura 9.11. Morfología superficial de las películas de quitosano (Q) a lo largo del período de ensayo. En las fotografías se observa el deterioro de la superficie, el cambio de coloración y la pérdida de masa con el progreso del proceso de degradación.

Capítulo 9: Biodegradación de matrices nanocompuestas a base de quitosano

Las matrices nanocompuestas QAg se contrajeron y experimentaron cambios en la coloración tal como puede observarse en las fotografías de la [Figura 9.12](#). Entre las transformaciones experimentados por estas matrices, el cambio de tonalidad de rojizo a negro plata serían indicio de las reacciones experimentadas por el material en el proceso de biodegradación (Piñeros-Hernandez y col., 2017; Pavoni y col., 2021). En la semana 25, se observaron a simple vista colonias de hongos o microorganismos superficiales.



Figura 9.12. Morfología superficial de las películas de QAg a lo largo del período de ensayo. En las fotografías se observa el deterioro de la superficie, el cambio de coloración y la pérdida de masa con el progreso del proceso de degradación.

Capítulo 9: Biodegradación de matrices nanocompuestas a base de quitosano

SEMANA 1



SEMANA 5



SEMANA 9



SEMANA 13



SEMANA 17



SEMANA 21



SEMANA 25



Figura 9.13. Morfología superficial de las películas de QCu a lo largo del período de ensayo. En las fotografías se observa el deterioro de la superficie, el cambio de coloración y la pérdida de masa con el progreso del proceso de degradación.

Todas las muestras incubadas sufrieron cambios evidentes en la textura en un breve período de tiempo desde el inicio del ensayo tornándose rugosas y quebradizas. Estos cambios producidos resultaron signos evidentes de la degradación. Resultados similares fueron encontrados por Xu y col. (1996).

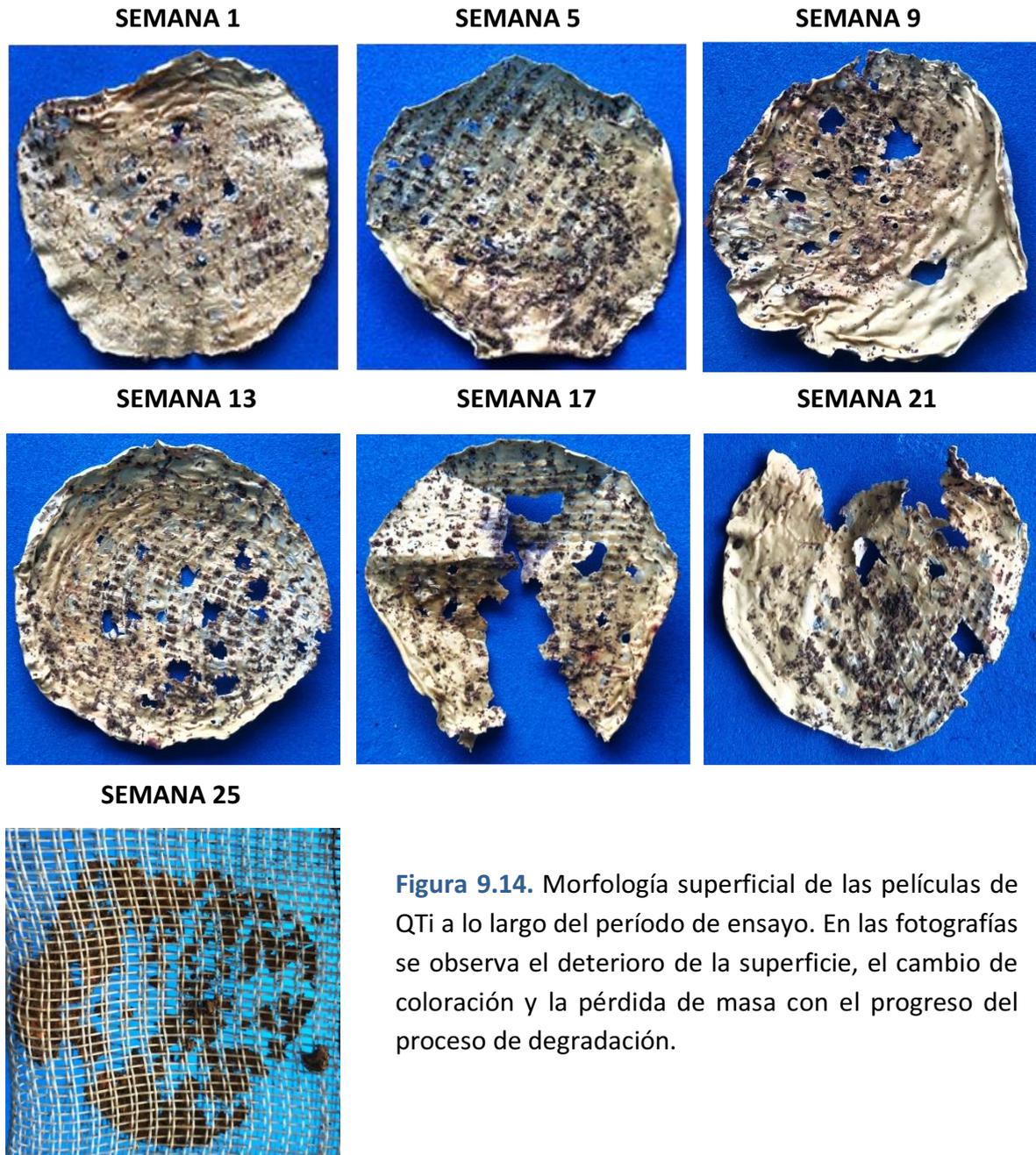


Figura 9.14. Morfología superficial de las películas de QT*i* a lo largo del período de ensayo. En las fotografías se observa el deterioro de la superficie, el cambio de coloración y la pérdida de masa con el progreso del proceso de degradación.

Ramos y col. (2014) estudiaron la influencia de las nanopartículas de timol y Ag en la degradación de los nanocompuestos basados en PLA, concluyendo que el polímero puro mostró una biodegradación más lenta en comparación con los nanocompuestos. El comportamiento observado en la matriz mixta puede explicarse por el proceso de mayor difusión de las moléculas de agua a través de la estructura de nanopolímeros que promovió la hidrólisis, favoreciendo la desintegración del material. Se sabe que los

polímeros solubles en agua son más fáciles de degradar, ya que el agua favorece el desarrollo de microorganismos (Massardier-Nageotte y col., 2006; Souza y col., 2016).

Fortunati y col. (2014) evaluaron la biodegradabilidad de películas de PLA con presencia de limoneno (terpeno) encontrando que la tasa de desintegración fue más baja para las películas con un nanorefuerzo. Los autores atribuyeron este fenómeno al aumento de la cristalinidad del sistema debido a la introducción de nanocristales de celulosa, lo que afectó la difusión del agua a través de la matriz de PLA y, en consecuencia, la cinética de desintegración. Watthanaphanit y col. (2008) mediante un ensayo de biodegradación evaluaron fibras de nanocompuestos de alginato reforzado con nanofibras de quitina, las cuales presentaron una rápida degradación.

Pavoni y col. (2021) informaron sobre la biodegradabilidad de una matriz compuesta por quitosano a través de la solubilización con diferentes ácidos como: acético, láctico y glutaraldehído. El Q obtenido a partir de la solubilización en soluciones de ácido láctico y/o acético demostró una alta tasa de biodegradabilidad. Las matrices mostraron diferentes propiedades mecánicas, térmicas y químicas debido a las interacciones con los ácidos utilizados. Además los autores realizaron la evaluación cualitativa de la ecotoxicidad de las matrices elaboradas con ácidos acético y láctico, reticuladas y no reticuladas con glutaraldehído; las pruebas demostraron que la reacción de reticulación retrasa la degradación de las matrices, y el tipo de ácido no afectó este proceso.

En la Figura 9.15 se observa el cambio estructural de la matriz de PVA a medida que avanzó el proceso de biodegradación. La menor tasa de biodegradación obtenida a través de la PP% se pudo corroborar a simple vista dado que la película mantuvo su integridad y elasticidad a lo largo del ensayo.

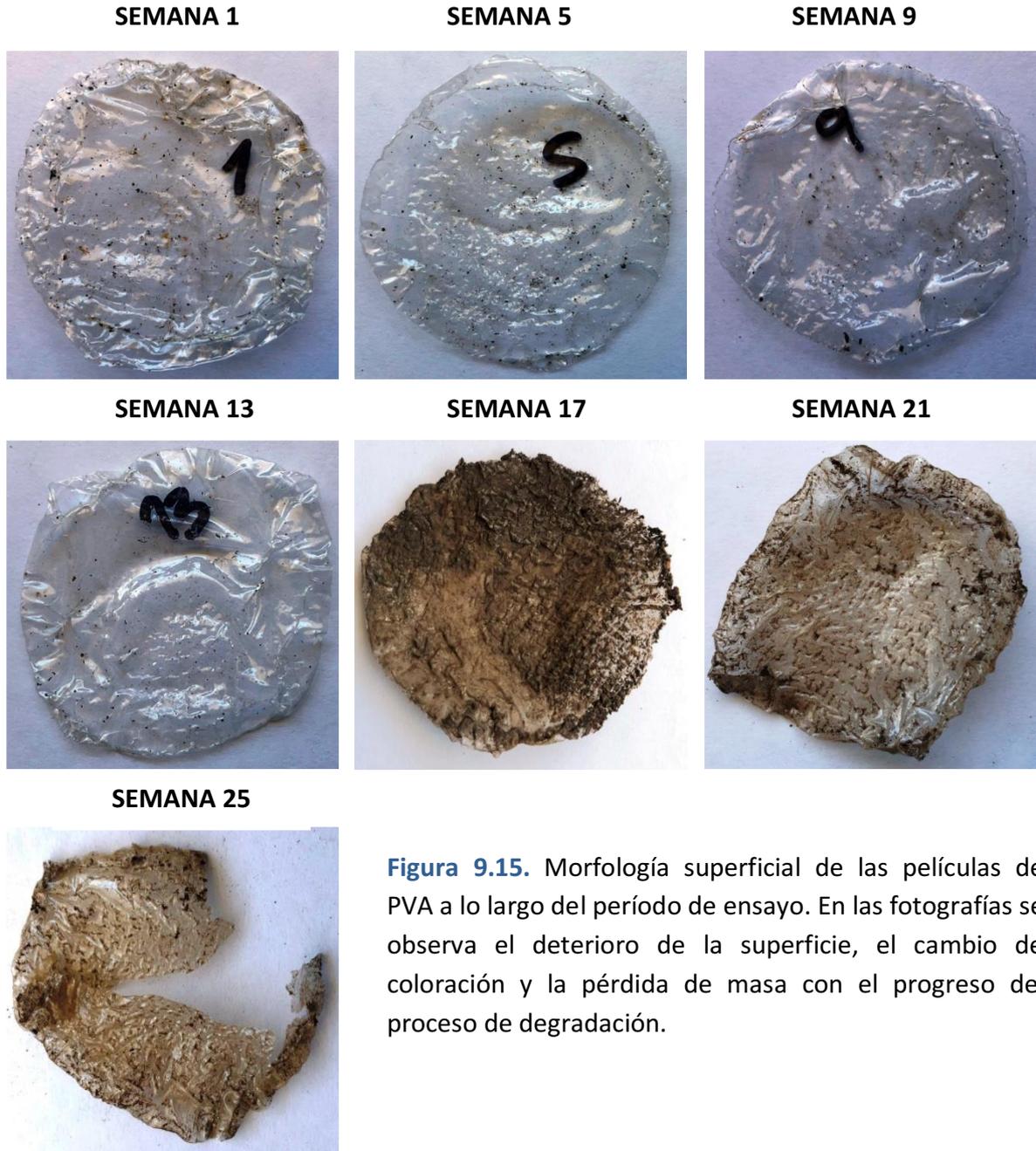


Figura 9.15. Morfología superficial de las películas de PVA a lo largo del período de ensayo. En las fotografías se observa el deterioro de la superficie, el cambio de coloración y la pérdida de masa con el progreso del proceso de degradación.

La presencia de las nanopartículas produjo diferentes efectos sobre la matriz de quitosano. Las partículas de Cu aceleraron el proceso de biodegradabilidad, las de Ag no produjeron modificaciones significativas y las de TiO₂ tornaron más lento el proceso.

Gartiser y col. (1998) realizaron pruebas de degradación anaeróbica para diferentes polímeros biodegradables. La flexibilidad de la cadena del polímero aumentó la biodegradabilidad del mismo. Si una cadena de polímero es más flexible, entonces la reacción de hidrólisis procederá con mayor velocidad y la tasa de biodegradación también aumentará (Li y col., 2016). Esto podría explicar la mayor velocidad de degradación del quitosano respecto a los nanocompuestos si el análisis se realiza en forma global. La incorporación de nanopartículas a una matriz de Q aumentaría la rigidez de los nanocompuestos.

Es importante resaltar que las muestras iniciaron su proceso de biodegradación antes de los 90 días, período en el que los materiales plásticos necesitan desintegrarse para ser considerados biodegradables de acuerdo a Pavoni y col. (2021).

9.5.2 Estudio de las propiedades morfológicas

La caracterización morfológica por SEM fue complementaria de los ensayos de pérdida de peso y análisis visual y fotográfico del material degradado, ayudando a verificar la existencia de la transformación fisicoquímica de la matriz quitosano-nanopartículas a nivel microestructural.

Se puede observar en las Figuras 9.15-9.19 que la degradación resultó de la acción de microorganismos como bacterias u hongos que crecieron sobre las películas a base de quitosano. Este resultado indicaría que la acción de múltiples enzimas microbianas sobre las películas de quitosano conducirían a una endo-escisión de este polímero natural (Cheaburu-yilmaz y col., 2015; Harish Prashanth y col., 2005).

Las muestras a base de quitosano incubadas mostraron agujeros con una distribución aleatoria probablemente debido a la colonización microbiana. Asimismo se observó el tejido micelar que comprende una red de conexiones cruzadas de hifas con sus típicas divisiones en septos, bacterias, así como huellas de larvas y germinación de semillas existentes en el compost.

Capítulo 9: Biodegradación de matrices nanocompuestas a base de quitosano

Según [Harish Prashanth y col., \(2005\)](#), la biodegradación se incrementa rápidamente al comienzo de la hidrólisis pero la velocidad de crecimiento se reduce a medida que la hidrólisis avanza. [de Vries y Visser \(2001\)](#) sugirieron que la reducción se puede atribuir a la inhibición de la acción de la enzima por la acumulación de productos, parcial inactivación de enzimas, o disminución de la accesibilidad de las enzimas cuando la proporción de las zonas cristalinas en el sustrato residual se incrementa.

La quitosanasasa que cataliza la endo-escisión del quitosano y sus derivados es producida por un gran número de microorganismos, incluyendo bacterias y hongos ([Cheng y Li, 2000](#); [Harish Prashanth y col., 2005](#)). El agua y la humedad desempeñan un papel importante en la biodegradabilidad, porque el agua es una condición necesaria para el crecimiento y la reproducción de los microorganismos ([Trivedi y col., 2016](#)). Cuando la humedad aumenta, la actividad microbiana también aumenta y los polímeros se degradan con mayor rapidez. [Ho y col. \(1999\)](#) informaron que la tasa de degradación aumentaba considerablemente con el aumento de la humedad.

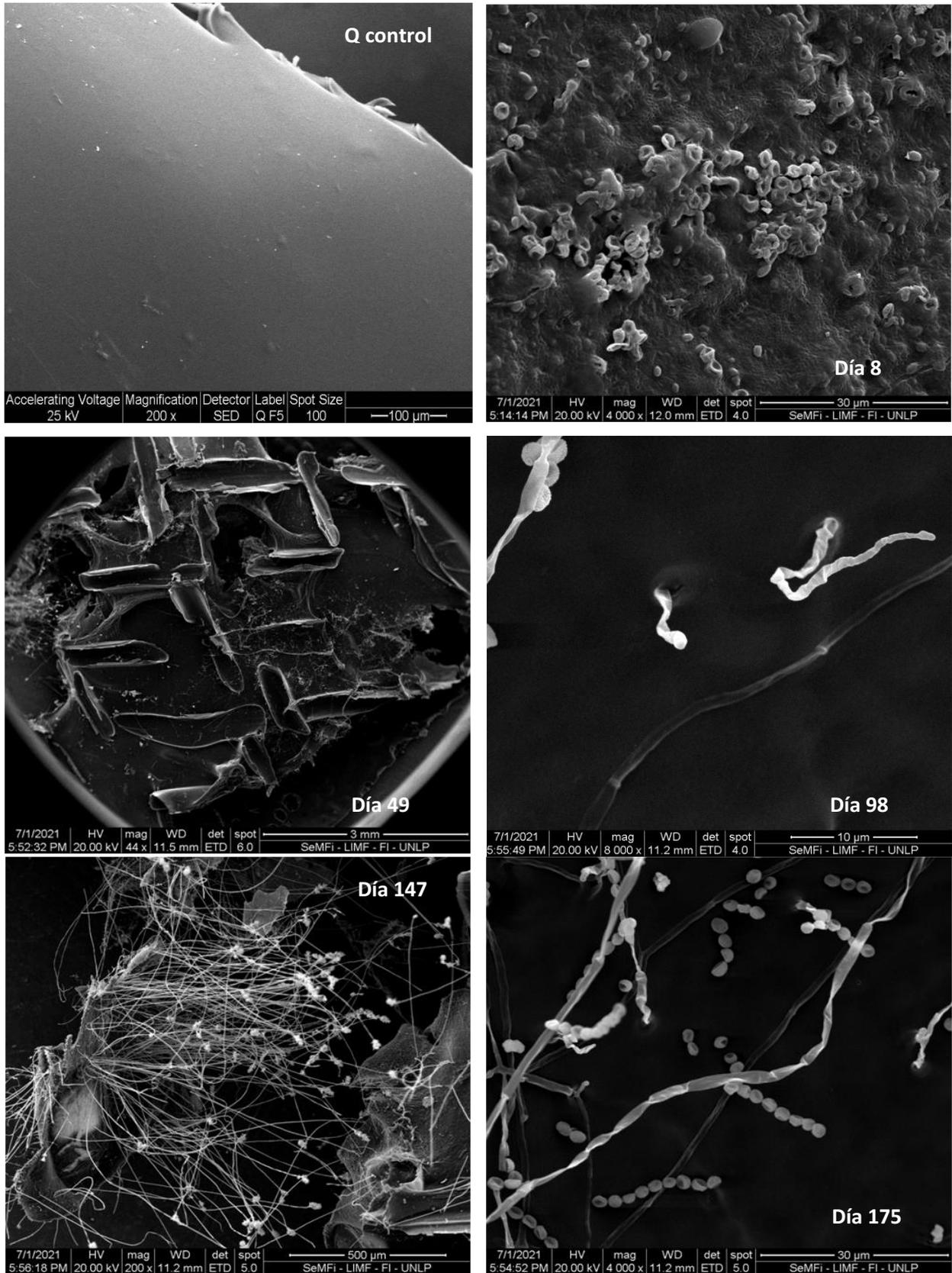


Figura 9.16. Morfología superficial de películas de quitosano (Q) después de 200 días de exposición al medio degradante. El aumento utilizado se muestra en las micrografías.

Capítulo 9: Biodegradación de matrices nanocompuestas a base de quitosano

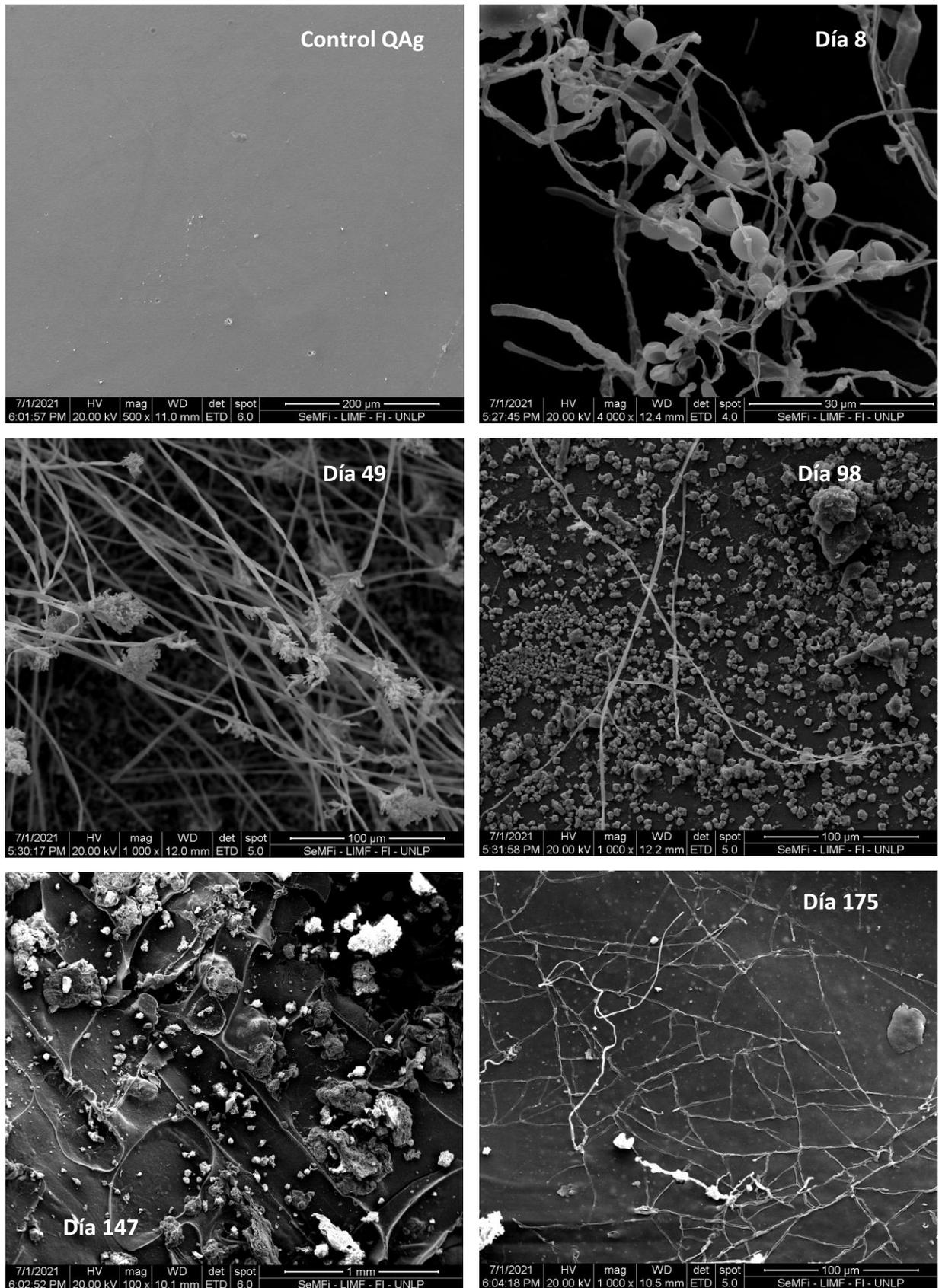


Figura 9.17. Morfología superficial del nacompuesto QAg después de 200 días de exposición al medio degradante. El aumento utilizado se muestra en las micrografías.

