



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA SOBRE
FIBRAS POLIMÉRICAS RENOVABLES PARA SU
EVALUACIÓN COMO HILO DE SUTURA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIA DE MATERIALES

PRESENTA:

ALDO ADRIAN LOPEZFUENTES RUIZ

DIRIGIDA POR:

**DR. RAÚL ALBERTO MORALES LUCKIE
DR. OSCAR FERNANDO OLEA MEJIA**



TOLUCA ESTADO DE MÉXICO

JUNIO DEL 2013



3er. oficio de Evaluación de Grado
239/2013

Toluca, México
14 de junio de 2013

P. de Maestría en Ciencia de Materiales Aldo Adrian Lopezfuentes Ruíz
Facultad de Química, UAEM
Presente

La que suscribe Directora de la Facultad de Química, dependiente de la Universidad Autónoma del Estado de México, comunica a Usted que el Jurado de su Evaluación de Grado estará formado por:

Dr. Leobardo Manuel Gómez Olivan
PRESIDENTE

FIRMA

Dr. Alfredo Rafael Vilchis Nestor
SECRETARIO

Dr. Fernando Ureña Nuñez
PRIMER VOCAL

Dr. Miguel Angel Camacho López
SEGUNDO VOCAL

Dr. Raúl Alberto Morales Luckie
TERCER VOCAL

Dr. Oscar Fernando Olea Mejía
SUPLENTE

Dr. Víctor Sánchez Mendieta
SUPLENTE

ATENTAMENTE
PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO
"2013, 50 Aniversario Luctuoso del Poeta Heriberto Enríquez"

M. en A.P. GUADALUPE OFELIA SANTAMARÍA GONZÁLEZ
DIRECTORA



c.c.p. Archivo

Índice

Resumen	1
Abstract	3
Introducción	5
1. Antecedentes	
1.1 Nanotecnología	7
1.2 Nanopartículas de plata	9
1.3 Métodos de síntesis	10
1.3.1 Métodos químicos	10
1.3.2 Métodos físicos	11
1.3.3 Métodos biológicos	12
1.4 Química verde	13
1.5 Bioreductores	16
1.5.1 <i>Heterotheca inuloides</i>	16
1.5.2 <i>Aloe vera</i>	19
1.6 Pruebas microbiológicas	20
1.6.1 <i>Escherichia coli</i>	21
1.6.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	22
1.7 Hilos de sutura	23
1.7.1 Fibras de <i>Agave lechuguilla</i>	27
1.7.2 Fibras de seda	27
2. Técnicas de caracterización	
2.1 Espectroscopia UV-Vis	30
2.1.1 Plasmón superficial de nanopartículas metálicas	31
2.1.2 Microscopia electrónica de barrido	31
2.1.2.1 Espectroscopia de energía dispersiva (EDS)	38
2.1.2.2 Condiciones del análisis por SEM y EDS	39
2.1.3 Microscopia electrónica de transmisión	40

2.1.3.1 Condiciones de análisis por TEM	43
2.1.4 Pruebas microbiológicas	43
2.1.5 Pruebas de tensión	45
2.1.5.1 Condiciones para las pruebas mecánicas	47
2.1.6 Espectroscopia fotoelectrónica de rayos x	49
3. Desarrollo experimental	
3.1 Metodología	54
3.2 Materiales y reactivos	55
3.3 Síntesis de nanopartículas de plata	
3.3.1 Impregnación de iones de plata en las fibras	57
3.3.2 Obtención de nanopartículas por reducción <i>in situ</i>	57
4. Resultados	
4.1 Artículo enviado	58
Conclusiones	73
Referencias	75

RESUMEN

Un problema grave que tienen las heridas expuestas es la propensión a infectarse. La solución común a este problema es el suministro de antibióticos al paciente en forma oral o inyectados. A su vez, los hilos de sutura que se emplean son un lugar de cultivo de microorganismos patógenos. Para atacar estos problemas una alternativa es la síntesis de un material compuesto de fibras renovables y nanopartículas de plata que pueden servir como hilos de sutura. Es bien sabido que las nanopartículas metálicas presentan propiedades diferentes a las del material en bulto ya sean eléctricas, magnéticas u ópticas. En especial las nanopartículas de plata presentan una actividad antibacterial muy fuerte y sobre todo de amplio espectro, es decir, inhibe el crecimiento tanto de bacterias, virus como de hongos. Existen muchos métodos de obtención de nanopartículas metálicas entre los que se encuentran los métodos físicos, químicos y biológicos. Cada uno de estos métodos tiene ventajas y desventajas inherentes.

En este trabajo se propone la síntesis de nanopartículas de plata por un método de química verde, por biorreducción, utilizando por primera vez extracto de *Hetherotheca Inuloides* (Árnica mexicana). Este método no genera residuos tóxicos, sus materias primas son de baja o nula peligrosidad y el proceso se lleva a cabo a condiciones ambientales (presión y temperatura atmosférica). Además, se propone el empleo del árnica ya que esta planta presenta propiedades antiinflamatorias. Se plantea en este trabajo el uso de dos fibras poliméricas renovables, la primera es el *Agave Lechuguilla* que es una fibra autóctona de la región central de México y de bajo costo, la segunda es la seda natural y se utilizará como comparación con las fibras de *Agave Lechuguilla*,

siendo ambas renovables al igual que el reductor. Las fibras se caracterizaron antes y después de ser impregnadas con nanopartículas de plata por las técnicas de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), Espectroscopía de Dispersión de Energía (EDS) y Espectroscopía Fotoelectrónica de rayos X (XPS). Las nanopartículas de plata fueron caracterizadas por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y espectroscopía de ultravioleta visible (UV-Vis). Adicionalmente se estudió el efecto antibacterial de los materiales compuestos ante dos tipos de bacterias: *E. Coli* y *S. Aureus*. Finalmente, se realizaron pruebas mecánicas a los compositos para determinar si éstos cumplen con los requerimientos para ser utilizados como hilos de sutura. Se determinaron los parámetros experimentales óptimos para obtener partículas menores a 50 nm y con baja polidispersidad como se comprobó por TEM y UV-Vis. Por SEM, EDS y XPS se pudo comprobar la presencia y dispersión de las nanopartículas de plata en la superficie de las fibras. Se encontró que efectivamente dichas partículas se encuentran dispersas a lo largo de toda la superficie de cada fibra. Los compositos con los dos tipos de fibras presentaron buenas propiedades antibacteriales lo cual se observa con el halo inhibitorio que se forma alrededor de las fibras en los cultivos bacteriales. Finalmente, los compositos presentan propiedades mecánicas un poco inferiores a las fibras prístinas, sin embargo, los compositos sí pueden emplearse como hilos de sutura.