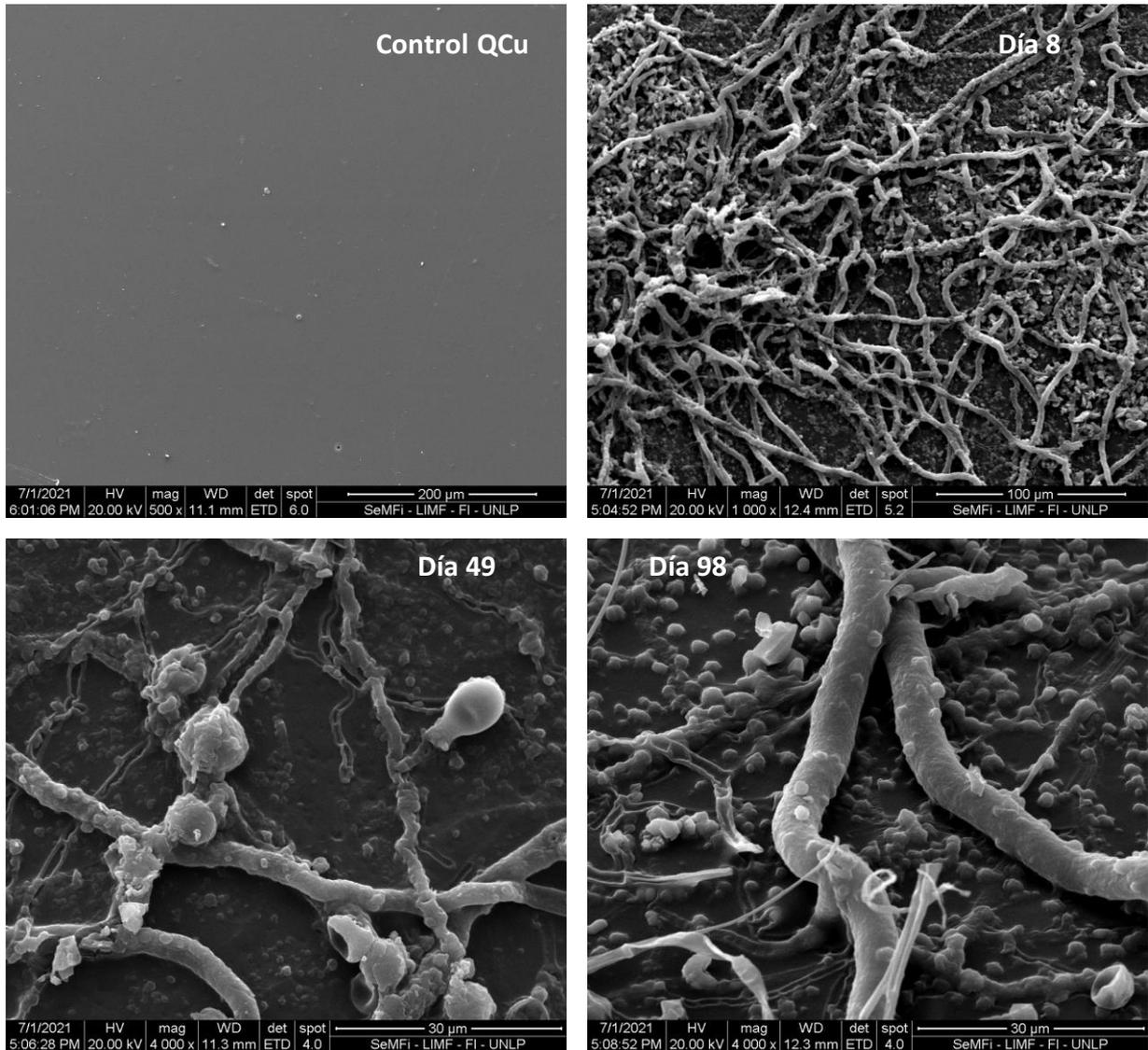


Figura 9.18. Morfología superficial del nacompuesto QCu después de 200 días de exposición al medio degradante. El aumento utilizado se muestra en las micrografías.

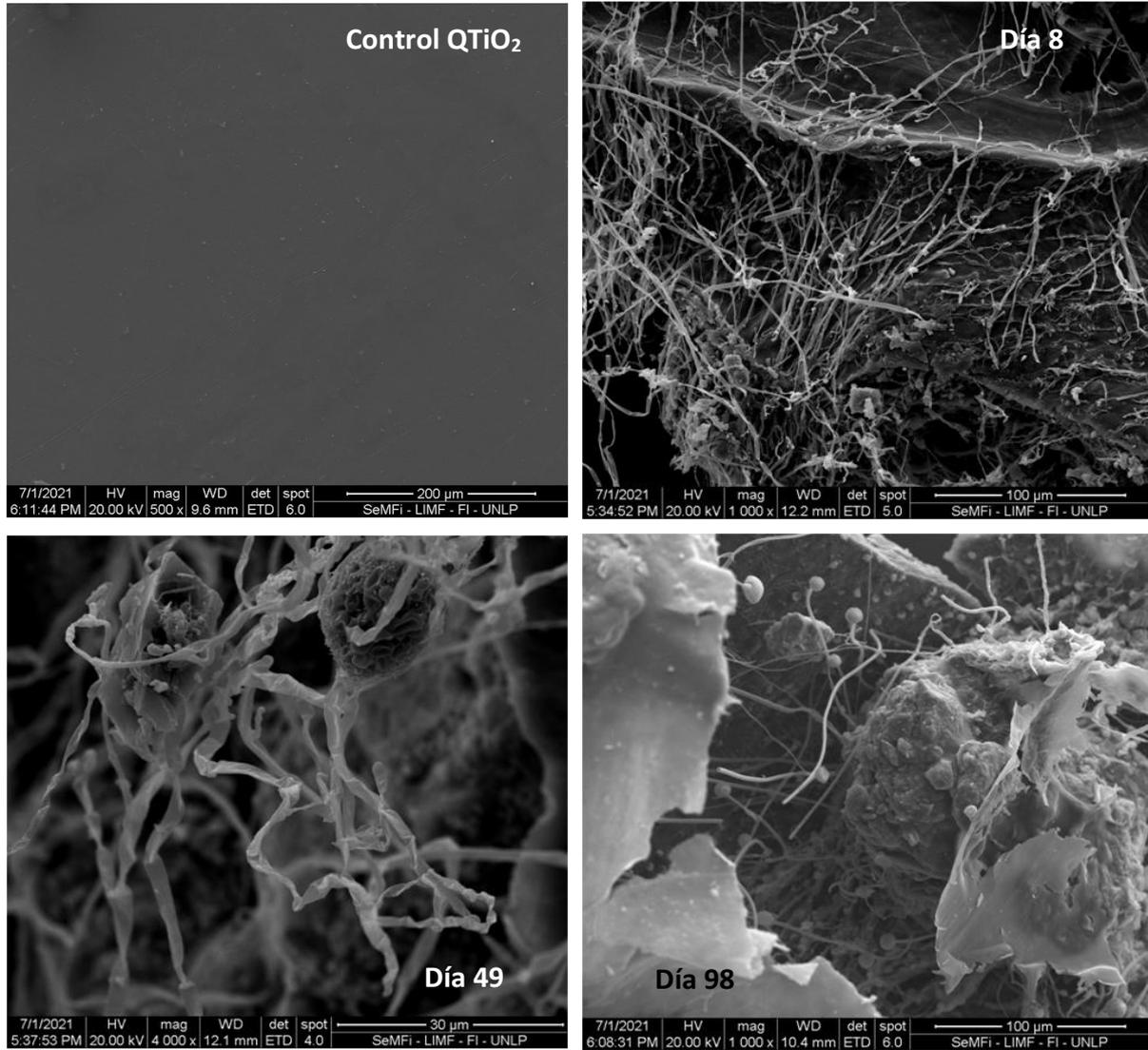


Figura 9.19. Morfología superficial del nacompuesto QT_i después de 200 días de exposición al medio degradante. El aumento utilizado se muestra en las micrografías.

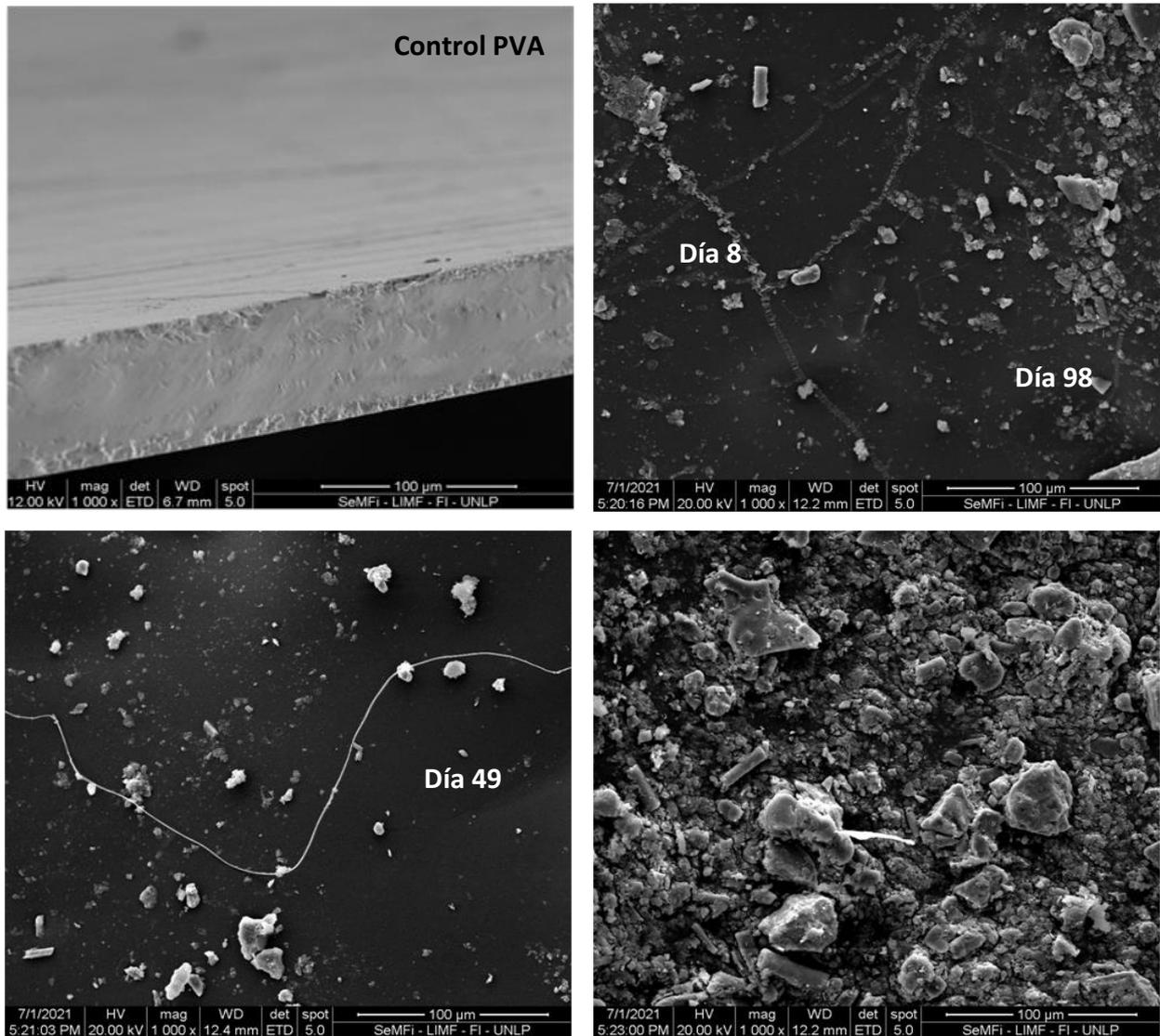


Figura 9.20. Morfología superficial de la película de polivinil alcohol (PVA) después de 200 días de exposición al medio degradante. El aumento utilizado se muestra en las micrografías.

9.5.3 Análisis de la biodegradación mediante ATR-FTIR

El seguimiento del proceso de biodegradación a través de la técnica de ATR-FTIR respaldó los resultados obtenidos a través de la cinética de pérdida de peso.

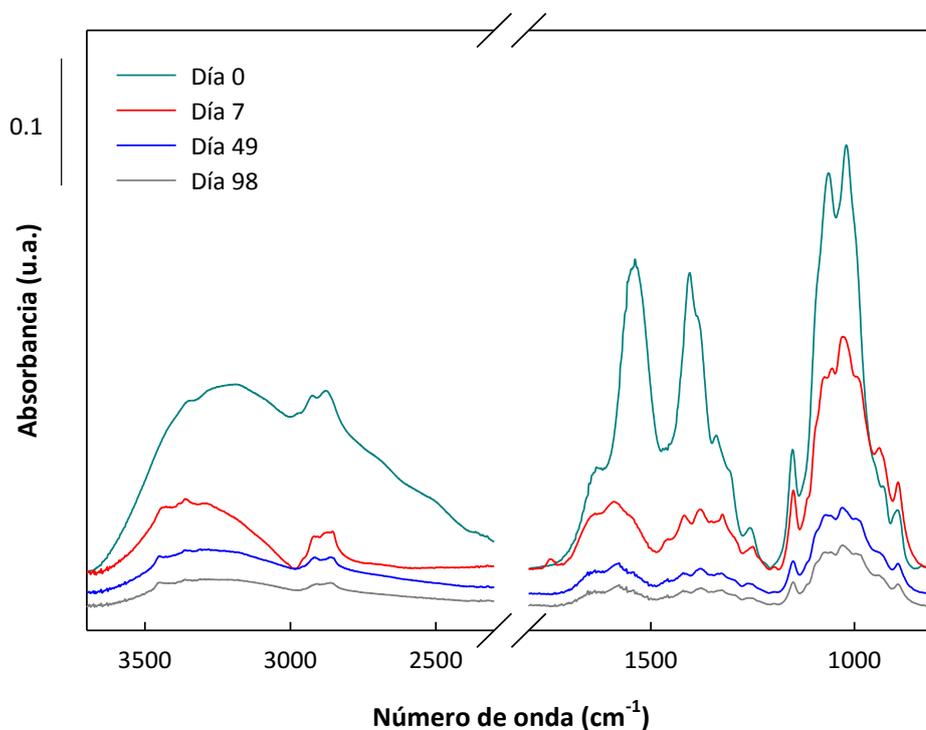


Figura 9.21. Espectro ATR-FTIR de películas de Q mostrando la cinética del proceso de biodegradación.

La [Figura 9.21](#) muestra las variaciones en el espectro de la película Q durante la incubación. El proceso de degradación afectó fuertemente la estructura del polisacárido.

Se encontró que la zona correspondiente a las huellas dactilares localizadas entre 890 y 960 cm^{-1} fue desapareciendo a medida que avanzaba el proceso de biodegradación. La intensidad del pico situado a 1027 cm^{-1} , atribuida al C-O-C grupo, disminuyó significativamente señalando la escisión del quitosano de acuerdo con informes anteriores ([Debandi y col., 2016](#)).

Además, hubo una disminución significativa de la absorbancia de la banda correspondiente a los hidroxilos.

La degradación *in vitro* del quitosano ocurre por oxidación e hidrólisis química o enzimática. El posible mecanismo de degradación del quitosano generalmente comienza con la división aleatoria de los enlaces β -1,4-glicosídicos (depólimerización) seguida de la hidrólisis del enlace N-acetilo (desacetilación). En consecuencia, el peso molecular disminuye y se observa un aumento en el grado de desacetilación. Simultáneamente, puede producirse la escisión de los grupos funcionales del quitosano (amino, carbonilo, amida e hidroxilo), dependiendo de las condiciones químicas y / o enzimáticas. Además, la depólimerización del quitosano puede inducir la formación de radicales libres que pueden conducir a procesos de oxidación (Matica y col., 2017).

La estructura del polímero se ve alterada por fuertes interacciones intermoleculares entre los fragmentos formados de quitosano, lo que conduce a la pérdida irreversible de sus propiedades fisicoquímicas tal como se determinó

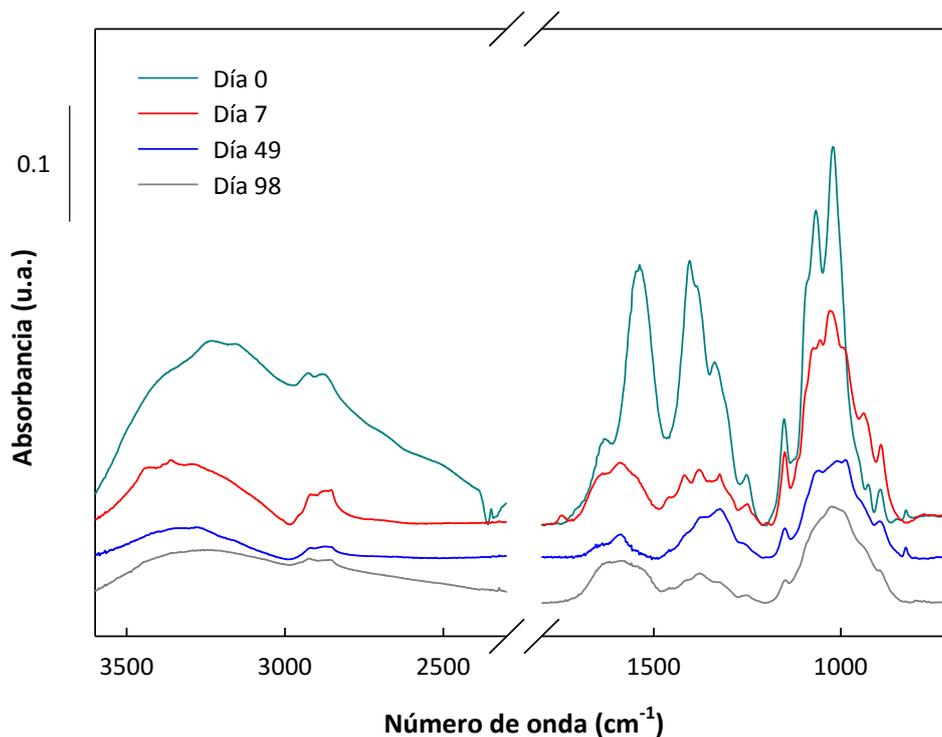


Figura 9.22. Espectros ATR-FTIR de películas de QAg mostrando la cinética del proceso de biodegradación.

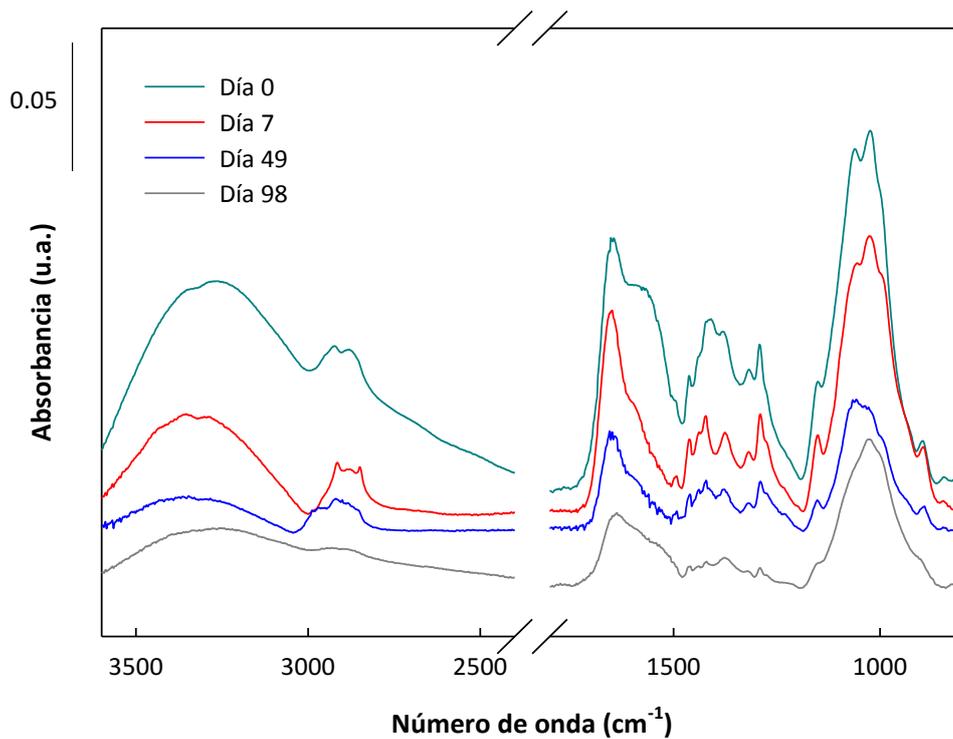


Figura 9.23. Espectros ATR-FTIR de películas de QCu mostrando la cinética del proceso de biodegradación

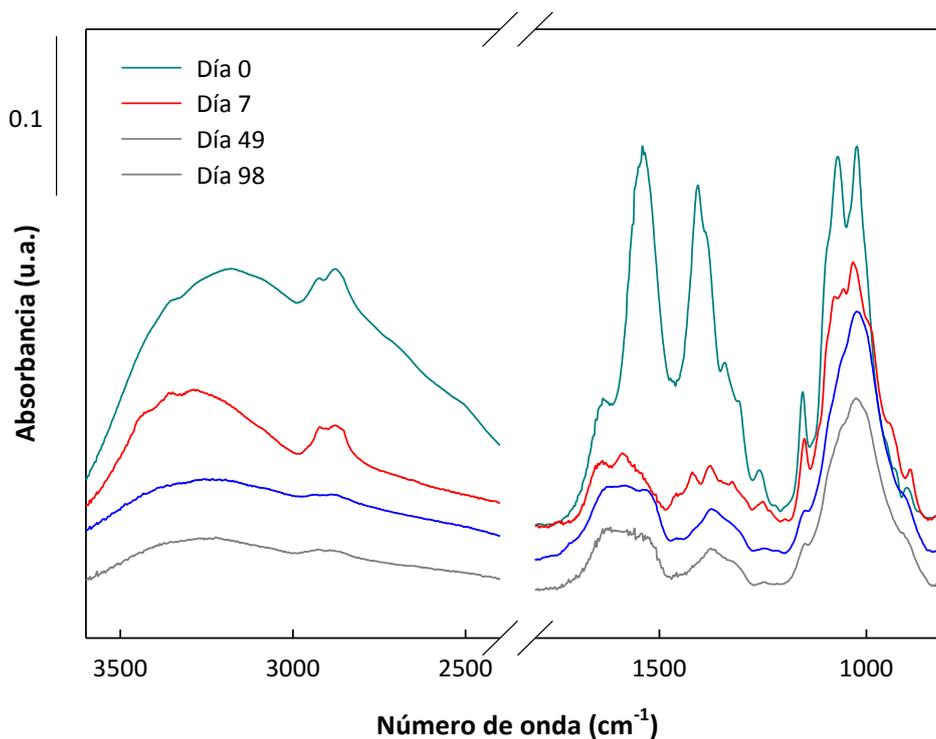


Figura 9.24. Espectros ATR-FTIR de películas de QTl mostrando la cinética del proceso de biodegradación.

En los espectros ATR-FTIR de películas de PVA sometidas al proceso de biodegradación (Figura 9.25) se pudo observar que las bandas de absorción existentes en la estructura inicial del polímero también se encontraron presentes en las muestras biodegradadas (ligera­mente desplazadas), de lo que se puede inferir que no se produjeron modificaciones esenciales en la estructura del polímero. Sin embargo, en las muestras del PVA degradado desaparecieron las bandas de absorción existentes a 1651 y 1568 cm^{-1} en las muestras control, demostrando que los enlaces COOH ($\nu\text{C}=\text{O}$) y COO⁻ ($\nu\text{C}=\text{O}$) resultaron destruidos

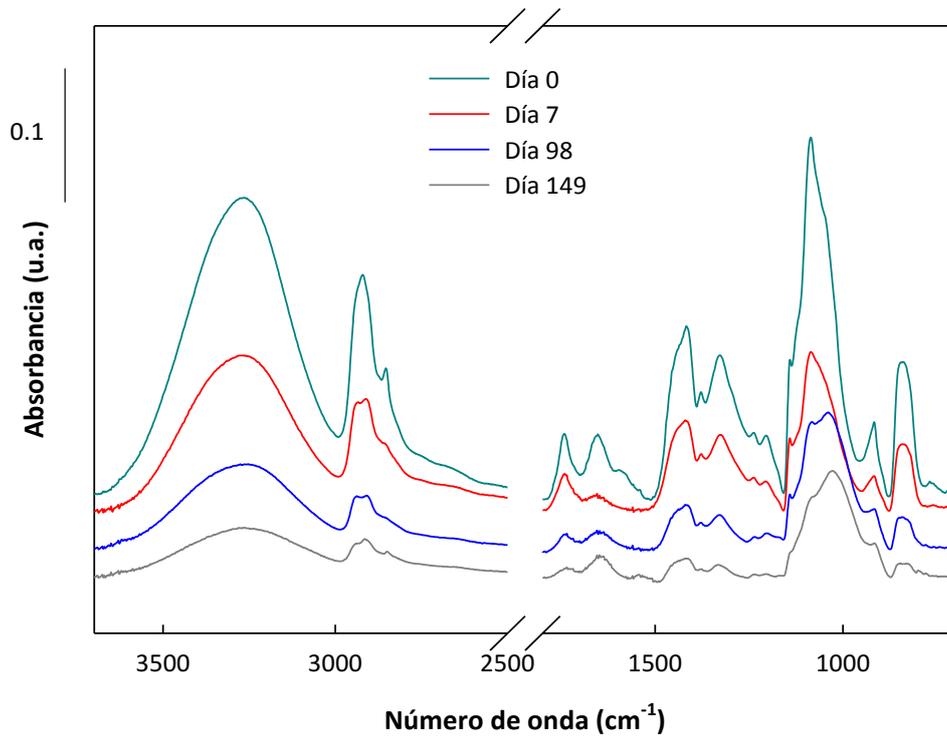


Figura 9.25. Espectros ATR-FTIR de películas de PVA mostrando la cinética del proceso de biodegradación.

9.6 CONCLUSIONES

La tasa de degradación de los productos a base de polímeros depende de sus potenciales aplicaciones. La estructura química influye en la tasa de biodegradación del polímero así como el medio circundante al que se aplica.

Al ser aplicado, la cinética de degradación puede afectar el crecimiento celular, la regeneración de tejidos y la respuesta del huésped. La biodegradación es incluso más importante cuando la matriz se utiliza en seres humanos como vehículos de administración de fármacos o como electrohilado en la ingeniería de tejidos. La biodegradación se puede investigar utilizando métodos de biodegradación *in vitro*, seguidos de modelos *in vivo*.

A través del ensayo de pérdida de peso de los materiales evaluados se pudo visualizar el proceso de biodegradación. Si bien la técnica no resulta ser precisa cuantitativamente es un factor de corroboración del proceso dando resultados iniciales directos más concisos detectables a simple vista. Los materiales entrecruzados con nanopartículas metálicas presentaron un comportamiento de biodegradación similar al del material base Q.

Al comparar los resultados obtenidos en la biodegradación de las matrices nanocompuestas con la matriz control Q se pudo observar que la presencia de las nanopartículas produjo diferentes efectos sobre la matriz de quitosano. Los resultados mostraron una tendencia hacia una menor pérdida de peso seguramente debido a su acción sobre los microorganismos del compost. Después de un cierto tiempo, la matriz control Q fue la que presentó la mayor pérdida de peso que llegó al 70%.

La biodegradación de las matrices a base de quitosano produjo el debilitamiento mecánico de la matriz facilitando en una segunda etapa la ruptura de los enlaces de la cadena a través de procesos de oxidación e hidrólisis.

Por otra parte, la cinética de degradación de las películas de PVA, expresada como pérdida de peso resultó la más lenta comparada con las otras formulaciones, compatible con un polímero sintético. La película mantuvo sus propiedades elásticas y el color hasta la finalización del ensayo.

Capítulo 9: Biodegradación de matrices nanocompuestas a base de quitosano

Las fotografías permitieron observar el cambio de color, la aparición de rugosidad y la pérdida de masa con el avance del proceso de biodegradación. Las micrografías obtenidas por SEM corroboraron los ataques de las enzimas secretadas por diversos microorganismos como bacterias y hongos que produjeron la endo-escisión de la matriz. Asimismo, los espectros obtenidos mediante ATR-FTIR demostraron las transformaciones sufridas por las películas a nivel molecular.

9.7 REFERENCIAS

- Al-Tayyar, N. A., Youssef, A. M., & Al-hindi, R. (2020). Antimicrobial food packaging based on sustainable bio-based materials for reducing foodborne pathogens: A review. *Food Chemistry*, 310, 125915. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125915>
- Alvarez, V. A., Ruseckaite, R. A., & Vázquez, A. (2006). Degradation of sisal fibre/Mater Bi-Y biocomposites buried in soil. *Polymer Degradation and Stability*, 91(12), 3156–3162. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2006.07.011>
- Avila, A. J., Pucci, G., & Strumia, M. C. (2014). Biodegradación en suelo de películas de quitosano injertadas con poli(hema). *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 15(5), 240–251. <http://www.ehu.eus/reviberpol/pdf/SEP14/avila.pdf>
- Azeredo, H., Mattoso, L., & McHugh, T. (2011). Nanocomposites in Food Packaging – A Review. *Advances in Diverse Industrial Applications of Nanocomposites*, 57–78. <https://doi.org/10.5772/1931>
- Azizi, S., Ahmad, M. Bin, Hussein, M. Z., Ibrahim, N. A., & Namvar, F. (2014). Preparation and properties of poly(vinyl alcohol)/chitosan blend bionanocomposites reinforced with cellulose nanocrystals/ZnO-Ag multifunctional nanosized filler. *International Journal of Nanomedicine*, 9(1), 1909–1917. <https://doi.org/10.2147/IJN.S60274>
- Bi, F., Zhang, X., Bai, R., Liu, Y., Liu, J., & Liu, J. (2019). Preparation and characterization of antioxidant and antimicrobial packaging films based on chitosan and proanthocyanidins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 134, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.042>
- Cheaburu-yilmaz, C. N., Yilmaz, O., & Vasile, C. (2015). *Eco-Friendly Chitosan-Based Nanocomposites : Chemistry and Applications*. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2473-0>
- Cheng, C. Y., & Li, Y.-K. (2000). An Aspergillus chitosanase with potential for large-scale preparation of chitosan oligosaccharides. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 32(3), 197. <https://doi.org/10.1042/ba20000063>
- Croisier, F., & Jérôme, C. (2013). Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*, 49(4), 780–792. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2012.12.009>
- Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R. M., & Chiellini, E. (2011). Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 36(8), 981–1014. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.02.001>
- De Paoli, M.-A. (2009). *Degradação E Estabilização De Polímeros* (J. C. De Andrade (ed.); 2ª versão). online. <https://doi.org/Estante de Casa 1a prateleira>
- de Vries, R. P., & Visser, J. A. A. P. (2001). Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(4), 435–437. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.4.497-522.2001>
- Duncan, T. V. (2011). Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. *Journal of Colloid and Interface Science*, 363(1), 1–24.

Capítulo 9: Biodegradación de matrices nanocompuestas a base de quitosano

<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.07.017>

- El-Sayed, S. M., El-Sayed, H. S., Ibrahim, O. A., & Youssef, A. M. (2020). Rational design of chitosan/guar gum/zinc oxide bionanocomposites based on Roselle calyx extract for Ras cheese coating. *Carbohydrate Polymers*, 239, 116234. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116234>
- Emadian, S. M., Onay, T. T., & Demirel, B. (2017). Biodegradation of bioplastics in natural environments. *Waste Management*, 59, 526–536. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.10.006>
- EU unión europea. (2013). *GREEN PAPER On a European Strategy on Plastic Waste in the Environment*. Eur-Lex. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:52013DC0123>
- Eubeler, J. P., Bernhard, M., & Knepper, T. P. (2010). Environmental biodegradation of synthetic polymers II. Biodegradation of different polymer groups. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 29(1), 84–100. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.09.005>
- European Bioplastic Nova Institute. (2019). *Bioplastics market data 2024*. European Bioplastics. <https://www.european-bioplastics.org/market/>
- Fortunati, E., Luzi, F., Puglia, D., Dominici, F., Santulli, C., Kenny, J. M., & Torre, L. (2014). Investigation of thermo-mechanical, chemical and degradative properties of PLA-limonene films reinforced with cellulose nanocrystals extracted from Phormium tenax leaves. *European Polymer Journal*, 56(1), 77–91. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.03.030>
- Fukushima, K., Tabuani, D., Abbate, C., Arena, M., & Ferreri, L. (2010). Effect of sepiolite on the biodegradation of poly(lactic acid) and polycaprolactone. *Polymer Degradation and Stability*, 95(10), 2049–2056. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2010.07.004>
- Fukushima, K., Tabuani, D., Arena, M., Gennari, M., & Camino, G. (2013). Effect of clay type and loading on thermal, mechanical properties and biodegradation of poly(lactic acid) nanocomposites. *Reactive and Functional Polymers*, 73(3), 540–549. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2013.01.003>
- Gartiser, S., Wallrabenstein, M., & Stiene, G. (1998). Assessment of several test methods for the determination of the anaerobic biodegradability of polymers. *Journal of Environmental Polymer Degradation*, 6(3), 159–173. <https://doi.org/10.1023/A:1021869530253>
- Gorrasi, G., & Pantani, R. (2013). Effect of PLA grades and morphologies on hydrolytic degradation at composting temperature: Assessment of structural modification and kinetic parameters. *Polymer Degradation and Stability*, 98(5), 1006–1014. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2013.02.005>
- Gutiérrez, T. J., & Alvarez, V. A. (2018). Bionanocomposite films developed from corn starch and natural and modified nano-clays with or without added blueberry extract. *Food Hydrocolloids*, 77, 407–420. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.10.017>
- Harish Prashanth, K. V., Lakshman, K., Shamala, T. R., & Tharanathan, R. N. (2005). Biodegradation of chitosan-graft-polymethylmethacrylate films. *International Biodeterioration and*

Capítulo 9: Biodegradación de matrices nanocompuestas a base de quitosano

Biodegradation, 56(2), 115–120. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2005.06.007>

- Ho, K. L. G., Pometto, A. L., Gadea-Rivas, A., Briceño, J. A., & Rojas, A. (1999). Degradation of polylactic acid (PLA) plastic in Costa Rican soil and Iowa State University compost rows. *Journal of Environmental Polymer Degradation*, 7(4), 173–177. <https://doi.org/10.1023/A:1022874530586>
- Ho, K. L. G., Pometto, A. L., & Hinz, P. N. (1999). Effects of temperature and relative humidity on polylactic acid plastic degradation. *Journal of Environmental Polymer Degradation*, 7(2), 83–92. <https://doi.org/10.1023/A:1021808317416>
- Ivar Do Sul, J. A., & Costa, M. F. (2014). The present and future of microplastic pollution in the marine environment. *Environmental Pollution*, 185, 352–364. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.036>
- Jain, R., & Tiwari, A. (2015). Biosynthesis of planet friendly bioplastics using renewable carbon source. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 13(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/s40201-015-0165-3>
- Kale, G., Kijchavengkul, T., Auras, R., Rubino, M., Selke, S. E., & Singh, S. P. (2007). Compostability of bioplastic packaging materials: An overview. *Macromolecular Bioscience*, 7(3), 255–277. <https://doi.org/10.1002/mabi.200600168>
- Lamarra, J. andrés. (2019). *Matrices biodegradables como soportes de micro y nanopartículas activas para su aplicación como sistemas de liberación controlada*. Universidad Nacional de la Plata. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/75093>
- Laycock, B., Nikolić, M., Colwell, J. M., Gauthier, E., Halley, P., Bottle, S., & George, G. (2017). Lifetime prediction of biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science*, 71, 144–189. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2017.02.004>
- Lee, S. R., Park, H. M., Lim, H., Kang, T., Li, X., Cho, W. J., & Ha, C. S. (2002). Microstructure, tensile properties, and biodegradability of aliphatic polyester/clay nanocomposites. *Polymer*, 43(8), 2495–2500. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(02\)00012-5](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(02)00012-5)
- Li, W. C., Tse, H. F., & Fok, L. (2016). Plastic waste in the marine environment: A review of sources, occurrence and effects. *Science of the Total Environment*, 566–567, 333–349. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.084>
- Lucas, N., Bienaime, C., Belloy, C., Queneudec, M., Silvestre, F., & Nava-Saucedo, J. E. (2008). Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques - A review. *Chemosphere*, 73(4), 429–442. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.06.064>
- Ludueña, L. N., Vázquez, A., & Alvarez, V. A. (2013). Effect of the type of clay organo-modifier on the morphology, thermal/mechanical/impact/barrier properties and biodegradation in soil of polycaprolactone/clay nanocomposites. *Journal of Applied Polymer Science*, 128(5), 2648–2657. <https://doi.org/10.1002/app.38425>
- Ludueña, L., Vázquez, A., & Alvarez, V. (2012). Effect of lignocellulosic filler type and content on the behavior of polycaprolactone based eco-composites for packaging applications. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 411–421. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.07.064>

Capítulo 9: Biodegradación de matrices nanocompuestas a base de quitosano

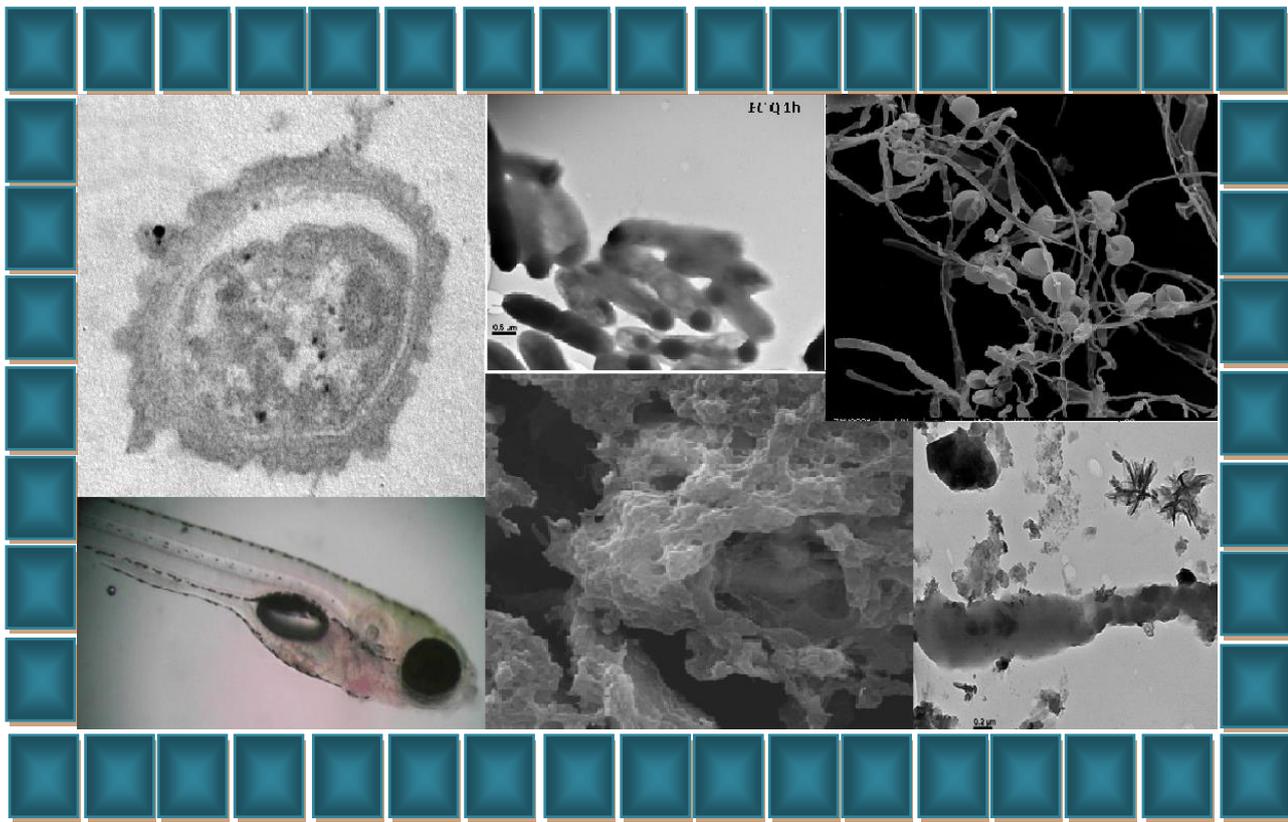
- Makarios-Laham, I., & Lee, T. C. (1995). Biodegradability of chitin- and chitosan-containing films in soil environment. *Journal of Environmental Polymer Degradation*, 3(1), 31–36. <https://doi.org/10.1007/BF02067791>
- Maria V, D., Bernal, C., & Francois, N. J. (2016). Development of Biodegradable Films Based on Chitosan/Glycerol Blends Suitable for Biomedical Applications. *Journal of Tissue Science & Engineering*, 07(03). <https://doi.org/10.4172/2157-7552.1000187>
- Matica, A., Menghiu, G., & Ostafe, V. (2017). Biodegradability of Chitosan Based. *New Frontiers in Chemistry*, 26(1), 75–86.
- Mekonnen, T., Mussone, P., Khalil, H., & Bressler, D. (2013). Progress in bio-based plastics and plasticizing modifications. *Journal of Materials Chemistry A*, 1(43), 13379–13398. <https://doi.org/10.1039/c3ta12555f>
- Meneses, J., Corrales, C. M., & Valencia, M. (2007). Síntesis y caracterización de un polímero biodegradable a partir del almidón de yuca. *Revista EIA*, 8, 57–67. http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1794-12372007000200006&script=sci_abstract&tlng=pt
- Mohanty, A. K., Misra, M., & Hinrichsen, G. (2000). Biofibres, biodegradable polymers and biocomposites: An overview Summary of contents 1. Introduction 2. Reinforcing biofibres 2.1 Chemical constituents and structural aspects 2.2 Properties of biofibres 2.3 Degradation properties of biofibres 2.4 Cost asp. *Macromol. Mater. Eng.* 276, 277, 1–24.
- Mohee, R., Unmar, G. D., Mudhoo, A., & Khadoo, P. (2008). Biodegradability of biodegradable/degradable plastic materials under aerobic and anaerobic conditions. *Waste Management*, 28(9), 1624–1629. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2007.07.003>
- Mousavi Khaneghah, A., Hashemi, S. M. B., & Limbo, S. (2018). Antimicrobial agents and packaging systems in antimicrobial active food packaging: An overview of approaches and interactions. *Food and Bioproducts Processing*, 111, 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.05.001>
- Pantani, R., & Sorrentino, A. (2013). Influence of crystallinity on the biodegradation rate of injection-moulded poly(lactic acid) samples in controlled composting conditions. *Polymer Degradation and Stability*, 98(5), 1089–1096. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2013.01.005>
- Pathak, S., Sneha, C. L. R., & Mathew, B. B. (2014). Bioplastics: its timeline based scenario & challenges. *Journal of Polymer and Biopolymer Physics Chemistry*, 2(4), 84–90.
- Pavoni, J. M. F., dos Santos, N. Z., May, I. C., Pollo, L. D., & Tessaro, I. C. (2021). Impact of acid type and glutaraldehyde crosslinking in the physicochemical and mechanical properties and biodegradability of chitosan films. *Polymer Bulletin*, 78(2), 981–1000. <https://doi.org/10.1007/s00289-020-03140-4>
- Piñeros-Hernandez, D., Medina-Jaramillo, C., López-Córdoba, A., & Goyanes, S. (2017). Edible cassava starch films carrying rosemary antioxidant extracts for potential use as active food packaging. *Food Hydrocolloids*, 63, 488–495. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.09.034>
- Ramos, M., Fortunati, E., Peltzer, M., Dominici, F., Jiménez, A., Garrigós, M. D. C., & Kenny, J. M.

Capítulo 9: Biodegradación de matrices nanocompuestas a base de quitosano

- (2014). Influence of thymol and silver nanoparticles on the degradation of poly(lactic acid) based nanocomposites: Thermal and morphological properties. *Polymer Degradation and Stability*, 108, 158–165. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2014.02.011>
- Reddy, M. M., Vivekanandhan, S., Misra, M., Bhatia, S. K., & Mohanty, A. K. (2013). Biobased plastics and bionanocomposites: Current status and future opportunities. *Progress in Polymer Science*, 38(10–11), 1653–1689. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.05.006>
- Rimdusit, S., Jingjid, S., Damrongsakkul, S., Tiptipakorn, S., & Takeichi, T. (2008). Biodegradability and property characterizations of Methyl Cellulose: Effect of nanocompositing and chemical crosslinking. *Carbohydrate Polymers*, 72(3), 444–455. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.09.007>
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 31(7), 603–632. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>
- Rivero, S. G. M. (2012). *ESTUDIO Y APLICACIÓN DE PELÍCULAS ACTIVAS A BASE DE QUITOSANO* (2012th ed.) [Universidad Nacional de La Plata]. http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/35612/Documento_completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Sermantiwanit, K., & Phattanarudee, S. (2012). Preparation of bio-based nanocomposite emulsions: Effect of clay type. *Progress in Organic Coatings*, 74(4), 660–666. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2011.09.033>
- Singh, P., Kim, Y., Zhang, D., & Yang, D. (2016). Biological Synthesis of Nanoparticles from Plants and Microorganisms. *Trends in Biotechnology*, 34(7), 588–599. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.02.006>
- Souza, V. G. L., & Fernando, A. L. (2016). Nanoparticles in food packaging: Biodegradability and potential migration to food-A review. *Food Packaging and Shelf Life*, 8, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2016.04.001>
- Standard A. D5988-03. (2003). *Standard test method for determining aerobic biodegradation in soil of plastic materials or residual plastic materials after composting*. ASTM International. <https://doi.org/10.1520/D5988-18>
- Szymańska, E., & Winnicka, K. (2015). Stability of chitosan - A challenge for pharmaceutical and biomedical applications. *Marine Drugs*, 13(4), 1819–1846. <https://doi.org/10.3390/md13041819>
- Thakur, S., Chaudhary, J., Sharma, B., Verma, A., Tamulevicius, S., & Thakur, V. K. (2018). Sustainability of bioplastics: Opportunities and challenges. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 13, 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2018.04.013>
- Tokiwa, Y., Calabia, B. P., Ugwu, C. U., & Aiba, S. (2009). Biodegradability of plastics. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(9), 3722–3742. <https://doi.org/10.3390/ijms10093722>
- Trivedi, P., Hasan, A., Akhtar, S., Siddiqui, M. H., Sayeed, U., Kalim, M., & Khan, A. (2016). Role of microbes in degradation of synthetic plastics and manufacture of bioplastics. *Available Online Wwww.Jocpr.Com Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8(3), 211–216.

www.jocpr.com

- Vázquez-Rodríguez, G. A., & Beltrán-Hernández, R. I. (2004). Pruebas normalizadas para la evaluación de la biodegradabilidad de sustancias químicas. una revisión. *Interciencia*, 29(10), 568–573. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442004001000005&lng=es&nrm=iso&tlng=en
- Vroman, I., & Tighzert, L. (2009). Biodegradable polymers. *Materials*, 2(2), 307–344. <https://doi.org/10.3390/ma2020307>
- Watthanaphanit, A., Pitt, S., Hiroshi, T., Seiichi, T., & Ratana, R. (2008). Fabrication, Structure, and Properties of Chitin Whisker-Reinforced Alginate Nanocomposite Fibers. *Wiley InterScience*. <https://doi.org/10.1002/app.28634>
- Weian, Z., Wei, L., & Yue'E, F. (2005). Synthesis and properties of a novel hydrogel nanocomposites. *Materials Letters*, 59(23), 2876–2880. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2005.04.033>
- Wright, S. L., Rowe, D., Thompson, R. C., & Galloway, T. S. (2013). Microplastic ingestion decreases energy reserves in marine worms. *Current Biology*, 23(23), R1031–R1033. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.10.068>
- Xu, J., McCarthy, S. P., Gross, R. A., & Kaplan, D. L. (1996). Chitosan film acylation and effects on biodegradability. *Macromolecules*, 29(10), 3436–3440. <https://doi.org/10.1021/ma951638b>
- Youssef, H. F., El-Naggar, M. E., Fouda, F. K., & Youssef, A. M. (2019). Antimicrobial packaging film based on biodegradable CMC/PVA-zeolite doped with noble metal cations. *Food Packaging and Shelf Life*, 22(August), 100378. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100378>
- Zhang, H., & Neau, S. H. (2001). In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: Effect of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials*, 22(12), 1653–1658. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00326-4](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00326-4)
- Zhang, L., Liu, H., Zheng, L., Zhang, J., Du, Y., & Feng, H. (1996). Biodegradability of Regenerated Cellulose Films in Soil. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 35(12), 4682–4685. <https://doi.org/10.1021/ie950624r>