ABSTRACT

One problem that exposed injuries have is their readiness to be infected by microorganisms. The common solution to this issue is the usage of antibiotics via oral or injected to the patient. Furthermore, the suture thread used can serve as suitable places for pathogen microorganisms to growth. To overcome these problems we propose in the present project the synthesis of a composite from renewable fibers and silver nanoparticles. These materials can be used as suture threads. It is well known that metallic nanoparticles show different properties than those of the bulk material such as electrical, magnetic or optical. Especially, silver nanoparticles show very good antibacterial properties with a wide spectrum preventing the growth of bacteria, fungi and virus. There are many methods to obtain metallic nanoparticles such as chemical, physical and biological. Each of these methods has advantages and disadvantages. In this work we propose the synthesis of silver nanoparticles by a green chemistry method, namely bioreduction using for the first time *Hetherotheca Inuloides* (Mexican arnica) extract. This is a green method that does not generate toxic residues, the raw materials show low or no dangerousness and it is carried on under ambient conditions (atmospheric pressure and temperature). Moreover, we proposed the arnica since it shows anti-inflammatory properties that can be “transferred” to a composite material via absorption of active molecules from the plant extract. Two types of polymeric renewable fibres are proposed: *Agave lechuguilla* which is a low cost regional plant; the second is natural silk and it is used as comparison with the *Agave lechuguilla* fibers. Both fibers are renewable, the same as the bioreductor used. The fibers were characterized before and after being impregnated with silver

nanoparticles by Scanning Electron Microscopy (SEM), Energy Dispersive Energy (EDS) and X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS). Silver nanoparticles were studied by Transmission Electron Microscopy (TEM) and UV-Vis spectroscopy (UV-Vis). Additionally, the antibacterial properties of the composites were studied using two types of bacteria: *E. Coli* and *S. Aureus*. Finally, mechanical testing of the composites was carried out in order to determine if these materials meet the requirements to be used as suture threads. Experimental parameters were optimized to produce nanoparticles with diameters less than 50 nm and low polydispersity as proved by TEM and UV-Vis. The presence and dispersion of the nanoparticles on the surface of the fibers was evidenced by SEM, EDS and XPS. We found that the particles are found throughout the surface of each fiber. The composites of the two types of fibers show antibacterial properties as proved by the presence of the inhibitory halo formed around the fibers inside the cell cultures. Finally, our composites show lower mechanical properties in comparison to the pristine fibres, nevertheless, they can be effectively used as suture threads.

INTRODUCCIÓN

La nanociencia puede considerarse como uno de los más ambiciosos e innovadores proyectos científicos a escala mundial, donde suman esfuerzos un gran número de investigadores de muchas disciplinas científicas, no puede denominarse, química, física, o biología dado que los científicos de estos campos están estudiando un campo dimensional muy pequeño para una mejor comprensión del mundo que nos rodea y donde las posibles aplicaciones podrían considerarse casi de ciencia ficción

Las nanopartículas más utilizadas son las metálicas y entre estas se encuentra la plata, que posee propiedades, ópticas, catalíticas, magnéticas y que además es reconocida por sus propiedades antibacteriales de amplio espectro.

En este proyecto, se propone la síntesis de un bionanocomposito el cual pudiera ser utilizado como un hilo de sutura “inteligente” el cual pueda prevenir la posible infección al coser una herida, lo cual provoca un retraso en el proceso de curación, o incluso causando un daño mayor en la herida, en la actualidad cuando se sutura a un paciente, es necesario tomar antibióticos externos, para evitar una infección, pero en muchos casos esto causa un efecto secundario en el sistema biológico del paciente.

Existen diferentes métodos de síntesis de nanopartículas de plata, métodos físicos, químicos y biológicos, dentro de los biológicos se considera a la bio-reducción, en particular esto se puede lograr utilizando la infusión de diferentes plantas, este método no requiere de equipos costosos, y no presenta un riesgo elevado para el medio ambiente, y se cumplen varios de los 12 principios de la química verde,

la cual se refiere a diseño de productos y procesos amigables con el ambiente, además del uso de materias primas renovables.

Para este proyecto se utilizó *Hetherotheca inuloides* conocida como árnica mexicana, como bioreductor, una planta medicinal que es reconocida por sus propiedades antiinflamatorias, se realizó la bio-reducción de nanopartículas de plata sobre 2 fibras poliméricas renovables, que fueron *Agave lechuguila* y un hilo de sutura comercial de seda, para su evaluación como hilos de sutura con propiedades antiinflamatorias y antibacteriales.

Las fibras fueron caracterizadas, en su forma original por medio de SEM, para analizar sus propiedades morfológicas, XPS para analizar el ambiente químico de las fibras. Los nanocompositos fueron caracterizados igualmente por SEM, XPS, EDS, y las partículas de plata fueron caracterizadas por UV-Vis, y TEM para analizar su tamaño y forma.

Además de esto se realizaron pruebas mecánicas de las fibras sin y con nanopartículas de plata, también se realizó un tratamiento con azul de metileno a las fibras de *Agave lechuguila* para suavizarlas, y se compararon los resultados de las pruebas mecánicas con aquellas fibras sin este tratamiento.

Se realizaron pruebas microbiológicas, de los nanocompositos de seda y *agave lechuguila* con nanopartículas de plata, se propusieron 2 bacterias, una Gram + y una Gram -, *S. aureus* y *E. coli* respectivamente, con lo cual pudimos comprobar que ambas fibras poseen propiedades antibacteriales, esto mediante la presencia del halo inhibitorio.

1. ANTECEDENTES

1.1 NANOTECNOLOGÍA

La ciencia e ingeniería de los materiales ha evolucionado a tal grado que ha llamado la atención de la comunidad científica, haciendo esta parte importante de la investigación de la mejora de los materiales a altos niveles y es así como se ha creado la nanotecnología.

La nanotecnología se refiere a la creación, síntesis, diseño manipulación y explotación de materiales **através** del control de la materia, a nivel nanométrico ($1\text{ nm}=10^{-9}\text{m}$), a este nivel las propiedades de los materiales cambian significativamente al llegar a la nano escala con respecto a los materiales en bulto. Entendiendo como propiedad de un material, la magnitud que responde al aplicar un cierto estímulo. (1)

La nanotecnología ha tenido gran relevancia en los últimos años, debido a sus diferentes aplicaciones en la medicina, catálisis, biología, ciencia de materiales, electrónica, ecología, y en la industria de los alimentos.(1-5)

Otro concepto importante que se debe de conocer es el que es una partícula en el rango nanométrico, y se define como un pequeño objeto que se comporta como unidad entera, en términos de transporte y propiedades. (6) No se tiene definido el rango exacto del tamaño de una nanopartícula pues se considera un tanto arbitrario, para que ésta sea considerada como nanométrica debe de tener al menos una dimensión por debajo de los 100 nm. (7)

Clasificación de los nano-materiales:

- 0 dimensiones: en el cual todas sus dimensiones se encuentran debajo de los 100 nm
- 1 dimensión o nanoalambres: la longitud es mayor de los 100 nanómetros pero el diámetro se encuentra por debajo de esta magnitud
- 2 dimensiones o nanocapa: tienen un largo y ancho que rebasa los 100 nanómetros pero el espesor es de escala nanométrica
- 3 dimensiones o nanocelda en la cual sus tres dimensiones sobrepasan los 100 nanómetros

1.2 NANOPARTÍCULAS DE PLATA

Las nanopartículas más utilizadas por su campo de aplicación dentro de la nanotecnología son las metálicas (5) y dentro de éstas se encuentra la plata [4] esta es la más usada en la actualidad en el campo de la medicina y en el cuidado de la salud aplicada a cremas, aerosoles antisépticos, ropa, materiales de curación etc. Por sus propiedades antibacteriales (8)

Para comprender mejor el uso de la plata se requiere el conocimiento de las propiedades de la plata, que es un metal muy dúctil y maleable, más duro que el oro y presenta un brillo blanco metálico, se empaña en presencia de ozono, sulfuro de hidrógeno o aire con azufre pero es menos reactiva que el cobre.

Además tiene la conductividad eléctrica más alta de todos los metales y tiene el mayor índice de reflexión de todos los metales, (9).

Las propiedades antibacteriales de la plata se fundamentan en que los iones desestabilizan e incrementan la permeabilidad de membranas bacteriales (10) por sus propiedades bactericidas han sido explotadas desde miles de años. Como un ejemplo tenemos a los romanos quiénes utilizaban monedas de plata para purificar el agua siendo éste el único método efectivo conocido por ellos, y en la actualidad se continúa utilizando ya conociendo sus beneficios y sus aplicaciones, un caso reciente es el uso de estas nanopartículas metálicas en los programas espaciales de la NASA como la nave espacial Apollo en la cual las utilizaron para purificar el agua a bordo de esa nave (11).

La Plata es un efectivo agente antimicrobial con baja toxicidad (12), lo cual es importante especialmente en el tratamiento médico de heridas

donde la bacteremia (presencia de bacterias en la sangre) es prevalente y su control es esencial.

Utilizando iones plata, es una forma de neutralizar los fluidos biológicos pudiendo causar anormalidad cosmética y argyria (es una condición causada por la exposición de la piel al elemento plata o compuestos de plata en el cual el síntoma más dramático es la coloración azul-grisáceo de la piel), lo que no ocurre con la utilización de nanopartículas, además de que en forma de nanopartículas las concentraciones requeridas están en el orden de los nanogramos mientras que en su forma iónica están en el orden de los microgramos (13).

Con todo esto se sabe que las nanopartículas de plata no presentan riesgo tóxico para el organismo, además de que estas las podemos adherir a una gran variedad de materiales utilizándolos como soportes de estas partículas y tomando las propiedades bactericidas de estas nanopartículas metálicas creando un halo de protección contra hongos y bacterias dándole a estos materiales múltiples aplicaciones (14).

1.3 MÉTODOS DE SÍNTESIS

Los métodos de síntesis de nanopartículas metálicas se clasifican generalmente en tres tipos:

1.3.1 Métodos químicos

Los métodos químicos comúnmente parten de la reducción de una sal metálica empleando reductores como boro hidruro de sodio [15], bromuro de cetiltrimetilamonio, ácido ascórbico (16) glicoles (17) polivinilpirrolidona en etanol (18), entre muchos otros, actualmente

los métodos químicos es una de las técnicas más utilizadas aunque por lo general, los agentes reductores son tóxicos, además de los solventes orgánicos que son nocivos para el ambiente.

También se pueden obtener nanopartículas a través de descomposición química, térmica, fotoquímica o sonoquímica entre otras. [19]

1.3.2 Métodos físicos

Dentro de este tipo de métodos, la ablación laser es una novedosa técnica que puede ser empleada para la generación de diversas nanoestructuras, pero la mayor desventaja de este método es el alto costo de la infraestructura requerida, lo cual limita su uso. (20)

Otro método físico es la mecano-síntesis, la cual es una técnica capaz de sintetizar materiales en una variedad de fases fuera del equilibrio termodinámico, la evaporación térmica es una técnica utilizada para la obtención de nanopartículas de gadolino y europio, en esta síntesis se ocupa un horno para la deshidratación y descomposición de las sales y así obtener nanopartículas metálicas (21).

Por otra parte el esparcido atomizado o en inglés sputtering, también es utilizado como ruta sintética de nanopartículas metálicas. (22)

Finalmente la ablación iónica la cual es una técnica de síntesis física para la obtención de nanopartículas metálicas de aluminio, níquel, titanio entre otras y bimetálicas TiNi. (23)

1.3.3 Métodos biológicos

Estos se refieren principalmente al uso de organismos vivos tales como bacterias, hongos y plantas in vivo o utilizando su biomasa, la necesidad de desarrollar métodos de síntesis que no perjudiquen al medio ambiente dio lugar a que los investigadores estudien sistemas biológicos que sean útiles para el desarrollo de estos materiales.

La bioreducción es un método que está tomando fuerza, teniendo como ventajas que es un método sencillo, no requiere de equipos costosos, energéticamente económico y donde el solvente es agua, por estas características este método es accesible y con resultados aceptables. Esto conlleva a que por las características del método se cumplan varios de los postulados de la química verde, de los cuales hablaremos a continuación. Uno de los primeros trabajos en esta área fue el reportado Gardea-Torresday et al quienes desarrollaron técnicas y métodos de bioreducción para generar en este caso nanopartículas de oro y nano rods (24) (son objetos de una morfología a nanoescala de un rango de 1-100 nm), este método era originalmente utilizado en el proceso para recobrar oro en la minería, por biomateriales de soluciones acuosas considerados como una alternativa para las técnicas químicas tóxicas, también hay reportes de producción de nanorods y nanopartículas por diferentes plantas. (25).

1.4 QUÍMICA VERDE

La química verde es un término introducido desde 1991 y se refiere al diseño de productos y procesos benignos para el ambiente lo que ha despertado mucho interés en los científicos internacionalmente y este concepto tiene 12 principios que son tomados como pautas y criterios para el diseño de productos y procesos los cuales son de suma importancia para tener en cuenta al diseñar nuevos procesos conservando la química verde, estos principios se mencionan a continuación (26):

- Es mejor prevenir desechos que tratarlos después de ya ser formados.
- Los métodos sintéticos deben de ser diseñados para maximizar la incorporación de todos los materiales en el proceso del producto final.
- Las metodologías deben de ser diseñadas para usar y generar sustancias que posean poca o nula toxicidad para el humano y el medio ambiente.
- Los productos químicos deben de ser diseñados para preservar su eficacia y funcionamiento mientras se reduce su toxicidad.
- El uso de sustancias auxiliares (disolventes, agentes de separación, etc.) deben ser innecesarios en cuanto sea posible e inofensivo cuando se use.