Conclusiones generales

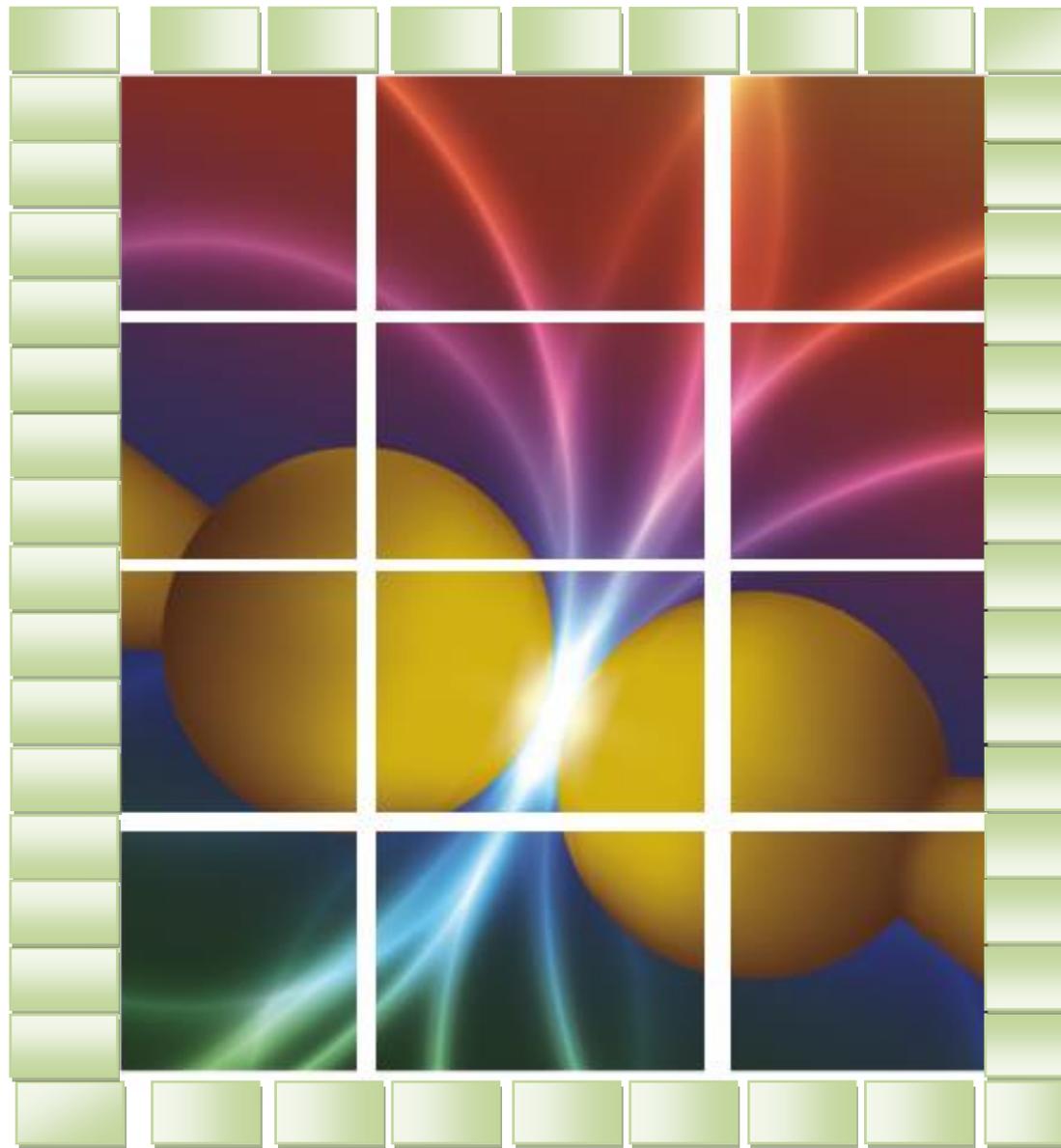
CONCLUSIONES GENERALES

- Se diseñaron nanopartículas de plata *in situ* en soluciones de quitosano y de cobre en soluciones de polivinil pirrolidona
- Se desarrollaron suspensiones a base de quitosano con incorporación de distintas concentraciones de nanopartículas de cobre, plata u óxido de titanio cuya concentración mínima inhibitoria se determinó frente a bacterias Gram positivas, Gram negativas y levaduras
- Se mejoraron las propiedades de los nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de cobre o plata mediante mezclado con PVA. Se estudió la hemocompatibilidad de los estos nanocompuestos QCu-PVA y QAg-PVA, así como la capacidad hemostática: tiempo de coagulación, adhesión de plaquetas y porcentaje de hemólisis. Los nanocompuestos QCu-PVA se pusieron en contacto con un sistema modelo alimenticio donde se determinó la transferencia de iones cobre desde la película a la matriz modelo.
- Se confirmó la capacidad autolimpiante fotoinducida de las nanoestructuras híbridas con partículas de óxido de titanio en interfases gas sólido sometidas a diferentes longitudes de onda utilizando como molécula objetivo el colorante catiónico verde de malaquita. El análisis de los ciclos de reutilización permitió analizar la estabilidad de las nanoestructuras híbridas autolimpiantes.
- Se probaron las propiedades antimicrobianas de los nanocompuestos a base de quitosano con nanopartículas de Cu, Ag o TiO₂ y sus mezclas con PVA frente a bacterias Gram positivas, Gram negativas y levaduras empleando diferentes métodos, difusión en agar, observación por SEM y TEM, cortes histológicos para TEM, ATR-FTIR y potencial zeta.
- Se generaron matrices electrohiladas a base de PVA y PVP con y sin incorporación de nanopartículas de cobre. Las matrices electrohiladas cargadas con nanopartículas de cobre se aplicaron como filtros para retener material particulado del medio ambiente de tamaños menores que 2.5 y 10 µm.
- Se desarrollaron sistemas bicapa mediante formación de una capa electrohilada sobre una película obtenida por moldeo a base de quitosano para mejorar las propiedades mecánicas del sistema y diseñar un sistema con propiedades diferenciadas en cada capa.

Conclusiones generales

- Se realizó un estudio citotóxico de las suspensiones de nanopartículas y nanocompuestos frente a la línea de células HaCaT que mantuvo una alta viabilidad frente a las películas funcionalizadas. Asimismo se analizó la toxicidad sobre larvas de peces *zebra fish* estudiando diversos parámetros, morfología, frecuencia cardíaca, movimiento espontáneo, mortalidad.
- Se confirmó la biodegradabilidad de las matrices a base de quitosano con incorporación de nanopartículas usando las películas de quitosano y PVA individuales como controles a través de diferentes métodos, pérdida de peso, fotografías, micrografías SEM y ATR-FTIR.
- De la búsqueda de información, análisis y experimentos realizados a lo largo de la elaboración de este trabajo de Tesis se puso de manifiesto la necesidad de ahondar más en el estudio de su toxicidad, para prevenir posibles repercusiones y/o riesgos sobre la salud pública. Aún no se dispone del marco legislativo adecuado por lo que es necesario desarrollarlo para todas las formulaciones, de forma que se puedan aprovechar los beneficios de los nanomateriales sin poner en riesgo la salud de los consumidores y del medio ambiente.

En conclusión, se diseñaron materiales biocompatibles a base de polímeros naturales y sintéticos como sistemas portadores de nanopartículas potencialmente aplicables en diferentes áreas como farmacológica y medio ambiente, así como en el ámbito de los alimentos bajo la forma de bandejas portadoras o para retención de exudados.



Anexo

Técnicas de caracterización

Permeabilidad al vapor de agua (WVP)

La cuantificación precisa de la permeabilidad de las moléculas de agua a través de un material es de interés para la caracterización de las películas y la determinación de su utilidad como material para envases, así como barrera para la aplicación como apósitos.

La determinación de la permeabilidad al vapor de agua (WVP) se basa en técnicas gravimétricas. Este ensayo ha sido estandarizada por la norma [ASTM E96 \(E96M-12, 2012\)](#). La fuerza motriz que permite la transferencia de vapor de agua es un gradiente de concentraciones y por ende de presiones. La transferencia está gobernada por el mecanismo de solución -difusión. En este mecanismo el gas es sorbido sobre la superficie de la película del lado de mayor concentración, se difunde a través del espesor de la película y finalmente se desorbe del lado de menor concentración.

La tasa de transmisión de vapor de agua (WVTR) se calcula a partir de la regresión lineal de la pendiente de la ganancia de peso en función del tiempo y luego se divide por el área expuesta de las películas. La permeancia se obtiene dividiendo WVTR por la diferencia de presión entre ambas caras de la película. Luego, se calcula la permeabilidad al vapor de agua como el producto de la permeancia y el espesor promedio de la película. Una vez alcanzado el estado estacionario, en el cual la cantidad de gas permeante no cambia con el tiempo, la permeación o intercambio de moléculas a través de la película se efectuará a una velocidad constante generándose una diferencia de presión entre los dos lados de la película, tal y como lo representa la [Figura 1](#).

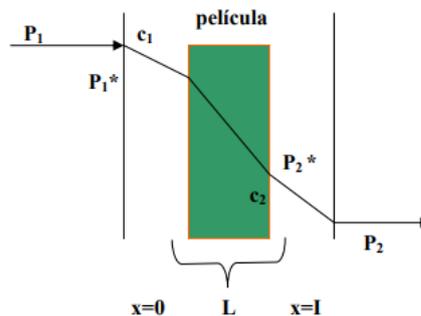


Figura 1. Transferencia de un gas a través de una película permeable en un régimen estacionario (Lozada, 2001).

Bajo estas condiciones el fenómeno está descrito por la ley de Fick:

$$N = A t D \left(\frac{dc}{dx} \right)$$

donde,

N es la cantidad de gas que se difunde a través del área A de la película en el tiempo t, D es la constante de difusión, dc/dx es el gradiente de concentración que atraviesa la película de espesor x (Catalá y Gavara, 2000).

Integrando,

$$N = \frac{A t D}{L} (c_1 - c_2)$$

donde,

c_1 y c_2 son las concentraciones de gas en las dos superficies de la película, L es el espesor de la película (Catalá y Gavara, 2000).

Las concentraciones de gas suelen expresarse en términos de su presión parcial (p) la cual se encuentra en equilibrio con la película. Por ello se suele expresar c como el producto Sx_p , en donde S es el coeficiente de solubilidad del gas en la película de acuerdo a la Ley de Henry. Sustituyendo se obtiene:

$$N = \frac{A t S D}{L} (p_1 - p_2)$$

La permeabilidad (P) se define como el producto de la difusión (D) por la solubilidad (S):

$$P = D S$$

$$P = \frac{N L}{A t (p_1 - p_2)}$$

Existe una gran cantidad de factores que afectan el fenómeno de permeabilidad.

- la difusión depende de la cantidad y del tamaño de los poros, requiriéndose una energía de activación para que las moléculas atravesasen la membrana polimérica.
- estructura química, cristalinidad, tamaño de las cadenas, densidad, ramificaciones de las cadenas, peso molecular, grado de polimerización, enlaces dobles, aditivos, plastificantes, pigmentos y grado de reticulación del polímero.
- tamaño, forma y polaridad del gas, junto con su facilidad de condensación afectan de manera importante la permeabilidad.
- la temperatura sigue el modelo de Arrhenius

➤ para los gases ideales, existe una proporcionalidad entre el coeficiente de transferencia ($N/A t$) y la diferencia de presión (Δp) entre las dos caras del polímero. Sin embargo, una vez alcanzado el equilibrio, la permeabilidad es independiente de la diferencia de presión (Pascat, 1986).

➤ la velocidad de transferencia es inversamente proporcional al espesor (L) de la película y es directamente proporcional al área de exposición (A) (Pascat, 1986).

El método utiliza celdas cubiertas con la película sometida a ensayo. Rellenando las celdas con un desecante, solución salada saturada o agua, se genera una diferencia parcial de presión de vapor de agua con el medio ambiente, lo que resulta en una migración de las moléculas de agua a través de la película (Figura 2). Esta migración se determina gravimétricamente pesando la masa de la celda. El resultado es un cambio constante del peso de la celda con la muestra de película que se mide por medio de una balanza analítica (Figura 3).

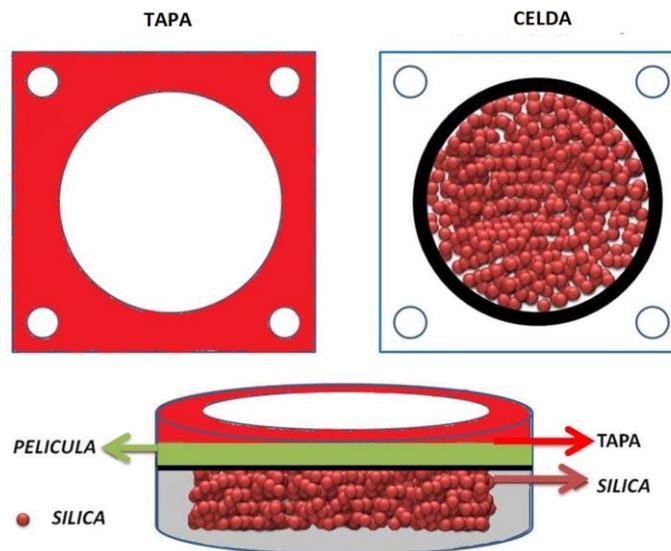


Figura 2. Diagrama de la celda de permeabilidad utilizada para evaluar las propiedades de barrera al vapor de agua.

Un aumento continuo de peso indica la absorción de moléculas de agua que migraron a través de la membrana por el adsorbente colocado en el interior de la celda. La pendiente de la curva está directamente relacionada con la diferencia de presión de vapor de agua entre el interior y el exterior de la celda.

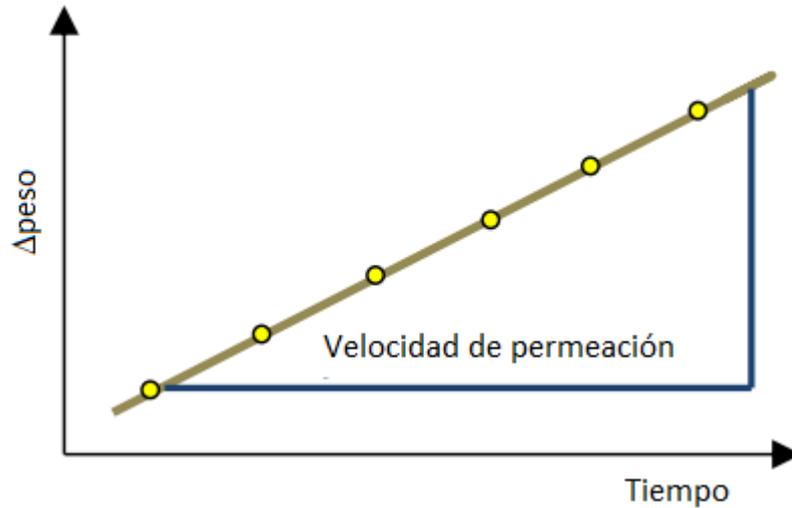


Figura 3. Variación de peso de la película en función del tiempo. La pendiente permite determinar la velocidad de permeación.

La diferencia en la absorción de agua entre las dos muestras mostradas de la película de envoltura es un resultado de desviaciones en el espesor de la película. Por lo tanto, es muy importante utilizar sólo la parte lineal de las curvas de permeabilidad para el cálculo de la tasa de migración de vapor de agua.

Ángulo de contacto

La medición del ángulo de contacto es uno de los métodos eficaces para estudiar la interacción superficial a través de un sistema trifásico (sólido/líquido/aire) (Figura 4). Considerando la caída de un líquido sobre una superficie plana, horizontal, el ángulo formado por la intersección de la interfase líquido-vapor y la interfase líquido-sólido se llama ángulo de contacto. La interfase en la que coexisten líquido, sólido y vapor se considera como la línea de contacto de las tres fases (Snoeijs y Andreotti, 2008).

Como fue definido por primera vez por (Young, 1805), la ecuación derivada establece un balance de energía entre las tres tensiones interfaciales en equilibrio dado por:

$$\cos \theta = \frac{\gamma_{SG} - \gamma_{SL}}{\gamma_{LG}}$$

donde,

θ representa el ángulo de contacto, γ_{SG} , γ_{LG} y γ_{SL} simbolizan las tensiones superficiales entre las interfases sólido-gas, sólido-líquido y líquido-gas, respectivamente.

La ecuación se basa a la hipótesis de que la superficie debe ser rígida, plana, no reactiva, inerte, homogénea, insoluble, lisa y no porosa. Esta superficie, que encuentra toda la asunción de la ecuación de Young, se considera como una superficie ideal (Tavana y col., 2004).

El ángulo de contacto solo depende de las propiedades físico-químicas de las tres fases de contacto y no varía por acción de la gravedad (Fernández Cañete, 2013; Marmur, 2006; Ruiz-Cabello, 2009). En la Figura 4 se resumen los fenómenos descritos por la ecuación de Young.

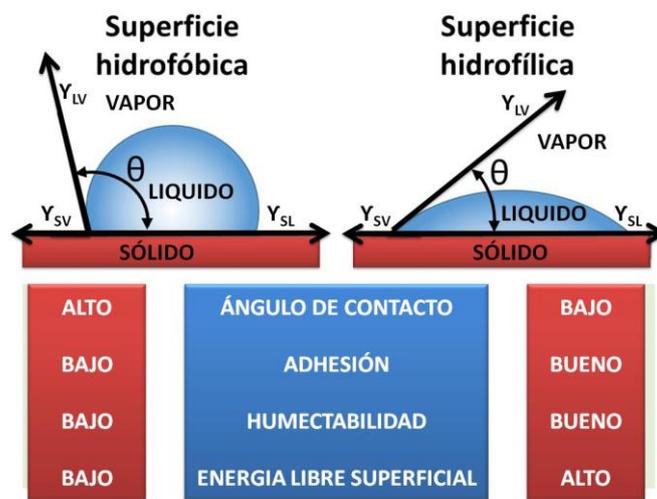


Figura 4. Esquema representativo del ángulo de contacto (θ) estático de una gota de agua sobre una superficie sólida plana, en contacto con una atmósfera gaseosa. Se indica el ángulo θ y las tensiones superficiales (γ). Adaptado de Fernández Cañete, (2013).

Los términos hidrofiliicidad e hidrofobicidad se usan para describir la afinidad relativa de las moléculas de agua a esparcirse sobre la superficie de un sustrato (Rana y Matsuura, 2010). Se acepta en general que el valor de $\theta < 90^\circ$ representa una superficie que tiene afinidad por el líquido y se denomina hidrofílica porque forma una fina película de hidratación sobre la superficie. El valor $\theta > 90^\circ$ representa la característica no humectante de la superficie mostrando menos afinidad hacia el líquido. Tales superficies se llaman hidrofóbicas. Las gotas de agua tienden a formar perlas sobre superficies sólidas hidrofóbicas debido a la ausencia de atracción con las moléculas de agua. Las superficies sobre las que el agua forma un ángulo de contacto superior a 140° se denominan superhidrofóbicas.

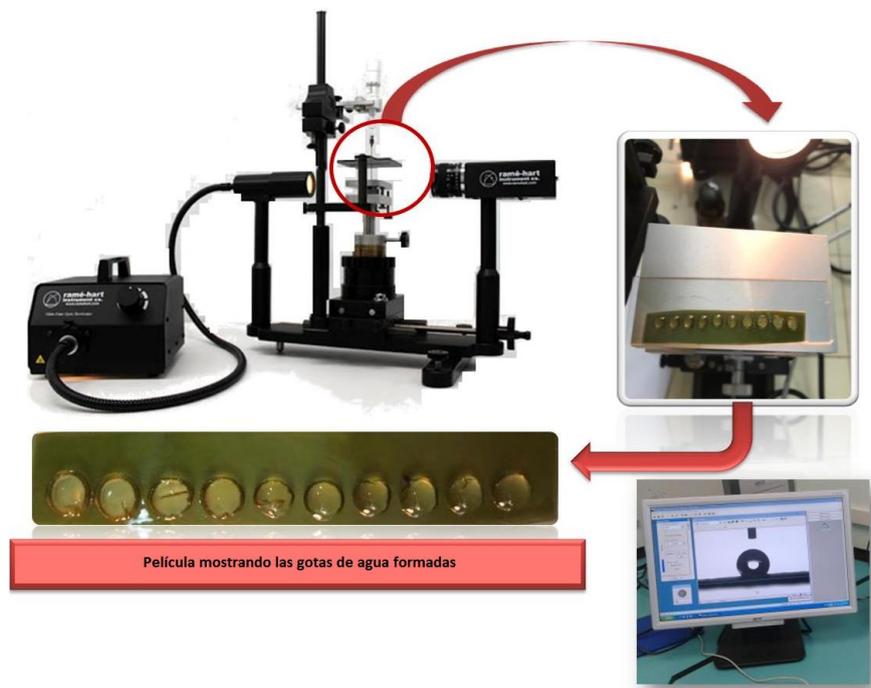


Figura 5. Instrumento de medición del ángulo de contacto donde se toma de imagen de la gota en el instante que cae sobre la superficie de la película.

Propiedades ópticas

Entre las características de la apariencia, el color es un fenómeno que involucra aspectos físicos y psicológicos, resultante de la interacción entre una fuente de luz, el objeto, los ojos y el cerebro. Por esta razón se diseñaron equipos que simulan la percepción del ojo humano, basándose en la respuesta al color que se obtiene cuando el observador compara luces monocromáticas del espectro visible con mezclas de los tres colores primarios. La Commission Internationale de l'Eclairage (CIE) ha definido espacios de color, incluyendo CIE XYZ, CIE L*C*h, y CIE L*a*b*, para comunicar y expresar el color objetivamente (Figura 6).

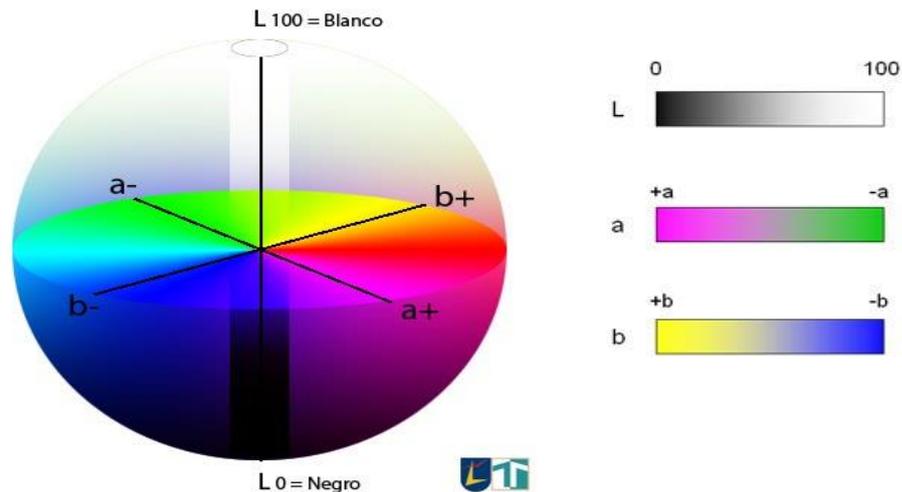


Figura 6. Esquema representativo de los atributos del color: luminosidad y parámetros de cromaticidad a^* y b^* . Adaptado de [Molina y col. \(2010\)](#).