- El requerimiento de energía debe ser tomada en cuenta para el impacto en el medio ambiente, la economía y debe de ser minimizado. Los métodos sintéticos deben de ser conducidos a temperatura y presión ambiente.
- Una materia prima deberá ser preferiblemente renovable en vez de agotable, siempre que sea técnica y económicamente viable.
- Se evitará en lo posible la formación de derivados, (grupos de bloqueo, de protección/ desprotección, modificación temporal de procesos físico/químicos
- Se emplearán catalizadores (lo más selectivos posible), en lugar de reactivos estequiométricos.
- Los productos químicos se diseñarán de tal manera que al final de su función no persistan en el medio ambiente sino que se transformen en productos de degradación inocua.
- Las metodologías analíticas serán desarrolladas posteriormente para permitir una monitorización y control en tiempo real de proceso, previo a la formación de sustancias peligrosas.
- Las sustancias o la formación de sustancias usadas en los procesos químicos deben de ser elegidas para minimizar los accidentes químicos, incluidas las emanaciones, explosiones e incendios.

El método que se propone para el desarrollo del presente proyecto de investigación, se lleva a cabo a temperatura ambiente, presión atmosférica, utilizando agua como solvente, la propuesta de un bioreductor como lo es la *Hetherotheca inuloides* (árnica mexicana) utilizado por primera vez, el cual le podrá conferir propiedades antiinflamatorias al producto final, hace que se pueda considerar como un método ecoamigable.

Las nanopartículas se pueden obtener por métodos ya sean químicos o biológicos con diferentes ventajas y desventajas, sin embargo los estudios para la biosíntesis van en aumento y de esta manera se puede lograr mejorar las metodologías para obtener intervalos de tamaño homogéneos. (13).

Además de esto, la biosíntesis tiene la ventaja de que dependiendo el agente natural que se utilice para la reducción, el material en donde se van a depositar las nanopartículas le confiere las propiedades de esté.

1.5 BIOREDUCTORES

Para este proyecto se buscó un bioreductor con propiedades antiinflamatorias por lo que se decidió utilizar la planta *Heterotheca inuloides* conocida como árnica mexicana utilizada desde hace mucho tiempo por sus propiedades para el tratamiento de contusiones, moretones así como heridas en la piel, y también un bioreductor con propiedades cicatrizantes la cual es la planta medicinal *Aloe vera*, a continuación se realiza una descripción de estas plantas.

1.5.1 *Heterotheca inuloides*

En la tabla 1 se presenta la clasificación taxonómica del *Heterotheca inuloides*

Reino	<i>Plantae</i>
Subreino	<i>Traqueobionta</i> (plantas vasculares)
Superdivisión	Spermatophyta (plantas con semillas)
División	<i>Magnoliophyta</i> (plantas con flor)
Clase	<i>Magnoliopsida</i> (dicotiledóneas)
Subclase	<i>Asteridae</i>
Orden	<i>Asterales</i>

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Heterotheca inuloides*

Descripción técnica

Habito y forma de vida: Planta herbácea perenne o quizás a veces anual, a menudo floreciendo en su primer año

Tamaño: Generalmente entre 50 y 70 cm puede llegar hasta 1.2m de alto

Tallo: Erecto, generalmente no muy ramificado debajo de la inflorescencia, estirado, con pubescencia piloso-hispida, de ± 2 mm de largo, además de otros pelos mucho mas cortos, que incluyen pelos glandulosos

Hojas: inferiores sobre pecíolos de 2 a 8 cm de largo, generalmente ensanchadas en la base, limbo ovado a lanceolado, de 3 a 10 cm de largo, de 1 a 3.5 cm de ancho, ápice agudo a obtuso, margen entero a profundamente aserrado, con pubescencia similar a la del tallo, hojas de la parte media y superior sésiles, reduciéndose paulatinamente de tamaño, a veces oblongas u oblanceoladas.

Inflorescencia: Bien desarrollada en conjuntos coribiformes

Cabezuela/flores: Cabazuelas sobre pedúnculos de hasta 8 cm de largo, provistos por lo general de numerosos pelos glandulosos, de 2-4 cm de diámetro, sus brácteas alrededor de 80mm, lineares a subuladas, las interiores de 9 a 13 mm de largo con pubescencia similar a la del tallo y pedúnculos.

Flores liguladas: de 25 a 40 mm sus laminas oblongas, de 8 a 15 mm de largo

Flores del disco: de 40 a 150 y sus corolas de de 4 a 7 mm de largo

Frutos y semillas: Aquenios de las flores liguladas triquetos, de 2 a 4 mm de largo, glabros o poco pubescentes, vilano o ausente o en forma de corona; aquenios de las flores del disco obovados a oblanceolados, de 2 a 5 mm de largo, seríceos, cerdas interiores del vilano de 4 a 7 mm de largo, blanquecinas o rojizas, cerdas o escamitas exteriores de 0.3 a 0.6 mm de largo

Raíz: pivotante

Los principales compuestos extraídos con acetona y metanol caracterizados por RMN se presentan en la tabla 2

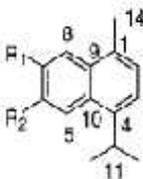
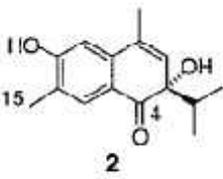
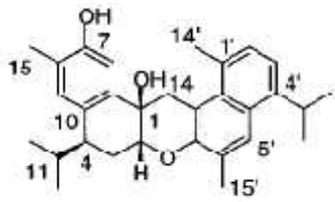
Principales compuestos del árnica extraídos con acetona y metanol caracterizados por RMN	
	$C_{15}H_{16}O_2$ ácido 4-isopropil-1-metilnaftalen-15-oico
	$C_{15}H_{18}O_3$ 3,7-dihydroxi-3(4H)-isocadalen-4-ona
	$C_{30}H_{36}O_3$ dicadalenol

Tabla 2. Compuestos responsables de la actividad antiinflamatoria del *Hetherotheca inuloides*

Se han hecho estudios donde tres de los diferentes componentes de la *Hetherotheca inuloides* fueron encontrados de la aeriola de la planta, y muestran actividad antiinflamatoria de forma puntual, correlacionado con el uso habitual de esta planta. (27)

1.5.2 Aloe vera:

En la tabla 3 se presenta la clasificación taxonómica del *Aloe vera*

Reino	<i>Plantae</i>
División	Magnoliophyta
Clase	<i>Liliopsida</i>
Subclase	<i>Liliidae</i>
Orden	<i>Asparagales</i>
Familia	<i>Xanthorrhoeaceae</i>
<i>Subfamilia</i>	<i>Asphodeloideae</i>
Genero	<i>Aloe</i>
Especie	<i>A. vera</i>

Tabla 3. Clasificación taxonómica de *Aloe vera*

1.6 PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS

Para efectuar el estudio de los microorganismos, se han diseñado diversos métodos que permiten cultivarlos bajo condiciones artificiales, y manejar un solo tipo de microorganismo. Una de las técnicas más usadas en el laboratorio de microbiología consiste en transferir una muestra microbiológica de un ambiente determinado a un medio de cultivo, lo que permite obtener cultivos microbianos (8)

Cultivar un microorganismo significa promover intencionalmente el desarrollo de éste en medios de cultivo y condiciones de laboratorio controladas. La población de microorganismos desarrollada en un medio se denomina cultivo.

Cuando éste contiene una sola especie de microorganismo, se denomina cultivo puro o axénico. El segundo paso para obtener un cultivo axénico es inocular o introducir, una sola célula de un microorganismo en un medio sólido o líquido previamente esterilizado. De esta manera, se aísla un sólo microorganismo del resto y se podrá multiplicar en condiciones favorables. Un clon está constituido por una población de células descendientes de un solo microorganismo. Una colonia es un clon lo suficientemente grande como para ser visible sobre la superficie de un medio sólido.

Para el desarrollo de las pruebas microbiológicas de este proyecto se tomaron dos bacterias una gram positivo y una gram negativo, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, que son 2 de los microorganismos más representativos y más frecuentemente utilizados para este tipo de estudios. (14)

1.6.1 *Escherichia coli*

Se trata de una enterobacteria que se encuentra generalmente en los intestinos animales, y por ende en las aguas negras, pero se le puede encontrar en todos lados, dado que es un organismo ubicuo. Fue descrita por primera vez en 1885 por Theodore Von Escherich, bacteriologo alemán, quien la denominó *Bacterium coli*. Posteriormente la taxonomía le adjudicó el nombre de *Escherichia coli*, en honor a su descubridor, en la tabla 4 se da la clasificación taxonómica de la *E.Coli*

Reino	<i>Bacteria</i>
Filo	<i>Proteobacteria</i>
Clase	<i>Gammaproteobacteriana</i>
Familia	: <i>Enterobacteriaceae</i>
Género	<i>Escherichia</i>
Especie	<i>E. coli</i>

Tabla 4. Clasificación taxonómica de la *E. coli*

1.6.2 *Staphylococcus aureus*

Es una bacteria anaerobia facultativa, gram positiva, productora de Coagulasa, catalasa, inmóvil y no esporulada que se encuentra ampliamente distribuida por todo el mundo, estimándose que en una de cada tres personas se hallan colonizadas, que no infectadas, por ella.

Puede producir una amplia gama de enfermedades, que van desde infecciones cutáneas y de las mucosas relativamente benignas, tales como foliculitis, forunculosis o conjuntivitis, hasta enfermedades de riesgo vital, como celulitis, abscesos profundos, osteomielitis, meningitis, sepsis, endocarditis o neumonía. Además, también puede afectar al aparato gastrointestinal, ya sea por presencia física de *Staphylococcus aureus* o por la ingesta de la enterotoxina estafilocócica secretada por la bacteria.

En la actualidad, este microorganismo se encuentra como el principal causante de las infecciones nosocomiales. Esta situación se ve favorecida por el hecho de que esta especie habita tanto en las mucosas como en la piel de los seres humanos, lo que permite que a través de las heridas quirúrgicas pueda penetrar en el torrente sanguíneo del paciente por medio del contacto directo o indirecto con el personal sanitario, con un objeto contaminado o incluso con otro paciente

Las cepas habituales de *Staphylococcus aureus* son resistentes a la penicilina, dejando como los antibióticos más eficaces para combatirlos a los aminoglucósidos, las cefalosporinas, la oxacilina o la nafcilina. Además de la administración del tratamiento antimicrobiano correspondiente, puede ser conveniente, en función del caso, la

eliminación de puertas de entradas, como catéteres venosos permanentes o drenajes quirúrgicos, en la tabla 5 se presenta la clasificación taxonómica del *S.aureus*

Reino	<i>Bacteria</i>
Filo	<i>Firmicutes</i>
Clase	<i>Bacili</i>
Orden	<i>Bacillales</i>
Familia	<i>Staphylococcaceae</i>
Genero	<i>Staphylococcus</i>
Especie	<i>S. aureus</i>

Tabla 5. Clasificación taxonómica de *S. aureus*

1.7 HILOS DE SUTURA

Una de las aplicaciones potenciales de la nanotecnología por su importancia en la vida es la medicina y en este caso nos enfocaremos al hilo de sutura. La palabra sutura describe cualquier hilo de material utilizado para ligar los vasos sanguíneos o aproximar (“coser”) los tejidos. El propósito de una sutura es sostener en aposición (juntos) los bordes de una herida hasta que el proceso natural de cicatrización esté suficientemente bien establecido para hacer que el soporte de la sutura sea innecesario y redundante. (16)

A lo largo de los años se han utilizado diferentes tipos de materiales como hilos de sutura, desde tendones de animales, ácido poliglicólico, polímeros inorgánicos, seda y catgut entre otros, todos ellos con sus

ventajas y desventajas, estos se dividen por varios criterios y las formas de clasificación se presentan en la tabla 6 y figura 1:

DE ACUERDO CON SU ABSORCIÓN	DE ACUERDO CON SU ORIGEN	DE ACUERDO CON EL NÚMERO DE HEBRAS
Absorbibles No absorbibles	Naturales Sintéticas	Monofilamento Multifilamento

Tabla 6. Clasificación de los materiales de sutura



Figura 1. Clasificación de hilos de sutura por el número de hebras

Las suturas monofilamento encuentran menos resistencia al pasar a través del tejido, lo que las hace adecuadas, por ejemplo, para la cirugía vascular. Deben manejarse con sumo cuidado, ya que si se comprimen o aprietan, puede crearse una muesca o un punto débil en la sutura que resulta en la ruptura de la misma.

Las suturas multifilamento construidas por varios filamentos torcidos o trenzados juntos, proporcionan mayor fuerza de tensión y

flexibilidad. También pueden venir recubiertas para facilitar el paso suave a través del tejido y el manejo de la misma. Las suturas multifilamento son adecuadas para procedimientos intestinales.

Las absorbibles se degradarán en el organismo sin intervención externa mientras que las no absorbibles deben ser removidas manualmente a menos que sea la intención dejarlas indefinidamente en el organismo (15), ver tabla 7.

MATERIALES PARA HILO DE SUTURA	
Absorbibles	No absorbibles
Tripa de gato quirúrgico	Seda quirúrgica
Poliglactina 910	Algodón
Acido poliglicólico	Acero inoxidable quirúrgico
Polidioxanona	Nylon (poliamida)
Poliglecaprone 25	Poliéster
Poligliconato	Polipropileno
Monoderm	

Tabla 7. Ejemplos de materiales de sutura absorbibles y no absorbibles

Existen ciertas características o requerimientos de un hilo de sutura para que sea útil y funcional a continuación se presenta un listado con las cualidades de un hilo de sutura ideal (17)

- Debe tener la mayor fuerza de tensión compatible con las limitaciones del calibre.
- Debe ser fácil de manejar y requerir un mínimo de fuerza para introducirla en el tejido.