Cuando se clasifican los colores, se los puede expresar en términos de matiz (color), luminosidad (brillo) y saturación (vividez). Al crear escalas para éstos atributos, podemos expresar en forma precisa el color.

El espacio de color $L^*a^*b^*$ correlaciona los valores numéricos de color con la percepción visual humana. Fue modelado en base a una teoría de colores opuestos que establece que dos colores no pueden ser rojo y verde o amarillo y azul al mismo tiempo.

Como se muestra a continuación, L^* indica la luminosidad y a^* y b^* son las coordenadas cromáticas.

L^* = luminosidad

a^* = coordenadas rojo/verde (+a indica rojo, -a indica verde)

b^* = coordenadas amarillo/azul (+b indica amarillo, -b indica azul)

Los instrumentos de medición de color, incluyendo espectrofotómetros y colorímetros, pueden cuantificar éstos atributos de color ([Figura 7](#)).



Figura 7. Imagen del equipo Minolta Serie CR 300 (Osaka, Japón) utilizado para medir las propiedades ópticas de color en las películas formuladas.

Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis)

La espectroscopía UV-Vis es una técnica en la que una solución absorbe radiación electromagnética comprendida entre 160 y 780 nm. Se basa en la medida de la transmitancia (T) o de la absorbancia (A) de disoluciones contenidas en cubetas transparentes, con una longitud del camino óptico (b) igual a 1 cm. El haz de luz incidente se encuentra atenuado por las reflexiones ocurridas en las interfases aire/pared y pared/disolución en la cubeta, así como por la dispersión ocasionada por moléculas grandes que puedan estar presentes en la solución de medida y, en algunos casos, por la absorción de las paredes del recipiente. Para compensar estos efectos se compara la potencia del haz transmitido por el analito a estudiar (disolución) con la potencia transmitida por el solvente (Figura 8). A partir de las siguientes ecuaciones se obtienen las absorbancias experimentales más próximas a los resultados verdaderos (Skoog y col., 2015).

Esta técnica tiene como base y fundamento la Ley de Lambert-Beer:

$$A = -\log T = \varepsilon bc$$

donde,

ϵ es la absorptividad molar (o coeficiente de extinción molar), b es el camino óptico recorrido y c es la concentración del analito. A partir de esta ecuación se observa una dependencia lineal de la absorbancia con la concentración.

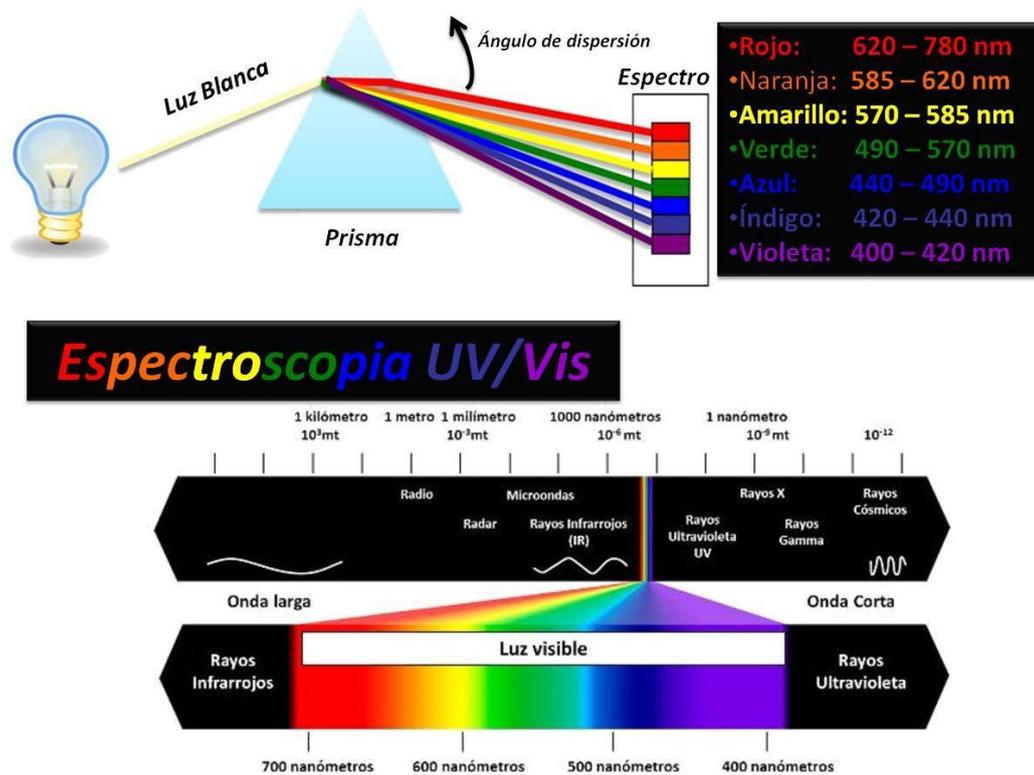


Figura 8. Esquema representativo de la espectroscopia UV-Vis, rango de alcance y rangos del espectro por tonalidades. Adaptado de Gaibor-Ontaneda y Chuqui-Gavilanes (2018); Valiente-Linares y col. (2020).

La Ley de Lambert-Beer describe el comportamiento de absorción para un medio que contiene concentraciones de analito relativamente bajas, siendo esta una de sus limitaciones. A concentraciones altas (>0.1 M) la distancia media entre las moléculas disminuye hasta el punto de que cada molécula distorsiona la distribución de cargas de las moléculas vecinas. Este efecto también se observa en medios que poseen una concentración muy alta de electrolitos, donde la proximidad de los iones a la especie absorbente es muy estrecha y altera su absorptividad molar por interacciones electrostáticas (Fernández 2019; Skoog y col., 2015).

Espectroscopía de absorción atómica

Todos los átomos o iones pueden absorber la luz a longitudes de onda específica y única. Cuando una muestra que contiene cobre (Cu) y níquel (Ni), por ejemplo, se expone a la luz a la longitud de onda característica de Cu, entonces sólo los átomos o iones de Cu absorberán esta luz. La cantidad de luz absorbida a esta longitud de onda es directamente proporcional a la concentración de los iones o átomos absorbentes.

Los electrones de un átomo existen en varios niveles de energía. Cuando el átomo se expone a su propia longitud de onda, puede absorber la energía (fotones) y los electrones se mueven a estados excitados. La energía radiante absorbida por los electrones está directamente relacionada con la transición que ocurre durante este proceso. Además, dado que la estructura electrónica de cada elemento es única, la radiación absorbida representa una propiedad única de cada elemento individual y se puede medir.

Un espectrómetro de absorción atómica utiliza estos principios básicos y los aplica en análisis cuantitativos prácticos (Resano y col., 2014). Un espectrómetro de absorción atómica típico consta de cuatro componentes principales: la fuente de luz, el sistema de atomización, el monocromador y el sistema de detección (Figura 9).

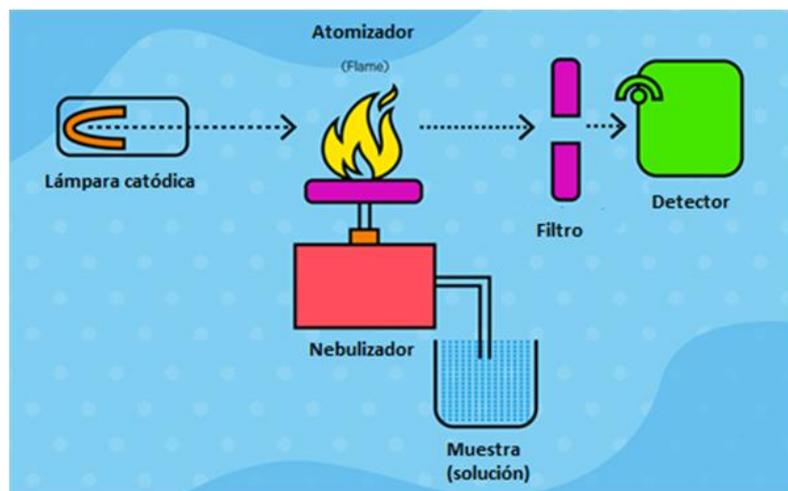


Figura 9. Esquemático del equipo empleado para la determinación de absorción atómica de llama. <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/atomic-absorption-spectroscopy-principles-and-applications-356829>

La muestra, ya sea líquida o sólida, se atomiza en una flama o en un horno de grafito. Los átomos libres se exponen a la luz, producida típicamente por una lámpara de cátodo

hueco, y experimentan transiciones electrónicas desde el estado fundamental a estados electrónicos excitados. La luz producida por la lámpara es emitida por átomos excitados del mismo elemento que se va a determinar, por lo tanto la energía de radiación corresponde directamente a la longitud de onda absorbida por la muestra atomizada. Se coloca un monocromador entre la muestra y el detector para reducir las interferencias de fondo. El detector mide la intensidad del haz de luz y lo convierte en datos de absorción.

Para determinar la concentración desconocida de un analito se utilizan varias soluciones de concentraciones conocidas para calibrar el instrumento. La curva muestra la radiación (absorbancia) frente a la concentración y una vez que se mide la muestra, el valor de la concentración se puede obtener a partir de la curva de calibración.

Resonancia del plasmón superficial (RPS)

En 1957 Ritchie introdujo el concepto de plasmón de superficie en el contexto de la pérdida de energía de los electrones en películas delgadas. La primera mención a las nanopartículas se puede atribuir a Michael Faraday, que fue probablemente el primero en sintetizar deliberadamente nanopartículas de oro mediante la reducción de NaAuCl_4 .

Como es bien sabido, cuando un haz de luz atraviesa una interfase entre dos medios con índices de refracción diferentes, ocurre una serie de fenómenos entre los que se encuentran la reflexión, la absorción y la refracción. Si el rayo incidente se dirige desde un medio con índice de refracción mayor hacia uno de menor índice ($n_1 > n_2$), el rayo refractado se desviará alejándose de la normal.

La Resonancia del Plasmón de Superficie (RPS) es un proceso físico que puede ocurrir cuando la luz polarizada plana incide sobre una fina película de metal bajo condiciones de reflexión interna total (GE Healthcare Life Science, 2012) (Figura 10).

Reflexión interna total

Cuando un haz de luz incide sobre un prisma medio circular, la luz se refleja hacia el plano de la interfase al pasar de un medio más denso a uno menos denso. Cambiando el ángulo de incidencia (θ) cambia la luz emergente hasta que alcanza un ángulo crítico. En este punto, toda la luz entrante se refleja dentro del prisma circular (Figura 10). Este fenómeno se denomina reflexión interna total (RIT). Para este último caso existe un ángulo de incidencia crítico, θ_c , en el cual se produce el fenómeno conocido como

reflexión total interna, donde el haz refractado forma un ángulo de 90° con la normal. Para ángulos de incidencia mayores a θ_c el rayo se refleja por completo en la frontera de ambos medios. El θ_c es pequeño cuando n_1 es considerablemente mayor a n_2 . Además, θ_c es el máximo ángulo al cual es posible observar el fenómeno de refracción ($\text{sen } \theta_c = 1$) y se denomina también θ_{RIT} .

En la condición de reflexión total interna se generan ondas evanescentes que se propagan a través del medio con índice de refracción n_2 . La amplitud de ese campo evanescente decae exponencialmente con la distancia a la interfase. Aunque no emerge luz del prisma en RIT, el campo eléctrico de los fotones se extiende alrededor de un cuarto de longitud de onda más allá de la superficie reflectante.

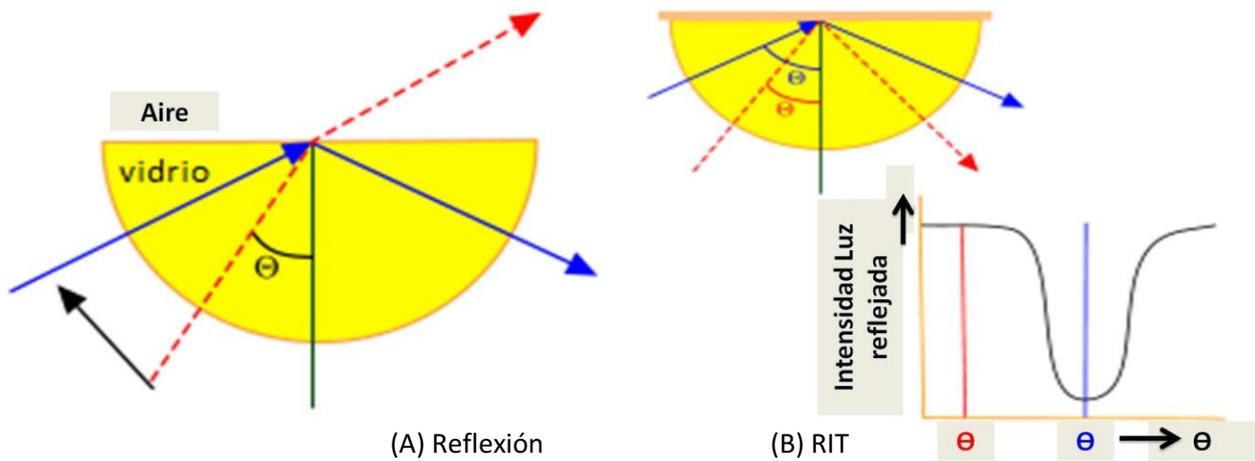


Figura 10. (A) Excitación de plasmones de superficie en una geometría de Kretschmann en el método de reflexión atenuada total (ATR). (B) Intensidad de la luz reflejada en función de la longitud de onda. El cambio del espectro de resonancia del plasmón de superficie SPR está en asociación con el cambio del índice de refracción del medio dieléctrico (Sprpages, 2006).

Plasmón de superficie

Cuando el prisma está recubierto con una fina película de un metal noble en el sitio de reflexión, los fotones de luz incidente son absorbidos y la energía es transferida a los electrones, que se convierten en plasmones de superficie (capa exterior y electrones de la banda de conducción). En una situación RIT la energía cuántica de los fotones es la correcta y se convierten en plasmones dejando una *brecha* en la intensidad de luz reflejada. Los fotones de luz polarizada pueden interactuar con los electrones libres de la

capa metálica, induciendo una oscilación ondulatoria de los electrones libres y reduciendo así la intensidad luminosa.

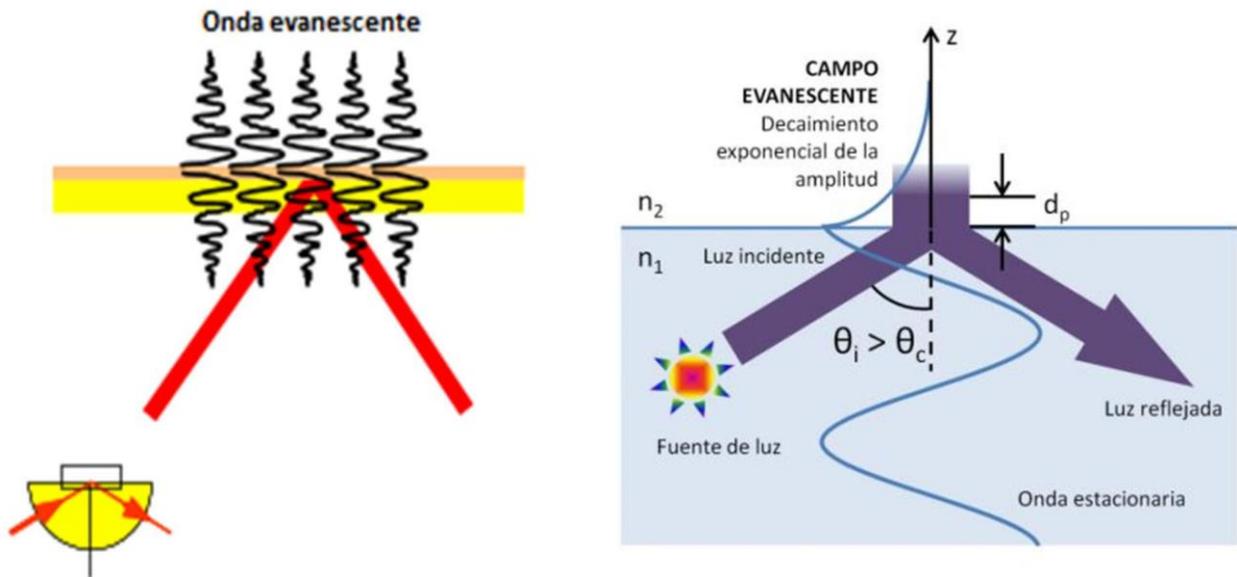


Figura 11. Representación de la formación de la onda evanescente bajo la condición de reflexión total interna. Imagen adaptada de [Laucirica \(2018\)](#); [Sprpages \(2006\)](#).

En RIT, los fotones reflejados crean un campo eléctrico en el sitio opuesto a la interfase. Los plasmones crean un campo comparable que se extiende en el medio a ambos lados de la película ([Figura 11](#)). Este campo se llama onda evanescente porque la amplitud de la onda disminuye exponencialmente con la distancia creciente desde la superficie de la interfase, decayendo a una distancia de aproximadamente una longitud de onda de luz ([Nagata y Handa, 2000](#)). La profundidad de la onda evanescente que es útil para las mediciones es del orden de 300 nm de la superficie del sensor ([Anton van der Merwe, 2003](#)). La longitud de onda de la onda evanescente es la misma que la de la luz incidente y su energía es disipada por calor ([Sprpages, 2006](#)).

Los metales nobles como Au, Ag y Cu son conocidos por sus propiedades dieléctricas. Por ejemplo, reflejan la luz muy eficientemente en el espectro visible. Esta propiedad y otras tienen su origen en la presencia de electrones libres de conducción. En un metal, estos electrones se mueven en un cristal de iones positivos, que dan la neutralidad de carga ([Pérez-Mirabet, 2013](#)).

La presencia de electrones libres en la banda de conducción de la superficie de las nanopartículas metálicas que reciben un haz de luz incidente induce una excitación

colectiva de estos electrones libres, como consecuencia de la fuerte interacción con la luz incidente; se produce una oscilación coherente deslocalizada de los electrones confinados en la superficie de las nanopartículas metálicas en la interfase metal-dieléctrico o metal-semiconductor.

Resonancia plasmónica (polarización) de una nanopartícula metálica

En las nanopartículas de los metales nobles como el oro y la plata, la resonancia es máxima y su frecuencia se produce en el campo visible del espectro electromagnético.

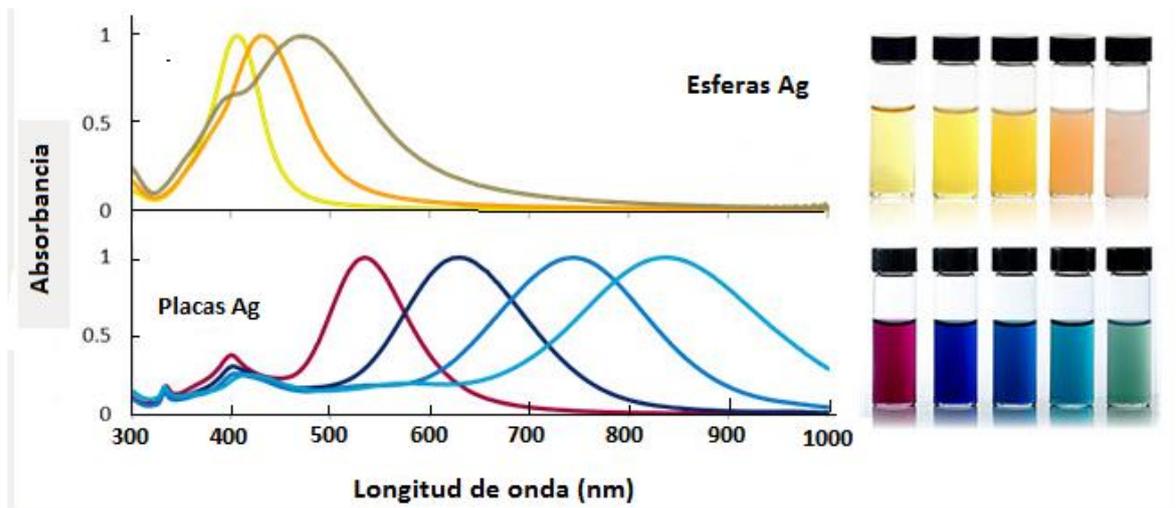
Esta resonancia se origina cuando el tamaño de las nano partículas es mucho menor que la longitud de onda de la radiación incidente, $d \ll \lambda$. La frecuencia de resonancia y la anchura de banda de absorción del plasmón dependen del tamaño y de la forma de las nanopartículas.

Esta dependencia permite seleccionar frecuencias de luz reflejada a las que van asociadas distintas energías y colores, desde la luz ultravioleta hasta las proximidades del campo infrarrojo. La posibilidad de modificar las frecuencias de resonancia es el origen de las importantes propiedades óptico-electrónicas (optoeléctricas) de las nanopartículas metálicas.

Para las nanopartículas de $d < 20$ nm, el ancho de banda del plasmón aumenta progresivamente a medida que disminuye su tamaño; cuando el diámetro es $d > 20$ nm, el ancho de banda se corre a longitudes de onda más largas, se producen multipolos y la oscilación es más compleja. En una dispersión coloidal de nanopartículas de oro de tamaño $d < 30$ nm, la RPS absorbe la luz de la zona visible del espectro electromagnético de color azul-verde ($\lambda = 450$ nm) y produce una luz reflejada de color rojo ($\lambda \approx 700$ nm), tomando la disolución coloidal un color rojo intenso.

En muchos tipos de nanopartículas, los picos de los espectros pueden desplazarse cambiando el tamaño, forma, recubrimiento y el estado de agregación de las nanopartículas. El desplazamiento al azul es una respuesta electromagnética hacia las longitudes de onda más cortas, de mayor frecuencia y energía. El corrimiento hacia el rojo se refiere a los picos de los espectros que se deslizan hacia longitudes de onda más largas. A medida que las nanopartículas de oro aumentan su tamaño, la longitud de onda del RPS, relacionada con la luz absorbida, se desplaza hacia la zona visible del espectro electromagnético de longitudes de onda mayores (de menor energía), que corresponden

al color rojo; se absorbe la luz roja y se refleja la luz azul y la solución coloidal presentará una coloración azul (azul pálido o color púrpura) (Figura 12).



partículas de oro de d

Figura 12. Espectros de extinción óptica y apariencia de soluciones de nanoesferas de plata entre 10 y 100 nm de diámetro (arriba) y nanoplacas de plata entre 50 y 150 nm de diámetro (abajo). Adaptado de Oldenburg (2014). <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/technology-spotlights/silver-nanomaterials.html>

Potencial zeta

El potencial zeta se define como la diferencia en el potencial entre la partícula y su ambiente iónico circundante medio, medido en el plano de cizalla (Hodne, 2007). El fundamento de la técnica se basa en el modelo de la doble capa eléctrica, esquematizado en la Figura 13. Debido a consideraciones de radio iónico, los aniones fuertemente adsorbidos no compensan la carga superficial, y por lo tanto, se forma una segunda capa de contraiones más libres, conocida como la capa difusa. Esta capa difusa está formada por iones libres que son móviles bajo la influencia de la atracción eléctrica y el movimiento térmico. Las dos capas combinadas se conocen como la capa eléctrica doble (Mantilla y col., 2008). A una cierta distancia, la carga superficial es completamente equilibrada por los contraiones y más allá de este punto, en el seno de la suspensión existe un equilibrio de cargas positivas y negativas (Talero y col., 2013; Taqvi y col., 2014). Las partículas, con una alta carga superficial forman una doble capa que impide que las partículas se acerquen entre sí debido a la repulsión electrostática entre cargas idénticas y esto ayuda a estabilizar las suspensiones (Talero y col., 2013). Al aplicar un campo

eléctrico a la suspensión compuesta por partículas cargadas, estas se moverán con una velocidad V_0 debido a la fuerza eléctrica ejercida por el campo, $F_{\text{eléctrica}}=q.E$, que se igualará, en condiciones estacionarias, a la fuerza viscosa, $F_{\text{viscosa}}=f.V_0$. La dirección y velocidad del movimiento es una función de la carga de las partículas, el medio de suspensión y la fuerza del campo eléctrico.

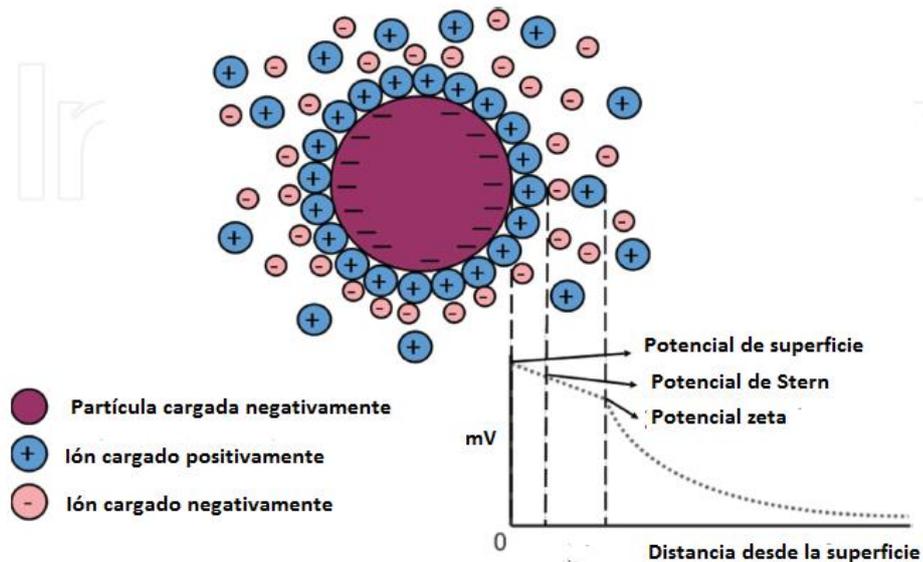


Figura 13. Esquema ejemplificando la distribución de carga superficial de una partícula. Adaptado de Taqvi y col. (2019).

Para mantener la electroneutralidad del sistema, se desarrolla un exceso de carga opuesta en la solución cercana a la superficie. El exceso de carga en la solución, el cual es igual en magnitud pero opuesto en signo a la carga superficial, se despliega en una región difusa extendida hacia la solución. La carga superficial y la carga en la región difusa constituyen la doble capa eléctrica (Figura 13). Este modelo establece que la interfase sólido/líquido está compuesta por dos capas, una de ellas presenta un decaimiento lineal del potencial eléctrico, el cual permanece constante aún cuando las partículas están en movimiento y otra llamada, capa difusa, en la cual el decaimiento es exponencial. El potencial calculado en el plano de referencia ubicado entre la capa fija y la capa difusa se llama potencial electrocinético o potencial zeta (ζ), medido en el plano de cizalla o deslizamiento (situado entre la superficie cargada y la solución electrolítica) el cual es

muy cercano al plano de Stern. La velocidad de las partículas, proporcional al potencial eléctrico de la partícula en el plano de cizallamiento, es el potencial zeta.

El potencial zeta se determina a partir de la movilidad electroforética utilizando un modelo matemático, el más común de los cuales es el modelo de Helmholtz-Smoluchowski (Hunter, 2013):

$$\zeta = \frac{u\eta}{\epsilon_0 \epsilon E}$$

donde,

ζ es el potencial zeta, u es la velocidad de la partícula, η es la viscosidad del líquido, ϵ_0 es la permitividad en el vacío, ϵ es la permitividad en el medio y E es la fuerza del campo eléctrico.

El arreglo instrumental del equipo utilizado se muestra en la [Figura 14](#).

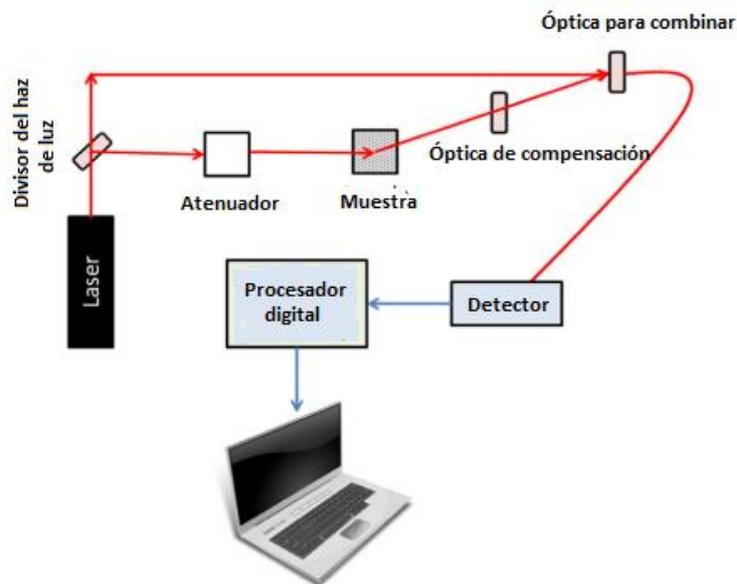


Figura 14. Diagrama esquemático del equipo empleado para la determinación de potencial zeta. Adaptado de [Bhattacharjee \(2016\)](#).

Dispersión dinámica de luz (DLS)

La distribución del tamaño de partícula es una propiedad fundamental para caracterizar sistemas de partículas en suspensión ([Diaz-Uribe y col., 2013](#))

La técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS, Dynamic Light Scattering) también conocida como espectroscopía de correlación fotónica (PLS, Photon Correlation

Spectroscopy) o dispersión cuasi-elástica de la luz (QELS, Quasi Elastic Light Scattering) permite medir el tamaño de partícula en el rango aproximado de entre 1 nm y 5 μm , mediante una técnica no invasiva. A diferencia de la dispersión de luz estática, para determinar el tamaño de las partículas, la dispersión de luz dinámica no tiene en cuenta la dependencia con el ángulo, sino la variación de la intensidad de dispersión en el tiempo. Los haces de luz dispersados por distintas partículas interfieren entre sí y se obtiene una intensidad de dispersión determinada (Benkaddour y col., 2013; Van der Heide, 2011).

Al hacer incidir un haz de luz láser polarizada sobre un sistema de partículas en suspensión se formará un patrón de *scattering* cuyas características dependerán del tamaño de partícula y de la relación entre este último parámetro y la longitud de onda incidente (λ). En la Figura 15 se pueden distinguir tres tipos de patrones:

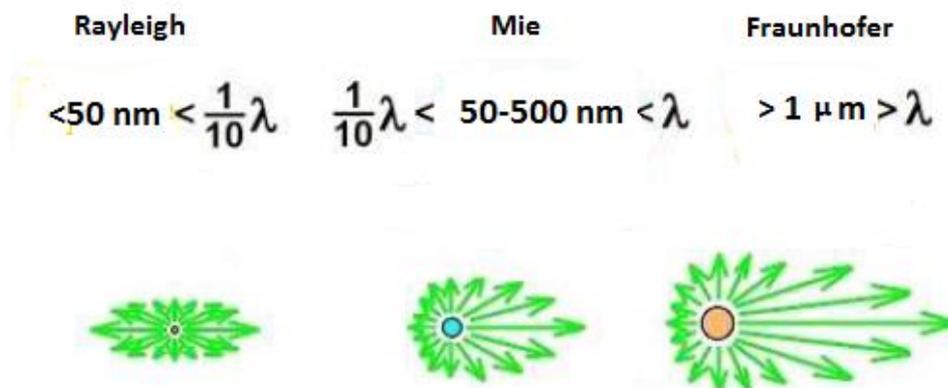


Figura 15. Esquema mostrando las diferencias entre dispersión Rayleigh, Mie, y Fraunhofer. Adaptado de Bhattacharjee (2016).

- Rayleigh: describe un patrón de dispersión similar en todas las direcciones, es decir isotrópico, y aplica para partículas menores a 50 nm.
- Mie: describe un patrón anisotrópico, válido para partículas de tamaño intermedio, entre 50 y 500 nm.
- Fraunhofer: se caracteriza por una fuerte dispersión hacia adelante y débil hacia atrás. Se observa para partículas mayores a 1 μm .

Las partículas suspendidas en un líquido poseen un comportamiento denominado movimiento browniano caracterizado por un mínimo de energía cinética que les permite desplazarse, producto de colisiones aleatorias con otras partículas del solvente que las

rodea. Las partículas de mayor tamaño tenderán a moverse más lentamente que las de menor tamaño (Figura 16).

El movimiento browniano de las partículas en suspensión origina fluctuaciones temporales en la intensidad de la luz dispersada que son inversamente proporcionales al coeficiente de difusión traslacional de las partículas en ese medio. DLS mide las fluctuaciones temporales de la luz dispersada, a partir de lo que se determina el coeficiente de difusión traslacional (D) y este se relaciona con el tamaño de la partícula a través de la ecuación de Stokes-Einstein:

$$d_h = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

donde,

d_h es el diámetro hidrodinámico, D el coeficiente de difusión traslacional, k la constante de Boltzman (1.38×10^{-23} J/K), T la temperatura absoluta y η la viscosidad del medio dispersante.

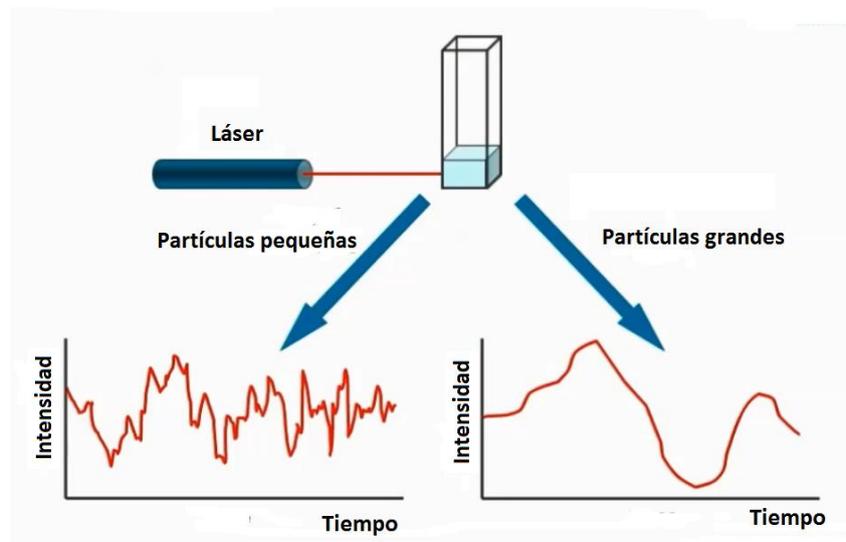


Figura 16. Esquema mostrando la fluctuación de la intensidad de la luz dispersada a lo largo del tiempo para partículas grandes y pequeñas. Adaptado de [Malvern Panalytical \(2020\)](#).

El arreglo instrumental del equipo utilizado se muestra en la [Figura 17](#).

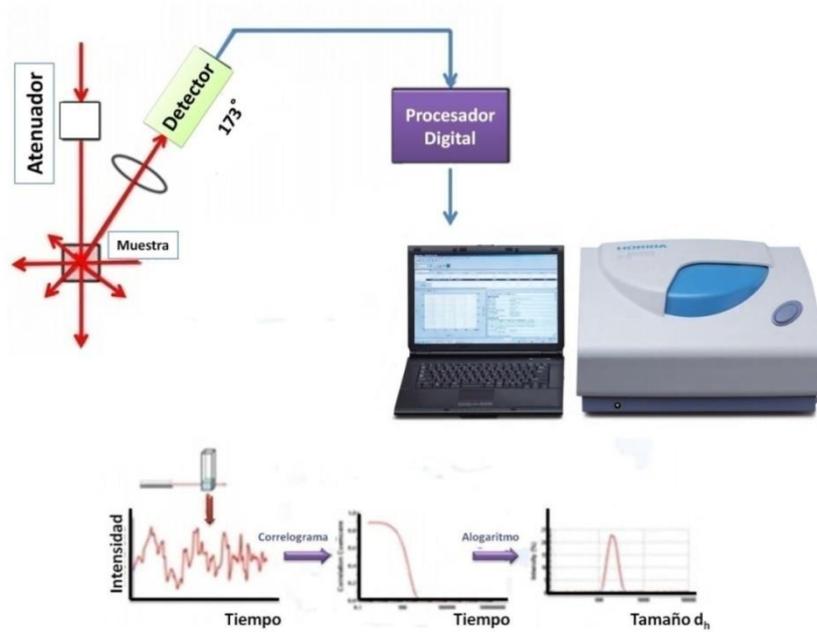
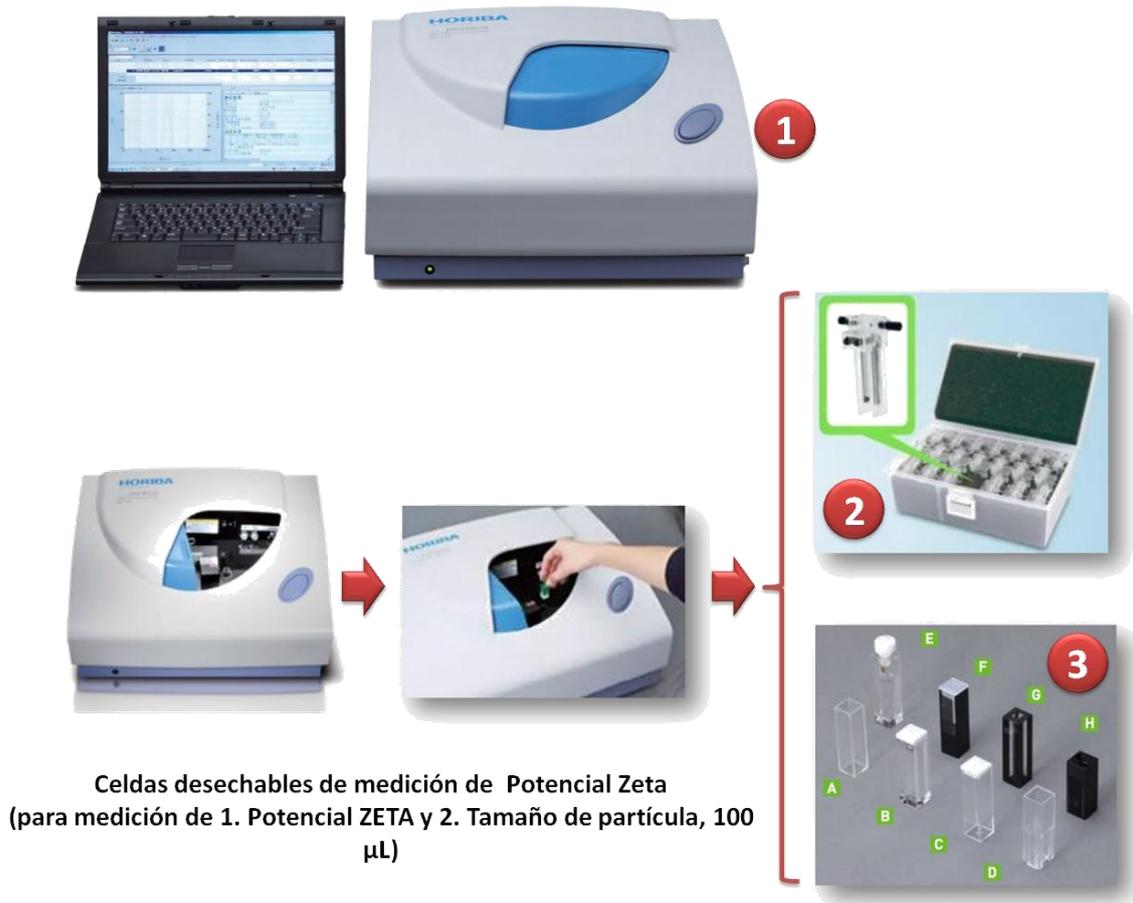


Figura 17. Diagrama esquemático del equipo empleado para la determinación de tamaño de partículas por medio de la técnica DLS. Dependencia de la función de correlación con el tamaño de partícula. Adaptado de [Bhattacharjee \(2016\)](#).





Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS)

La espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS), basada en el efecto fotoeléctrico, es una técnica analítica de superficie para el análisis de la composición, tanto cualitativa como cuantitativa, que además permite determinar el estado químico de los elementos en la superficie de un material (Figura 18). Es adecuada para el estudio de superficies e interfaces. Dado que cada elemento individual (excepto el hidrógeno) tiene un conjunto único de energías de unión, XPS puede ser utilizado para identificar y medir la concentración de los elementos cerca de la superficie.

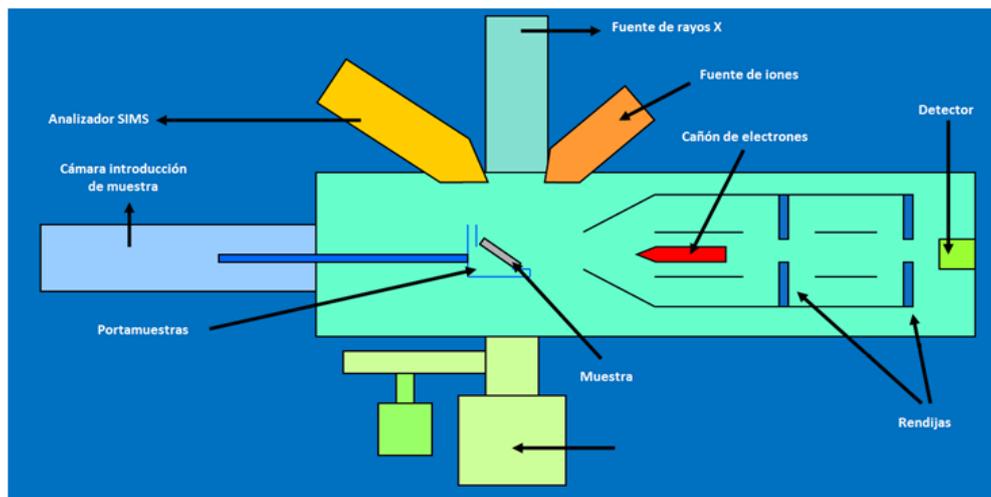


Figura 18. Diagrama esquemático del proceso de espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS). <https://fdocuments.in/document/xps-x-ray-photoelectron-spectroscopy.html>

Esta técnica consiste en irradiar un material determinado con fotones de energía $h\nu$, los que pueden excitar a un electrón de las capas internas produciendo la emisión un fotoelectrón con una energía cinética KE proporcional a la energía del fotón incidente, a la energía de enlace BE (Binding Energy, BE) y la función trabajo (ϕ) del elemento (Figura

19). La relación entre la energía de los fotones irradiados y la energía cinética de los fotoelectrones está determinada por la ecuación de:

$$KE = h\nu - BE - \phi$$

donde,

KE es la energía cinética del electrón medida por el instrumento, $h\nu$ es la energía de la fuente de rayos X, BE energía de enlace y ϕ es la función trabajo. Esta ecuación permite interpretar el proceso de fotoemisión como un proceso elástico.

La determinación se realiza en condiciones de alto vacío, normalmente mayor a 10^{-7} Pa (Bluhm, 2011). XPS mide solo los electrones que han escapado de la superficie de la muestra al vacío del instrumento y alcanzan el detector. Para que los electrones escapen de la muestra al vacío, un fotoelectrón debe viajar a través de la muestra. Los fotoelectrones emitidos pertenecen a niveles electrónicos cercanos al núcleo debido a la exposición de la muestra a radiación de rayos X (Herrán, 2018). Dependiendo del nivel electrónico involucrado en la emisión variará la energía de enlace. De esta manera cuanto más interno sea el electrón emitido, mayor será la energía de enlace, por lo que la energía del fotón incidente deberá ser más elevada. Los rayos X de Mg K α (1253.6 eV), Al K α (1486.6 eV), o monocromáticos Al K α (1486.7 eV) se utilizan habitualmente como fuente energética. Estos fotones tienen una potencia de penetración limitada en un material sólido de aproximadamente 1 a 10 micrómetros por lo que permite la caracterización química de superficies de materiales con una profundidad máxima de análisis de hasta 10 nm (Benkaddour y col., 2013). El nivel de Fermi equivale a una energía de enlace cero (por definición) y la profundidad debajo del nivel de Fermi indica la energía relativa del ión remanente después de la emisión del electrón, o la energía de enlace del electrón. Los niveles p, d y f se dividen tras la ionización, dando lugar a vacantes en el p $_{1/2}$, p $_{3/2}$, d $_{3/2}$, d $_{5/2}$, f $_{5/2}$ y f $_{7/2}$. Una vez que el fotoelectrón es emitido, el hueco generado se ocupa por la transición de un electrón de un nivel más externo, donde la diferencia de energía entre los estados de dicha transición es o bien emitida como un fotón o bien utilizada para emitir un segundo electrón denominado electrón Auger o secundario.

Por otra parte, los espectros de XPS están formados por una serie de picos, sobre un *background* (o fondo), producido por los choques inelásticos de los electrones que pierden la mayor parte de su energía antes de abandonar la muestra. Para cada elemento

químico se observa siempre un conjunto de picos a unas energías características que permiten identificarlo claramente, utilizando habitualmente el pico fotoelectrónico más intenso o pico principal, para realizar el análisis cuantitativo y de estado químico. Además de este tipo de picos, pueden aparecer otros debidos a diferentes procesos haciendo que el espectro XPS y, por tanto su análisis, sean en ocasiones complejos (Martínez de Yuso-García, 2015).

La capacidad de la técnica para distinguir entre estados químicos de un mismo elemento y su sensibilidad superficial (primeras capas atómicas de un sólido) han hecho que sea una técnica muy empleada en el área de química de superficies. A pesar de ser reconocida como una técnica no destructiva, en el caso de materia blanda puede observarse daño por radiación si el tiempo de análisis es prolongado.

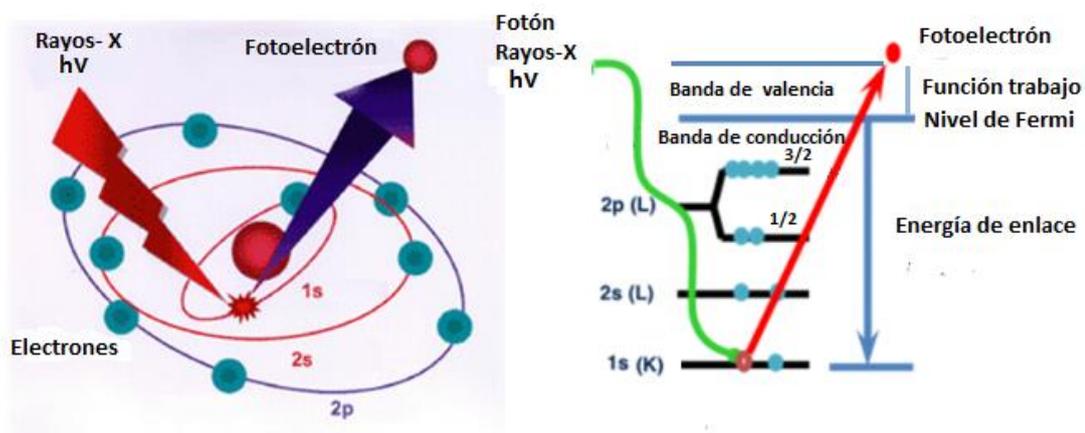


Figura 19. Esquema del fenómeno de emisión. Adaptado de Aparicio-Rebollo (2019).