- Debe estar asegurada en el empaque que se presenta para su uso estéril y en excelente estado.
- La integridad y fuerza de la hebra debe permanecer intacta hasta llegar a las manos del cirujano.
- Debe ser adecuado para todos los propósitos.
- Debe ser no electrolítico, no capilar, no ferromagnético, no alergénico y no carcinogénico.
- Debe causar mínima reacción tisular y sin propensión al crecimiento bacteriano.
- Debe ser capaz de resistir cuando se anuda sin deshilacharse o cortarse (flexibilidad).
- Debe ser resistente al encogimiento de los tejidos.
- Debe ser absorbible y con mínima reacción tisular después de cumplir su propósito.
- Debe tener un comportamiento predecible.
- Debe tener un calibre uniforme y no deshilacharse al hacer los nudos

Conociendo estas cualidades se puede buscar el cumplimiento de todas o la mayoría de ellas, para así poder obtener un hilo de sutura que sea funcional y sirva como una aportación a la medicina.

Para este proyecto se van a evaluar dos hilos de sutura, uno compuesto de fibras de *Agave lechuguilla* (monofilamento) y un hilo de sutura comercial de seda (multifilamento)

1.7.1 Fibras de *Agave lechuguilla*

La planta de *Agave lechuguilla* forma una roseta de hojas suculentas de hasta 45 cm de altura y 60 cm de ancho. Las hojas, llamadas “pencas”, son fuertes y rígidas, con puntas endurecidas y muy afiladas, las cuales fácilmente pueden penetrar la ropa e incluso la piel. Esta florece una vez en la vida antes de morir. Las flores son de color amarillo con tinte rojizo y se encuentran en una inflorescencia que alcanza los 4 m de altura. El néctar de las flores es un gran nutriente en la dieta de insectos, murciélagos y algunas aves.

Los nativos habitantes de esas regiones utilizan las fibras (comúnmente llamadas “ixtle”, aunque una variedad dura es conocida con el nombre comercial de “fibra Tampico”) de las pencas para confeccionar cuerdas, tapetes y como materia prima para la industria de las brochas y cepillos, gracias a sus propiedades mecánicas y facilidad de manejo de las fibras. (20)

1.7.2 Fibras de seda

La seda es una fibra natural formada por proteínas. Aunque es producida por varios grupos de insectos, en la actualidad sólo la seda obtenida de las larvas de *Bombyx mori* se emplea en la fabricación industrial textil, Las fibras de seda tienen una sección transversal triangular con esquinas redondeadas, esto refleja la luz a diferentes ángulos, dando a la seda un brillo natural. Tiene una textura suave y lisa, no resbaladiza, a diferencia de las sintéticas. La seda es una de las fibras naturales más fuertes, pero pierde hasta el 20% de su fuerza cuando está húmeda, tiene una buena capacidad de recuperarse de la humedad, de alrededor de un 11%. Su elasticidad va desde moderada a

pobre. La fibroína de la seda está compuesta por la unión de los aminoácidos glicina, alanina y serina en la estructura GLY-SER-GLY-ALA-GLY y forma Beta-láminas (28).

La alta proporción de glicina, que es uno de los aminoácidos de molécula más reducida, permite un empaado firme gracias al cual las fibras se hacen fuertes y resistentes al estiramiento. La resistencia a la tensión es debida a los enlaces covalentes peptídicos. Dado que la proteína toma la forma de una Beta-lámina, cuando el tejido se estira la fuerza se transmite a estos fuertes lazos y de esta manera la fibra no se rompe. (29)

El desarrollo de materiales nanocompuestos orgánico-inorgánico que se utilizan para la inmovilización de biomoléculas de nanopartículas inorgánicas ha estado recibiendo cada vez más atención en bioingeniería y ciencia de materiales. Entre una gran variedad de biomoléculas, la fibroína de seda ha sido reconocida recientemente como un atractivo molde para la síntesis de estructuras inorgánicas a tamaños nanométricos y micrométricos, debido a una combinación única de biocompatibilidad, biodegradabilidad, y excelentes propiedades mecánicas tales como la resistencia a la tracción, alta elasticidad y excepcional tenacidad (30). Diferentes materiales inorgánicos tales como sílice, óxido de titanio, óxido de circonio, magnetita, apatita, y nanopartículas de metales han sido depositados o crecido sobre o dentro de las matrices de seda para mejorar propiedades mecánicas y ópticas (31).

Materiales de seda a base de nanopartículas metálicas incorporadas son de especial interés ya que los nanocompuestos se han utilizado en una variedad de aplicaciones tales como aplicaciones biomédicas, recubrimientos antibacterianos, sensores de película delgada, y dispositivos de "memoria" plástica.

2 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

2.1 Espectroscopia UV-Vis

Esta técnica se basa principalmente, en la absorción de luz visible y ultravioleta de un material a una longitud de onda específica o en un intervalo de longitudes de onda que se pueden relacionar en forma cuantitativa o cualitativa con un espécimen.

Un fotómetro es un instrumento utilizado para medir la transmitancia de muestras líquidas o sólidas con un haz seleccionado con un filtro de radiación. Los métodos cuantitativos basados en la absorción requieren dos medidas de intensidad, una antes de que el haz haya pasado a través del medio (I_0), y la otra después (I). La transmitancia y la absorbancia son los términos que se utilizan ampliamente en la espectrometría de absorción y se relacionan por la razón I_0 y I . La transmitancia T del medio es la fracción de radiación incidente transmitida por el medio:

$$T = \frac{I}{I_0}$$

Por otra parte, la absorbancia A de un medio se define por la ecuación:

$$A = -\log_{10} T = -\log_{10} \frac{I}{I_0}$$

Debe de tomarse en cuenta que, al contrario que con la transmitancia, la absorbancia de un medio aumenta cuando la atenuación del haz incrementa.

2.1.1 Plasmón superficial de nanopartículas metálicas

El plasmón superficial es la excitación de todos los electrones libres en la banda de conducción que produce una oscilación dipolar colectiva de los electrones. El campo eléctrico de los fotones induce una polarización de los electrones de conducción con respecto a los cationes de la nanopartícula metálica, de esta manera se crea una diferencia de carga neta en la superficie que actúa como una fuerza restauradora, que proporciona información sobre el grado de agregación del cúmulo, la forma y tamaño de las nanopartículas.

Generalmente, la longitud de onda máximo de absorción varía con el tamaño y la forma de las partículas. La banda de plasmón superficial es sensible a los cambios en la composición de la partícula y a la presencia de moléculas adsorbidas.