Caracterización morfológica por TEM y SEM

La microscopía electrónica es una técnica basada en el uso de electrones para formar imágenes de objetos a escala atómica. Existen dos clases genéricas de microscopía electrónica, SEM y TEM, dependiendo del tipo de microscopio utilizado. Todos los microscopios SEM y TEM generan un haz de electrones altamente enfocado, que impactan en la muestra dentro de una cámara de vacío. Sin embargo los microscopios TEM están diseñados principalmente para examinar la estructura interna de las muestras (como microscopios de luz de transmisión mientras los SEM están diseñados

principalmente para examinar superficies de materiales (como microscopios de luz de reflexión). Los microscopios electrónicos ofrecen un rango de aumento muy amplio, normalmente de 10 a 500000 veces para SEM y 2000 a 1 millón de veces para TEM.

TEM es una técnica para el análisis de microestructura interna de muestras, evaluación de nanoestructuras tales como partículas, fibras y películas delgadas e imágenes de átomos (Kohl y Reimer, 2008; Spence, 2017; Williams y Carter, 2009). El cañón de electrones en un TEM acelera los electrones para darles suficiente energía entre 80 y 300 kV para atravesar hasta a 1 μ m de material (Kohl y Reimer, 2008).

Las lentes condensadoras ubicadas antes que el espécimen enfocan los electrones en un haz convergente de diámetro controlado. El objetivo conduce los electrones transmitidos para formar el patrón de difracción y la primera imagen. Las lentes proyectoras magnifican el patrón de imagen/difracción hacia el sistema de detección. El microscopio electrónico de transmisión utiliza una señal para formar la imagen proveniente de los electrones transmitidos a través de la muestra. Los especímenes deben tener regiones de material transparente a través de que los electrones pueden ser transmitidos. La caracterización no destructiva por TEM solo es posible para especímenes como nanopartículas, nanofibras y materiales ligeros como moléculas y nanocarbonos, que son transparentes a electrones (Figura 20).

La información que se obtiene es una imagen con distintas intensidades de gris que se corresponden al grado de dispersión de los electrones incidentes. Las energías de los electrones en TEM son mucho más altas que el SEM, por lo general entre 80 y 300 keV, para permitirles penetrar a través de material.

En el caso del SEM, el haz de electrones se concentra en un punto y el espécimen se escanea secuencialmente. En cada lugar, las señales emitidas por el espécimen son recogidas por detectores. La intensidad de la señal es utilizada para modular el pixel en la imagen correspondiente. Las señales recogidas en serie forman una imagen cuyas dimensiones/distribución de píxeles depende del patrón de exploración elegido.

El cañón de electrones en un SEM normalmente acelera los electrones en el rango 1-30 kV. 15-30 keV electrones se utilizan típicamente para las imágenes de rutina. Un modo de funcionamiento SEM de baja tensión de 1-5 keV (LVSEM) puede ser utilizado para reducir la penetración de electrones y lograr imágenes de mayor resolución.

La fijación del espécimen es flexible con una amplia gama de portamuestras disponibles, frecuentemente en forma de discos metálicos planos llamados tacos (Echlin, 2011). Un criterio importante para el montaje de las muestras es la fijación segura, buen contacto electrónico entre el espécimen y el soporte. Las muestras no conductoras generalmente requieren cobertura con una capa ultrafina, que sirve para eliminar la carga electro-estática acumulada en la superficie. Los materiales de revestimiento comúnmente usados son carbono, oro y platino.

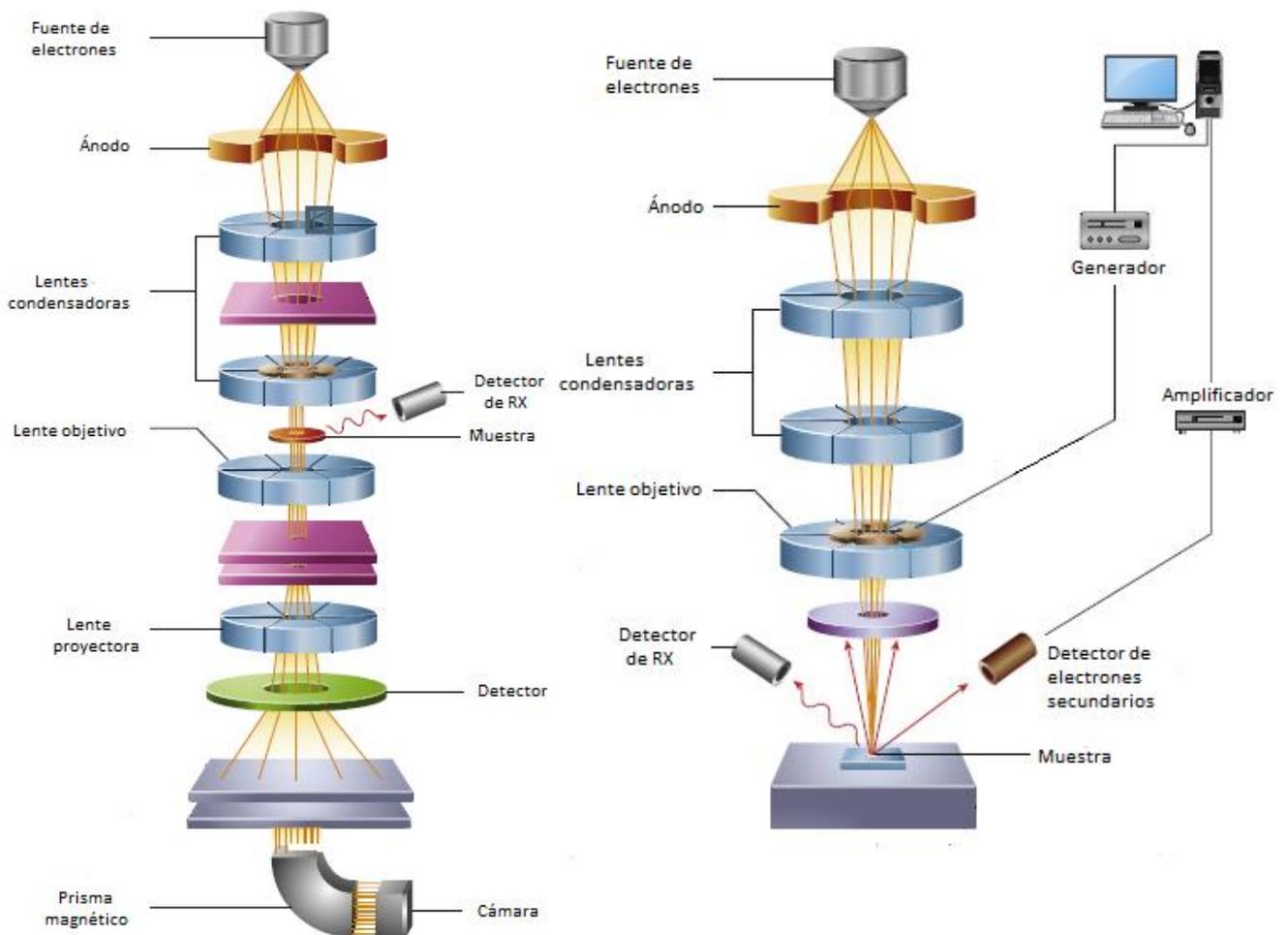


Figura 20. Esquema representativo de un microscopio de transmisión electrónica (TEM) y de un microscopio de barrido electrónico (SEM). Adaptado de Anderson y col. (2016); Inkson (2016).

Las muestras con una alta presión de vapor como materiales biológicos y líquidos sufrirán pérdida de agua y otros volátiles en el vacío. Para superar este problema, se han desarrollado microscopios electrónicos ambientales para operar bajo vacío reducido (hasta 4 kPa) para evitar los cambios del espécimen (Stokes, 2008).

Espectroscopía de tiempo de vida media de aniquilación de positrones (PALS)

Este método se utiliza para investigar defectos de volumen en materiales. Positrones creados a partir de una fuente radiactiva (^{22}Na) inciden en un material. El positrón es una partícula elemental, la antipartícula del electrón. Tiene la misma masa y giro que el electrón, pero tiene carga opuesta; lleva una unidad de carga elemental positiva. Los positrones se desaceleran (termalizan), pierden energía cinética a través de eventos de dispersión. Los defectos, tales como vacantes, vacíos y dislocaciones, actúan como trampas para los positrones desacelerados (termalizados) debido a la ausencia de núcleos cargados positivamente en estos sitios (Figura 21). Como resultado de la reducida densidad de electrones en estos sitios, la vida de aniquilación de los positrones se incrementa para estos positrones atrapados, y puede estar relacionada con el tamaño/tipo de defecto.

Cuando un positrón interactúa lo suficientemente fuerte con su antipartícula, el electrón, da como resultado una aniquilación mutua. La energía másica de las dos partículas es completamente convertido en dos, o con una probabilidad menor (1/370) en tres fotones gamma (Charlton y Humberston, 2011; Eldrup, 1995; Krause-Rehberg y Leipner, 1999).

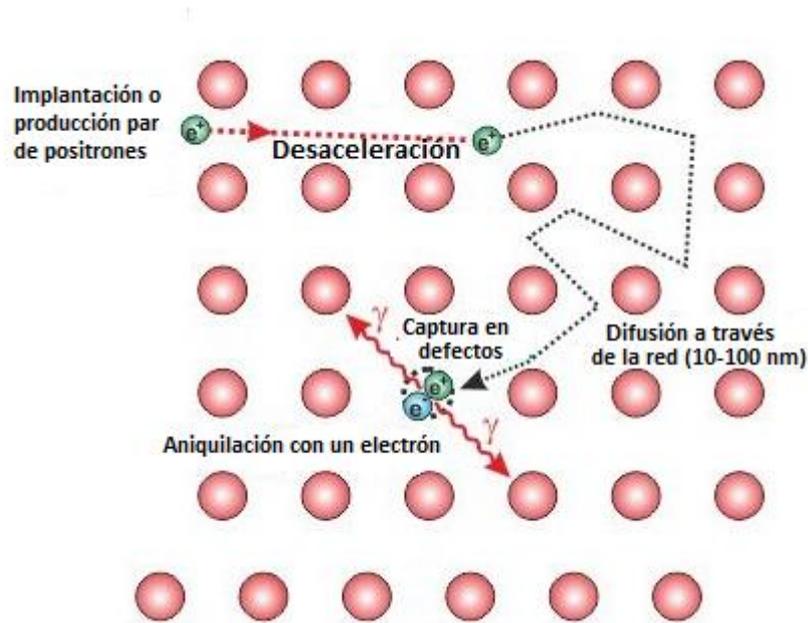


Figura 21. Diagrama esquemático del proceso de aniquilación de positrones en un material. Adaptado de [Fusion Technology Group \(2020\)](#).

La determinación se realiza normalmente con una fuente de positrones, colocada entre dos muestras idénticas, que emite positrones isotrópicamente en la mayor parte del material. Como se describió anteriormente, los positrones rápidamente se desaceleran, luego se aniquilan con un electrón del material. La técnica PALS es dependiente del tiempo, mide los intervalos entre la creación del positrón, signada en el caso de ^{22}Na por la emisión de un 1275 Mev de rayos gamma y su aniquilación, señalada por 511 keV. El método PALS se basa en la suposición de que el intervalo de tiempo entre la creación y aniquilación de positrones refleja la naturaleza del entorno en la que la aniquilación ocurrió.

El estudio de la aniquilación del positrón en los polímeros ha tenido gran atención en los últimos años. Este hecho está condicionado por dos circunstancias principalmente: los polímeros son un buen sistema modelo para la investigación del positronio en sólidos y el análisis de la microestructura de los materiales poliméricos. Se ha demostrado que las características de la aniquilación del o-P son sensibles al volumen libre presente en los polímeros. El volumen libre puede entenderse como el volumen dentro de una estructura polimérica que no está ocupado por moléculas y que tiene una influencia importante en las propiedades físicas de los polímeros. Los polímeros son en su mayoría amorfos, de tal forma que los positrones presentan la tendencia de formar Ps en ese tipo de materiales.

Los defectos aparecen en cualquier material y llevan a cambios significativos en las propiedades eléctricas, ópticas y mecánicas (Yang y col., 2015).

El Ps se puede formar en dos estados de espín: el estado triplete, orto-positronio (o-Ps) con una probabilidad de formación de 3/4 y el estado singlete, para-positronio (p-Ps) con una probabilidad de formación de 1/4 (Macchi, 2013).

Los resultados del análisis espectral de la vida útil se dan en términos de tres componentes de la vida útil τ_1 , τ_2 y τ_3 con intensidades relativas I_1 , I_2 y I_3 . τ_1 es el componente de vida corta y se atribuye a la autoaniquilación de p-Ps. τ_2 es el componente de vida intermedia y mide la vida útil de los positrones atrapados en defectos en la región cristalina y/o los que se aniquilan en las interfases amorfo-cristalinas sin formar Ps. τ_3 es el componente de vida más larga que se atribuye a la aniquilación de o-Ps en agujeros de volumen libre en regiones amorfas del polímero (El-Gamal y col., 2018; El-Gamal y Elsayed, 2020).

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La calorimetría es una técnica primaria para medir las propiedades térmicas de los materiales y establecer una conexión entre temperatura y propiedades físicas específicas de las sustancias. Asimismo, permite determinar la entalpía asociada al proceso de interés (Gill y col., 2010; Schick, 2009).

Los calorímetros se usan frecuentemente en química, bioquímica, biología celular, biotecnología, farmacología, y recientemente, en nanoscience para medir las propiedades termodinámicas de las biomoléculas y de los nanomateriales (Gill y col., 2010; Varghes, y col., 2008; Weber y Salemm, 2003).

Entre los diversos tipos de calorímetros, la calorimetría diferencial de barrido (DSC) es la más usada. La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una técnica experimental dinámica que permite determinar la cantidad de calor que absorbe o libera una sustancia, cuando es mantenida a temperatura constante, durante un tiempo determinado, o cuando es calentada o enfriada a velocidad constante, en un determinado intervalo de temperaturas (Haynie, 2008). En otras palabras, es un instrumento de análisis térmico que determina la temperatura y el flujo de calor asociado con las transiciones del material en función del tiempo y la temperatura.

En un DSC, la muestra y la referencia se mantienen en la misma temperatura, y la diferencia de potencia térmica necesaria para mantenerlos a la misma temperatura es medida y registrada en función de la temperatura o el tiempo (Figura 22).

El calor total involucrado en el proceso, asociado al área bajo la curva, es proporcional al cambio de entalpía asociado (ΔH). Los cambios entálpicos son registrados como eventos endotérmicos o exotérmicos, según el proceso que sufra la muestra.

La temperatura de transición vítrea, el proceso exotérmico de cristalización y el endotérmico de fusión son los principales parámetros que pueden evaluarse en el material utilizando un DSC convencional (Shah y col., 2006). La temperatura de transición vítrea es el resultado de la presencia de la fase amorfa y el pico de cristalización resulta de la recristalización del contenido amorfo.

Posteriormente, el estado cristalino obtenido y el contenido cristalino preexistente se combinan para formar el pico de fusión (Shah y col., 2006).

La principal ventaja de la calorimetría diferencial de barrido modulada (MDSC) es su capacidad para medir por separado uno o más componentes de la señal de flujo calórico total. Posee una capacidad mejorada, en comparación con DSC, para medir transformaciones o eventos que se solapan en la temperatura y/o en tiempo y una resolución mejorada al permitir el uso de una tasa de calefacción superpuesta relativamente lenta. Además de la técnica, se introdujeron una teoría y un método de interpretación simples que se centraron en las diferencias entre las señales de CA y la no reversible (señal de corriente continua, CC) (Reading y Hourston, 2006). Brevemente, la calorimetría diferencial de barrido modulada (MDSC) es una técnica avanzada, en la que la señal de flujo de calor total se obtiene como la temperatura de la muestra, y la referencia se calienta según una tasa de calentamiento básica, sobre la cual se superpone una oscilación de temperatura. La señal de flujo total puede entonces ser deconvolucionada para obtener una o más señales representativas de los componentes del flujo de calor reversible (AC) y no reversible (CC).



Figura 22. Imágenes del calorímetro diferencial de barrido (DSC) utilizado acoplado a un sistema de enfriamiento de N₂ líquido. Se muestra el horno del equipo donde se ubica la cápsula sellada con la muestra y el patrón de referencia. Adaptado de [TA Instruments \(2016\)](#).

Espectroscopia de infrarrojo (IR) con transformada de Fourier

La espectroscopia de infrarrojo (IR) con transformada de Fourier es una de las técnicas analíticas más importantes y utilizadas debido a que puede emplearse para establecer la identidad de un compuesto ([Kumirska y col., 2010](#)). Cada grupo funcional tiene un modo de absorción característico que se presenta en el espectro como un pico o banda y aporta información acerca del tipo de uniones que se establecen cuando se mezclan con otras sustancias. El método se basa en la excitación de los modos de vibración de las moléculas por la absorción de la radiación infrarroja. Durante la excitación es necesaria una variación del momento dipolar de la molécula para que se produzca una absorción en el IR que puede asociarse a vibraciones de tensión (simétricas o asimétricas) o de flexión ([Figura 23](#)).

Una pequeña muestra se coloca en una celda, donde es sometida a una fuente de luz infrarroja, la cual hace un barrido en un rango de número de onda comprendido entre 4000 cm⁻¹ y 400 cm⁻¹. La intensidad de la luz transmitida a través de la muestra es medida a cada número de onda, lo que permite que la cantidad de luz absorbida por la muestra sea calculada por la diferencia entre la intensidad de la luz antes y después de pasar por la celda de muestra. Esto se conoce como el espectro infrarrojo de la muestra.

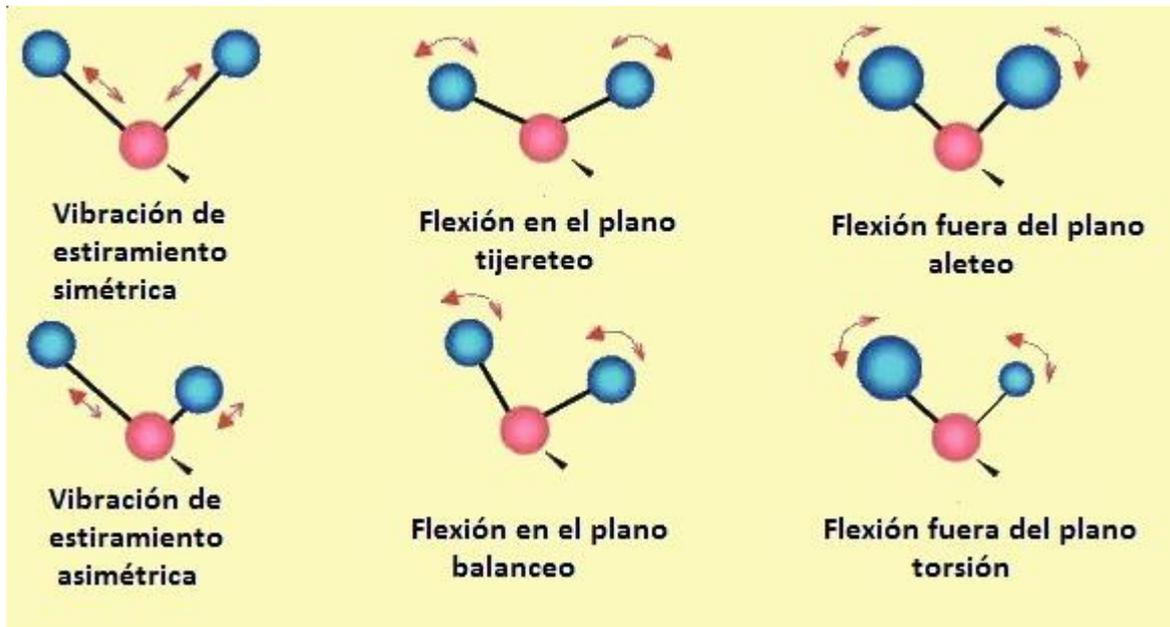


Figura 23. Clasificación de los tipos de vibraciones moleculares: estiramiento o flexión. Adaptado de Basa (2015).

Microscopía de fuerza atómica (AFM)

La invención de la microscopía de fuerza atómica (AFM) en 1986 es un hito en la historia de la nanotecnología y creó nuevas oportunidades en física, química, biología y medicina (Gerber y Lang, 2006). A menudo AFM se llama *ojo de la nanotecnología*. Es una técnica de imagen de alta resolución que puede resolver características tan pequeñas como una red atómica en el espacio real. La técnica sigue el contorno de una superficie mediante el control de un conjunto de fuerzas que actúan entre una pequeña sonda y la superficie. La capacidad de investigar superficies con una excepcional relación señal-ruido con una resolución subnanométrica disparó el desarrollo de una gama de técnicas relacionadas, variedad de sondas para detectar localmente interacciones y manipular la materia (Müller y Dufrêne, 2008, 2011).

La posibilidad de operar en ambientes líquidos y a temperatura ambiente extendió el uso de AFM hacia la biología y permitió el análisis de biomoléculas y células con una resolución subnanométrica (Dufrêne y col., 2017). La ventaja principal de la técnica AFM radica en que es no destructiva, ya que no se requiere generalmente una preparación previa de la muestra, simplemente un soporte donde fijarla.

Una representación esquemática se muestra el principio de la técnica AFM se ilustra en la Figura 24.

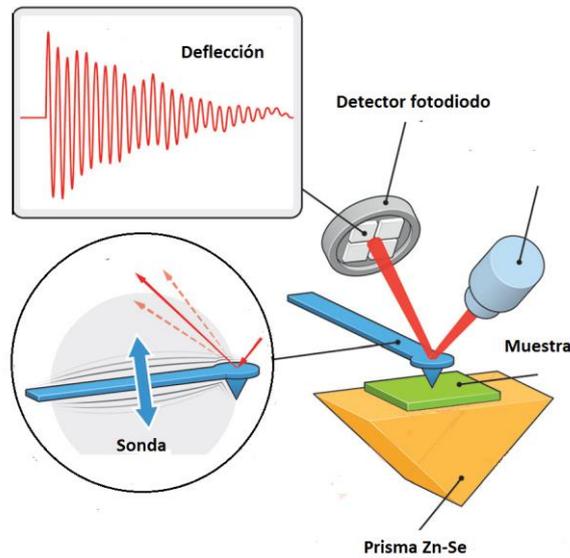


Figura 24. Esquema mostrando el principio de la técnica AFM. La muestra se deposita sobre un prisma de Zn-Se iluminado con una luz láser. Adaptado de Gruszecki y col. (2015).