Para probar el efecto reductor del árnica se realizó un estudio por UV-Vis de las nanopartículas de plata generadas en medio acuoso para lo cual se preparó en proporción 1:1 una solución de AgNO_3 10^{-3} M y del extracto acuoso de *Hetherothecainuloides*. Se utilizó una celda de cuarzo, con un barrido de 300 a 500 nm y el equipo utilizado fue un espectrofotómetro Hach DR 500.

2.1.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

La microscopia electrónica es una técnica muy importante en el análisis morfológico de materiales de diversa índole. Esta técnica permite llegar a resoluciones mayores que la microscopía óptica. Esto se debe a que la longitud de onda de los electrones acelerados es mucho más pequeña que la longitud de onda de los fotones de la región visible del espectro lo cual implica una mayor resolución para las

imágenes electrónicas. El principio de esta técnica se basa en el bombardeo de una muestra con un haz de electrones y cuyas distintas señales producidas (Figuras 2 y 3) son recolectadas por detectores apropiados.

Diseño de un microscopio electrónico de barrido

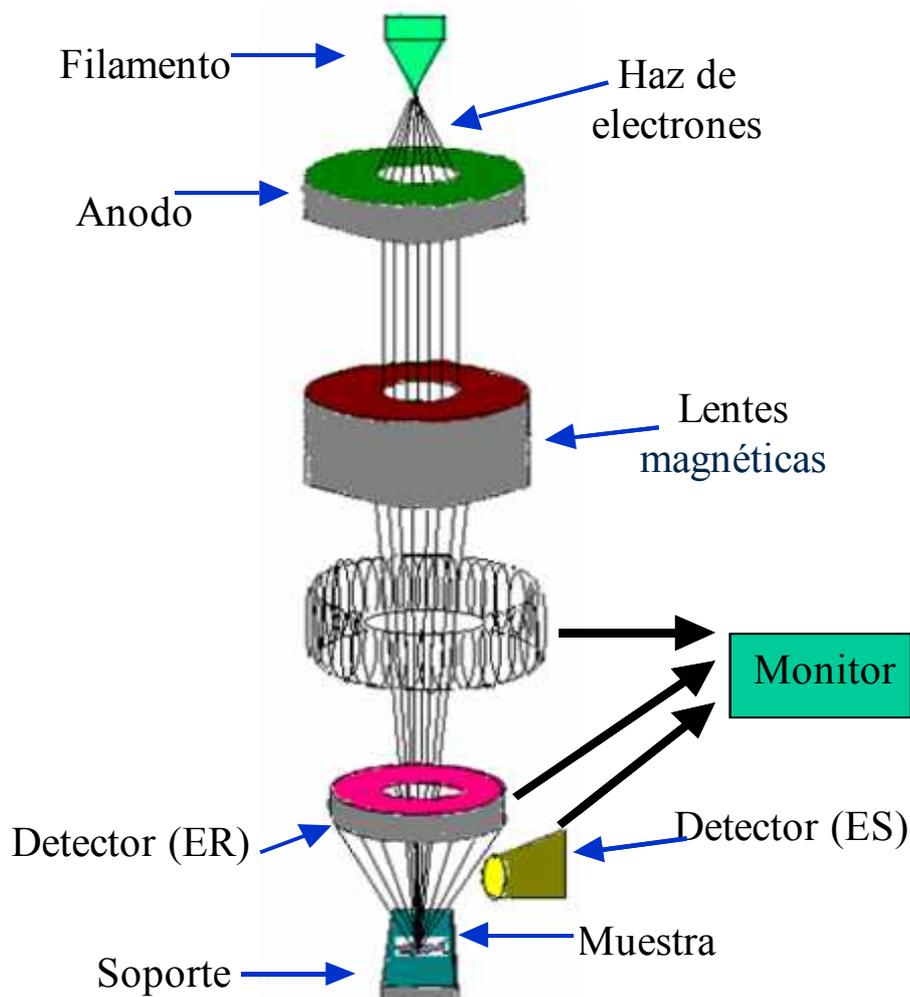


Figura 2. Esquema de un microscopio electrónico de barrido

Filamento: emite los electrones que chocan o atraviesan la muestra y éstos pueden ser producidos por efecto termiónico o emisión de campo.

Lentes electromagnéticos: crean campos magnéticos que dirigen y enfocan el haz de electrones hacia la muestra.

Detectores: están compuestos por tres detectores que se clasifican en imágenes de electrones secundarios, electrones de retrodispersión y analizador EDS de rayos x característicos instalados dentro de la cámara de vacío.

Soporte y muestra: la preparación de la muestra es relativamente sencilla. Sólo se debe tener las siguientes características:

- Tamaño adecuado para introducirse en la cámara.
- Que no muestre presencia de humedad
- Que sea eléctricamente conductora. Este requisito se cumple en los metales pero no así en otro tipo de materiales, por lo que para hacer a la muestra conductora se la recubre de una capa de algún material conductor tal como el carbón o el oro.

Interacción del haz con la muestra

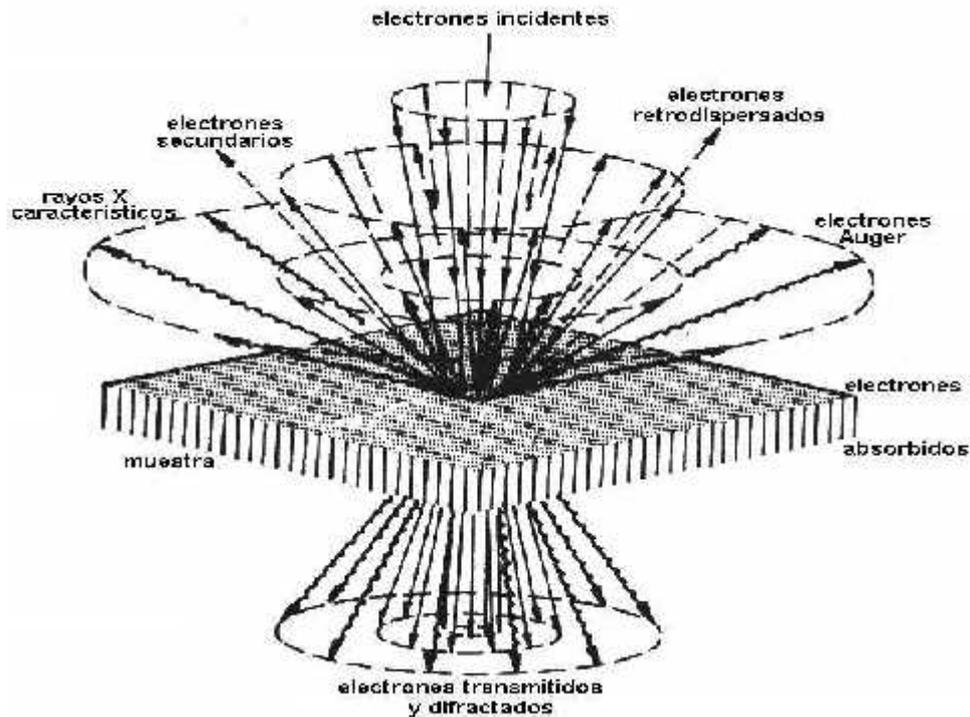


Figura 3. Posibles señales emitidas por una muestra al ser irradiada por un haz de electrones

Rayos X característicos

Los rayos X característicos son el resultado de la transición de los electrones excitados por el haz primario que al regresar a su estado base o de mínima energía, cada uno de los elementos emite rayos X característicos del átomo de donde son producidos.