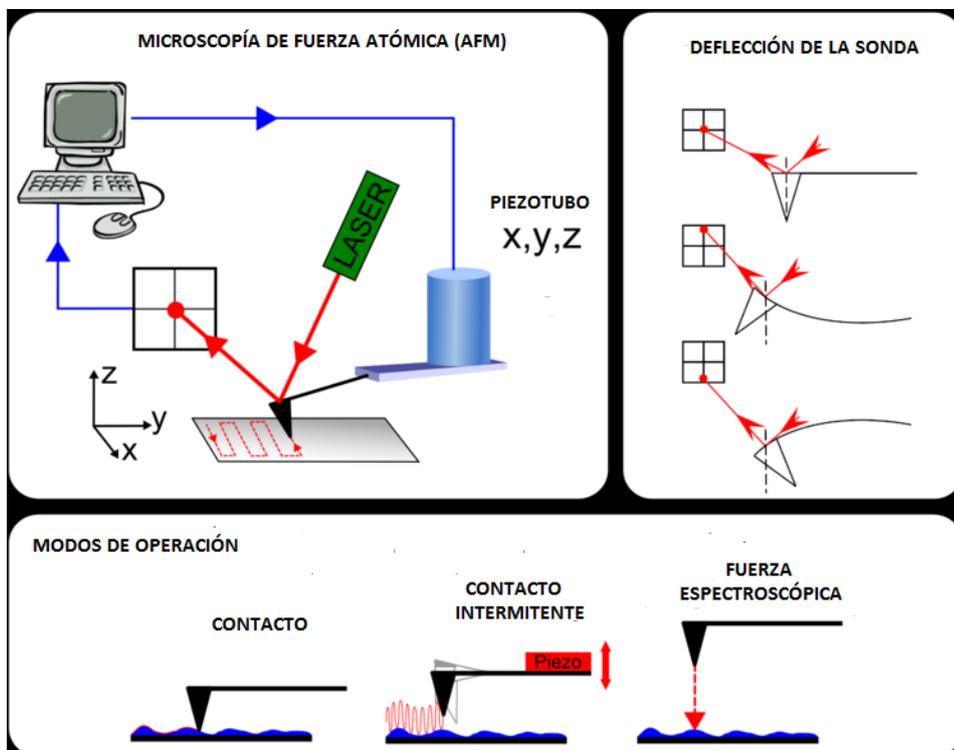


Figura 25. Distintos modos de operación contacto, no contacto e intermitente. Adaptado de <http://biomechanicalregulation-lab.org/afm>

Operación del AFM

Las fuerzas entre la punta y el sustrato tienen contribuciones de corto y largo alcance. En vacío, se deben considerar fuerzas químicas de muy corto alcance (<1 nm) electrostáticas, magnéticas y Van der Waals, mientras que en aire las fuerzas son de mayor alcance, que puede ser hasta 100 nm (Muller y Dufrêne, 2008).

Cuando la muestra se acerca a la punta lo suficiente como para que se ejerzan fuerzas atractivas, el cantiléver se deflecta hacia la superficie; un mayor acercamiento implica una interacción repulsiva entre punta y muestra, con el consiguiente cambio en la deflexión del cantiléver. A medida que la muestra absorbe la radiación, se expande rápidamente. Esta expansión induce oscilaciones en resonancia del cantiléver/ voladizo AFM, que se detectan como una señal. El principio básico de operación del microscopio de fuerzas atómicas (AFM) consiste en realizar el barrido controlado de la superficie de un sustrato con una sonda, la cual puede o no estar en estrecho contacto físico con la superficie mediante un régimen de fuerzas intermoleculares controladas por un mecanismo de retroalimentación. Las fuerzas intermoleculares que actúan entre la punta y la muestra son estudiadas a través del modelo de Lennard-Jones, en el que un par de átomos o moléculas están sujetos a dos tipos de fuerzas de interacción distintas, según se encuentren a una distancia de separación grande o pequeña. A grandes distancias actúan las fuerzas atractivas (van der Waals) y a pequeñas distancias las fuerzas repulsivas (repulsión de Pauli) (Figura 26).

El AFM consta de 5 elementos fundamentales: la punta, el fleje o cantiléver, el detector piezoeléctrico (o escáner), el sistema óptico de detección y el sistema de retroalimentación. Las puntas están soportadas en el extremo del cantiléver, el cual se deflecta según la topografía de la muestra. Éste tiene una superficie reflectante (en general es una capa de oro o de aluminio) para poder detectar los movimientos y/o deflexiones del mismo cuando la punta *barre* la superficie de una muestra. Los AFM incluyen un sistema de detección óptica (cabeza óptica) en el que se utiliza un láser que se refleja en el cantiléver y es enfocado hacia un fotodetector.

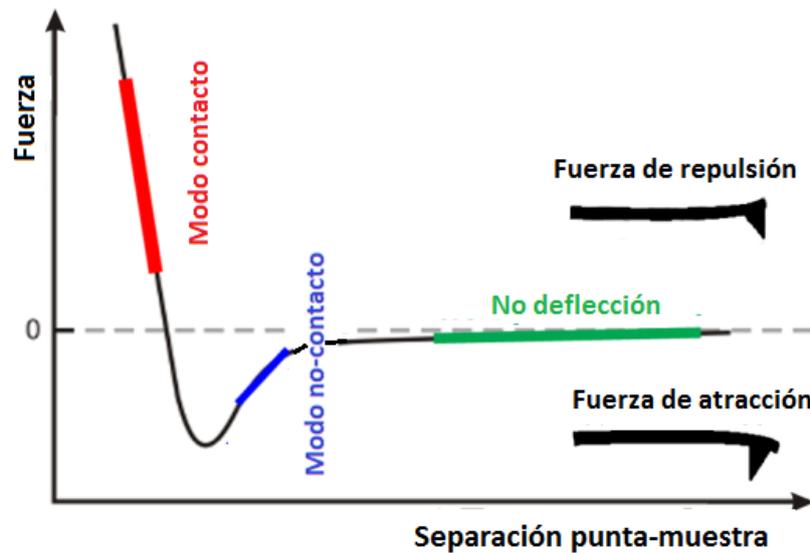


Figura 26. Gráfico del potencial Lennard-Jones en el que se muestra la dependencia de las fuerzas atractivas y repulsivas con la distancia entre átomos. Adaptado de [Maver y col. \(2013\)](#).

El AFM consta de 5 elementos fundamentales: la punta, el fleje o cantiléver, el detector piezoeléctrico (o escáner), el sistema óptico de detección y el sistema de retroalimentación. Las puntas están soportadas en el extremo del cantiléver, el cual se deflece según la topografía de la muestra. Éste tiene una superficie reflectante (en general es una capa de oro o de aluminio) para poder detectar los movimientos y/o deflexiones del mismo cuando la punta *barre* la superficie de una muestra. Los AFM incluyen un sistema de detección óptica (cabeza óptica) en el que se utiliza un láser que se refleja en el cantiléver y es enfocado hacia un fotodetector. En el modo contacto, en el que la punta está en contacto físico con la muestra, se opera con interacciones repulsivas. Para el modo no contacto, en el cual la distancia entre punta y muestra es del orden de decenas a cientos de angstroms, el régimen de fuerzas es atractivo. En esta técnica se hace vibrar el cantiléver cerca de la superficie de la muestra con una frecuencia de resonancia entre 100 a 400 kHz. La fuerza de atracción entre la punta y la muestra es menor a la fuerza repulsiva utilizada en modo de contacto. Por último, el modo intermitente (o Tapping mode®) es aquél en el que una punta oscilante se va aproximando a la superficie y se produce un cambio en la oscilación debido a la

interacción entre la punta y la muestra. En este modo la punta oscilante debe estar lo suficientemente cerca de la superficie en un régimen de fuerzas atractivas, sin que se alcancen interacciones repulsivas. La variación de la deflexión del cantiléver o la altura de la punta construyen una imagen topográfica de la superficie (Maver y col., 2013).

Tal como se mencionó antes, la técnica de AFM es muy versátil, proporcionando detalles topográficos o morfológicos de la superficie de una muestra. Una vez tomadas las imágenes se puede realizar una caracterización precisa de la superficie, obteniendo así información cuantitativa acerca de las características de la superficie, tales como alturas, diámetros, grado de cubrimiento. Otro parámetro útil a determinar en una muestra es su rugosidad, la que permite caracterizar la topografía de la misma.

REFERENCIAS

- Anderson, D. G., Salm, S. N., Allen, D. P., & Nester, E. W. (2016). *NESTER'S MICROBIOLOGY: A HUMAN PERSPECTIVE-Eighth edition*. (D. G. Anderson, S. N. Salm, D. P. Allen, & E. W. Nester, Eds.), *Journal of Chemical Information and Modeling* (8th ed., Vol. 8). United States of America: McGraw-Hill Education. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Ando, T., Uchihashi, T., Kodera, N., Yamamoto, D., Miyagi, A., Taniguchi, M., & Yamashita, H. (2008). High-speed AFM and nano-visualization of biomolecular processes. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, *456*(1), 211–225. <https://doi.org/10.1007/s00424-007-0406-0>
- Aparicio-Rebollo, F. J. (2019). XPS: X-Ray Photoemission Spectroscopy | EEE Parts. Retrieved August 19, 2020, from <https://wpo-altertechnology.com/xps-x-ray-photoemission-spectroscopy-eee-parts/>
- ASTM E96 / E96M-12. (2012). Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials. *ASTM International*. West Conshohocken, PA, USA. https://doi.org/10.1520/E0096_E0096M-12
- Barish, J. A., & Goddard, J. M. (2011). Topographical and Chemical Characterization of Polymer Surfaces Modified by Physical and Chemical Processes. *Journal of Applied Polymer Science*, *120*(5), 2863–2871. <https://doi.org/10.1002/app.33310>
- Basa, C. (2015). Tipos de vibraciones en moléculas poliatómicas. Retrieved June 29, 2020, from <https://slideplayer.es/slide/3528146/>
- Benkaddour, A., Jradi, K., Robert, S., & Daneault, C. (2013). Grafting of Polycaprolactone on Oxidized Nanocelluloses by Click Chemistry. *Nanomaterials*, *3*(1), 141–157. <https://doi.org/10.3390/nano3010141>
- Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, *235*, 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>
- Bluhm, H. (2011). X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) for in situ characterization of thin film growth. *In Situ Characterization of Thin Film Growth*, 75–98. <https://doi.org/10.1533/9780857094957.2.75>
- Catalá, R., & Gavara, R. (2000). Capítulo 21. Materiales plásticos para envases con atmósferas modificadas. In G. V. B.-C. Jorge E. Lozano, Cristina Anon (Ed.), *Tendencias en ingeniería alimentaria* (p. 311). Lancaster, Pennsylvania. EEUU.
- Charlton, M., & Humberston, J. W. (2011). *Positron Physics* (11th ed.). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511535208>
- Cornejo, L. (2015). Resonancia del plasmón de la superficie (RPS); propiedades optoelectrónicas. Retrieved June 5, 2020, from <https://nuevatecnologiasymateriales.com/resonancia-del-plasmon-de-la-superficie-rps-propiedades-optoelectronicas/>
- Díaz-Urbe, C. E., Vallejo, W., & Miranda, J. (2013). Distribución del tamaño de partícula de la tetracarboxifenilporfirina de hierro (III) adsorbida sobre dióxido de silicio por dispersión dinámica de luz. *Poligran*, *3*(3). <https://doi.org/10.15765/e.v3i3.424>
- Dufrêne, Y. F., Ando, T., Garcia, R., Alsteens, D., Martinez-Martin, D., Engel, A., Müller, D. J. (2017).

- Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology. *Nature Nanotechnology*, 12(4), 295–307. <https://doi.org/10.1038/nnano.2017.45>
- Echlin, P. (2011). *Handbook of sample preparation for scanning electron microscopy and X-ray microanalysis*. Springer Science & Business Media.
- Eldrup, M. (1995). Positron Methods for the Study of Defects in Bulk Materials. *Le Journal de Physique IV*, 05(C1), C1-93-C1-109. <https://doi.org/10.1051/jp4:1995111>
- El-Gamal, S., El Sayed, A. M., & Abdel-Hady, E. E. (2018). Effect of cobalt oxide nanoparticles on the nano-scale free volume and optical properties of biodegradable CMC/PVA films. *Journal of Polymers and the Environment*, 26(6), 2536-2545.
- El-Gamal, S., & Elsayed, M. (2020). Synthesis, structural, thermal, mechanical, and nano-scale free volume properties of novel PbO/PVC/PMMA nanocomposites. *Polymer*, 206, 122911.
- Fernández Cañete, A. (2013). Estudio de la Hidrofobicidad y Autolimpieza en Materiales con Nanotratamientos Superficiales. *Electronic Engineering*, 1–73. Retrieved from https://ddd.uab.cat/pub/trerecpro/2013/hdl_2072_234675/PFC_AgustinFernandezCanete.pdf
- Fernández, F. A. (2019). “*Construcción y evaluación funcional de ensamblados supramoleculares electroactivos de poliaminas modificadas con centros de ferroceno.*” Universidad Nacional de la Plata.
- Fusion Technology Group. (2020). Positron Annihilation Lifetime Spectroscopy (PALS). Retrieved August 19, 2020, from <https://ftg.demokritos.gr/research/facilities/pals>
- Gaibor-Ontaneda, E. L., & Chuqui-Gavilanes, J. M. (2018). *Diseño e implementación de un prototipo de sistema espectral para adquirir datos de los diferentes espectros de la luz visible*. Escuela Politécnica Nacional. Retrieved from <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/19529/1/CD-8922.pdf>
- GE Healthcare Life Science. (2012). Biacore TM Assay handbook, 1–78.
- Gerber, C., & Lang, H. P. (2006). How the doors to the nanoworld were opened. *Nature Nanotechnology*, 1(1), 3–5. <https://doi.org/10.1038/nnano.2006.70>
- Gill, P., Moghadam, T. T., & Ranjbar, B. (2010). Differential scanning calorimetry techniques: applications in biology and nanoscience. *Journal of Biomolecular Techniques: JBT*, 21(4), 167. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2977967/>
- Gruszecki, W. I., Kulik, A. J., Janik, E., Bednarska, J., Luchowski, R., Grudzinski, W., & Dietler, G. (2015). Nanoscale resolution in infrared imaging of protein-containing lipid membranes. *Nanoscale*, 7(35), 14659–14662. <https://doi.org/10.1039/c5nr03090k>
- Haynie, D. T. (2008). *Modulated-temperature differential scanning calorimetry*. (D. J. Reading, M., Hourston, Ed.). New York, NY, USA: Springer.
- Herrán, M. (2018). *Comparación de la química de superficies para en cambio de escala en materiales nanoestructurados de Paladio: Caracterización avanzada por espectroscopía fotoelectrónica*. Universidad Nacional de La Plata.
- Hodne, H. (2007). *Rheological performance of cementitious materials used in well cementing*.
- Hunter, R. J. (2013). *Zeta Potential in Colloid Science: Principles and Applications* (Vol. 2)). United

- States of America: Academic press.
- Inkson, B. J. (2016). *Scanning Electron Microscopy (SEM) and Transmission Electron Microscopy (TEM) for Materials Characterization. Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100040-3.00002-X>
- Kohl, H., & Reimer, L. (2008a). *Transmission Electron Microscopy: Physics of Image Formation*. New York, NY : Springer, 2008. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-40093-8>
- Kohl, H., & Reimer, L. (2008b). *Transmission electron microscopy: physics of image formation*. New York, NY, USA: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-40093-8>
- Krause-Rehberg, R., & Leipner, H. S. (1999). *Positron annihilation in semiconductors: defect studies (Vol. 127)*. Springer Science & Business Media.
- Kumirska, J., Czerwicka, M., Kaczyński, Z., Bychowska, A., Brzozowski, K., Thöming, J., & Stepnowski, P. (2010). Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan. *Marine Drugs*, 8(5), 1567–1636. <https://doi.org/10.3390/md8051567>
- Laucirica, G. (2018). *La Interacción Amina-Fosfato : Efectos de Inversión de Carga Superficial En La Micro y Nano-Escala*. Universidad Nacional de La Plata.
- Lozada, J. D. (2001). *Conservación de brócoli (Brassica oleracea) bajo atmósferas modificadas con absorbedor de etileno*. Universidad de las Américas.
- Malvern Panalytical. (2020). Dynamic Light Scattering (DLS). Retrieved August 19, 2020, from <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/technology/light-scattering/dynamic-light-scattering>
- Mantilla, C., Pedraza, J., & Laverde, D. (2008). Application of zeta potential studies in the development of an alternative process for the flotation of feldspar minerals. *DYNA*, 75(154), 65–71.
- Marmur, A. (2006). Soft contact: Measurement and interpretation of contact angles. *Soft Matter*, 2(1), 12–17. <https://doi.org/10.1039/b514811c>
- Martínez de Yuso-García, M. del V. (2015). *Aplicaciones de la Espectroscopía Foelectrónica de Rayos X en la Caracterización de Materiales Funcionales*. UNIVERSIDAD DE MÁLAGA.
- Maver, U., Maver, T., Peršin, Z., Mozetič, M., Vesel, A., Gaberšček, M., & Stana-Kleinschek, K. (2013). Polymer characterization with the atomic force microscope. In F. Yilmaz (Ed.), *Polymer Science*. Middle East Technical University, Turkey. <https://doi.org/10.57772/51060>
- Molina, L., Garcia, O., & Garcia, Mi. (2010). Espacio de color CIE Lab. Retrieved August 27, 2020, from <https://sobrecolors.blogspot.com/2010/03/modo-de-color-lab.html>
- Müller, D. J., & Dufrêne, Y. F. (2008). Atomic force microscopy as a multifunctional molecular toolbox in nanobiotechnology. *Nanoscience and Technology: A Collection of Reviews from Nature Journals*, 269–277. https://doi.org/10.1142/9789814287005_0028
- Müller, D. J., & Dufrêne, Y. F. (2011). Atomic force microscopy: A nanoscopic window on the cell surface. *Trends in Cell Biology*, 21(8), 461–469. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.04.008>
- Nagata, K., & Handa, H. (2000). *Real-Time Analysis of Biomolecular Interactions*. Springer (1 July 2000).

- Anton van der Merwe, P. (2003). Surface plasmon resonance. Retrieved from <http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/wp-content/uploads/2011/02/spr1.pdf>
- Oldenburg, S.J. (2014). Silver nanoparticles: properties and applications. *Sigma-Aldrich Co., nd*.
- Pascat, B. (1986). Study of some factors affecting permeability. In Food Packaging and Preservation. *In Food Packaging and Preservation. Theory and Practice. Elsevier Applied Science Publishers, 7, 24.*
- Pérez-Mirabet, L. (2013). *Synthesis, characterization and funcionalizations of metal and metal oxide nanoparticles. TEM Microscopy Study.* Universidad Autónoma de Barcelona. Retrieved from <https://core.ac.uk/download/pdf/20542803.pdf>
- Rana, D., & Matsuura, T. (2010). Surface modifications for antifouling membranes. *Chemical Reviews, 110(4), 2448–2471.* <https://doi.org/10.1021/cr800208y>
- Reading, M., & Hourston, D. J. (2006). *Modulated temperature differential scanning calorimetry: theoretical and practical applications in polymer characterisation.* (Springer, Ed.). Netherlands.
- Resano, M., Aramendia, M., & Belarra, M.A. (2014). High-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for direct analysis of solid samples and complex materials: a tutorial review. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 29, 2229-2250.* <https://doi.org/10.1039/c4ja00176a>
- Roduit C. "AFM figures", www.freesbi.ch. Creative Commons Attribution. 2010.
- Ruiz-Cabello, F. J. M. (2009). *Efecto de la rugosidad y heterogeneidad superficial en fenómenos de mojado.* Granada: Editorial de la Universidad de Granada.
- Schick, C. (2009). Differential scanning calorimetry (DSC) of semicrystalline polymers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry, 395(6), 1589–1611.* <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3169-y>
- Shah, B., Kakumanu, V. K., & Bansal, A. K. (2006). Analytical techniques for quantification of amorphous/crystalline phases in pharmaceutical solids. *Journal of Pharmaceutical Sciences, 95(8), 1641-1665.* <https://doi.org/10.1002/jps.20644>
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2015). *Fundamentos de Química Analítica.* (McGraw-Hill, Ed.) (Novena edi). México D.F. Retrieved from <http://latinoamerica.cengage.com>
- Snoeijer, J. H., & Andreotti, B. (2008). A microscopic view on contact angle selection. *Physics of Fluids, 20(5).* <https://doi.org/10.1063/1.2913675>
- Spence, J. C. H. (2017). *High-Resolution Electron Microscopy* (Fourth Edi).
- Sprpages. (2006). SPR Theory. Retrieved May 6, 2020, from <https://www.sprpages.nl/spr-overview/spr-theory>
- Stokes, D. (2008). *Principles and practice of variable pressure/environmental scanning electron microscopy (VP-ESEM).* (M. Rainforth, Ed.). John Wiley & Sons.
- TA Instruments. (2016). TA Instruments Analisis Termico. Retrieved from <http://www.quimica.uns.edu.ar/images/stories/descargas/Manuales LIUC/DSC.pdf>
- Talero, R., Pedrajas, C., & Rahhal, V. (2013). Performance of Fresh Portland Cement Pastes – Determination of Some Specific Rheological Parameters. *Rheology - New Concepts,*

- Applications and Methods*. <https://doi.org/10.5772/53761>
- Taqvi, S., & Bassioni, G. (2019). Understanding Wettability through Zeta Potential Measurements. *Wettability and Interfacial Phenomena - Implications for Material Processing, 1*, 1–19. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84185>
- Taqvi, S. T., Almansoori, A., & Bassioni, G. (2014). Modeling the impact of wettability alterations on calcium carbonate system for crude oil and asphaltenic solutions. *Industrial and Engineering Chemistry Research, 53*(12), 4773–4777. <https://doi.org/10.1021/ie402752x>
- Tavana, H., Lam, C. N. C., Grundke, K., Friedel, P., Kwok, D. Y., Hair, M. L., & Neumann, A. W. (2004). Contact angle measurements with liquids consisting of bulky molecules. *Journal of Colloid and Interface Science, 279*(2), 493–502. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.06.090>
- Valiente-Linares, G., Pablo-Rivera, E., Zuñiga-Esquivel, M. D. C., Sanchez-Ventura, A., Martinez-Tolentino, S. I., & Villar-Padilla, H. (2020). ESPECTROSCOPIA ULTRA VIOLETA. Retrieved August 19, 2020, from <https://sites.google.com/site/conalep012217e3/home/espectroscopio-ultra-violeta>
- Van der Heide, P. (2011). *X-ray photoelectron spectroscopy: an introduction to principles and practices*. Houston, TX: John Wiley & Sons.
- Varghese, N., Vivekchand, S. R. C., Govindaraj, A., & Rao, C. N. R. (2008). A calorimetric investigation of the assembly of gold nanorods to form necklaces. *Chemical Physics Letters, 450*(4–6), 340–344. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2007.11.022>
- Villarruel, S., Giannuzzi, L., Rivero, S., & Pinotti, A. (2015). Changes induced by UV radiation in the presence of sodium benzoate in films formulated with polyvinyl alcohol and carboxymethyl cellulose. *Materials Science and Engineering C, 56*, 545–554. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.07.003>
- Weber, P. C., & Salemme, F. R. (2003). Applications of calorimetric methods to drug discovery and the study of protein interactions. *Current Opinion in Structural Biology, 13*(1), 115–121. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(03\)00003-4](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(03)00003-4)
- Williams, D.B., & Carter, C.B. (2009). Electron Sources. In: *Transmission Electron Microscopy*. In *Advanced Transmission Electron Microscopy* (pp. 74–89). Boston, MA: Springer. https://doi.org/10.1007/978-0-387-76501-3_5
- Yang, H., Lee, H. S., Kotula, P. G., Sato, Y., Ikuhara, Y., & Browning, N. D. (2015). Amphoteric doping of praseodymium Pr³⁺ in SrTiO₃ grain boundaries. *Applied Physics Letters, 106*(12), 121904.
- Young, T. (1805). An Essay on the Cohesion of fluids. *Royal Society, 95*, 23. <https://doi.org/10.1098/rstl.1805.0005>
- Zhang, X., Liu, J., Qian, C., Kan, J., & Jin, C. (2019). Effect of grafting method on the physical property and antioxidant potential of chitosan film functionalized with gallic acid. *Food Hydrocolloids, 89*(September 2018), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.10.023>