Electrones Auger

Es un fenómeno físico en el cual la desaparición de un electrón interno de un átomo causa la emisión de un segundo electrón. El segundo electrón emitido es llamado electrón Auger. (26)

Para formación de imágenes en el microscopio de barrido se utilizan dos tipos de electrones: los secundarios y los retrodispersos.

Electrones retrodispersos

Como se comentó anteriormente, la señal de electrones retrodispersos (BSE backscatteringelectron) provienen de dispersiones elásticas. Una fracción de los electrones incidentes al penetrar en una superficie plana son expulsados a través de la misma superficie. La retrodispersión en muestras sólidos muestran principalmente el efecto de dispersión múltiple, sin embargo una pequeña fracción de los BSE provienen del evento de dispersión de gran ángulo, resultando una fracción significativa de la corriente en el haz incidente que llega a ser dispersada hacia fuera de la muestra y se puede cuantificar mediante el coeficiente de retrodispersión:

$$\eta = \frac{n_{BSE}}{n_B} = \frac{i_{BSE}}{i_B}$$

Donde, n_B , número de electrones del haz incidente.

n_{BSE} , número de electrones retrodispersos.

i_B , corriente del haz incidente

i_{BSE} , corriente de los electrones retrodispersos que viajan hacia afuera de la muestra.

Los BSE ofrecen una señal muy útil en el SEM. Éstos responden a la composición elemental de la muestra (contraste por número atómico), superficial local (topografía o contraste de la forma), cristalografía (conducción de electrones), y campos magnéticos internos (contraste magnético). Estos electrones eliminan una cantidad significativa de la energía total del haz primario el cuál podría contribuir a la producción de radiación secundaria que da pie a poder medir rayos X

característicos en análisis cuantitativos de microanálisis. El conocimiento de estas propiedades es necesario para una apropiada interpretación de las imágenes y un procedimiento correcto de interpretación del microanálisis.

Electrones secundarios

Los electrones secundarios (SE) son producidos principalmente como resultado de interacciones entre un haz de electrones energético y un enlace débil de electrones de en la banda de conducción de metales, o electrones de valencia de las capas externas en semiconductores y aislantes. Dada la gran diferencia en energía entre el haz de electrones y los electrones de la muestra solo una pequeña cantidad de energía cinética puede ser transferida eficientemente y producir SE.

La selección de 50 eV como el límite superior es conservador dada la distribución en la cual el 90% de SE son emitidos con una energía menor a 10eV. Comparados con el comportamiento de los BSE los cuales incrementan su coeficiente casi monotónicamente con el número atómico de la muestra, el coeficiente de SE para una fuente de elemento puro es relativamente insensible al número atómico

Los SE son generados a través de la interacción del haz principal con el volumen de interacción de la muestra, pero sólo aquellos generados dentro de la distancia de escape promedio llevan la información detectada por el microscopista. Aquellos SE observables pueden ser formados por 2 procesos distintos (Figura 4).

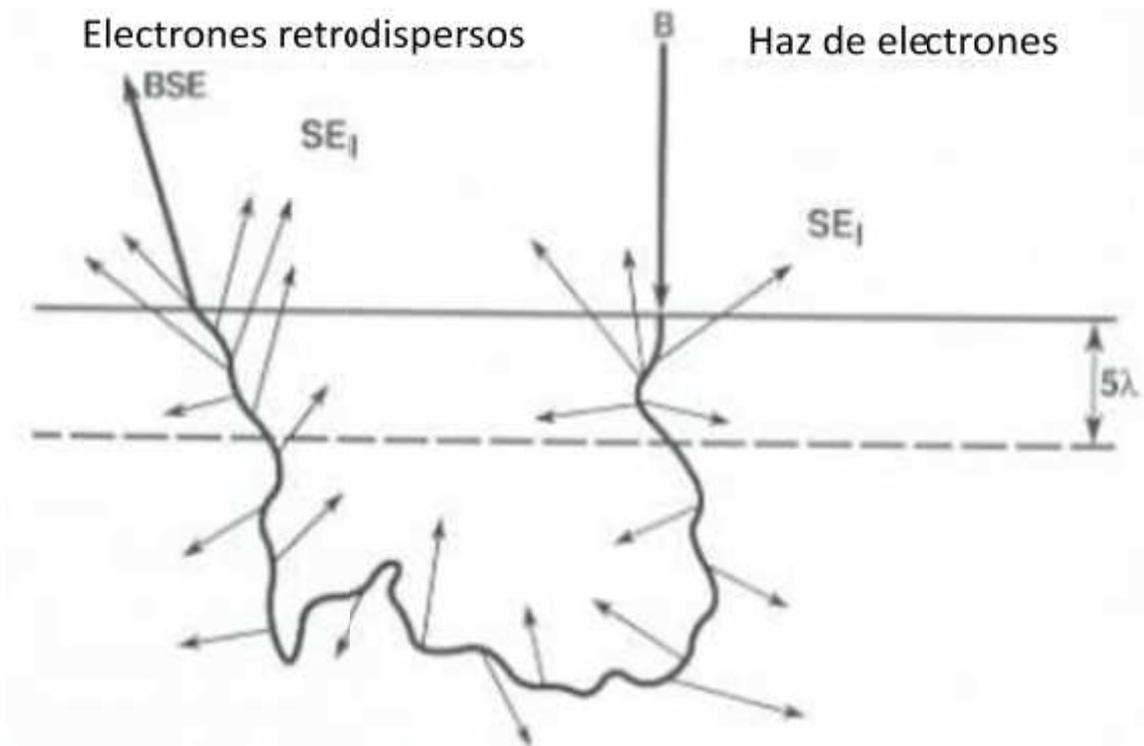


Figura 4. Diagrama de producción de electrones secundarios

1. Cuando el haz de electrones incidentes atraviesa la superficie de la muestra se generan SE observables si están dentro de una profundidad 5λ (λ es la longitud de onda del haz de electrones). En la nomenclatura de Drescher (1970), este tipo de SE provenientes de esta profundidad 5λ son designados como SE_I. Esta es una señal de alta resolución y la información de la superficie más cercana.

2. Como un haz de electrones se dispersa dentro de la muestra y se aproxima a la superficie para emerger como electrones retrodispersados, los SE generados en el espesor de 5λ también pueden emerger. Pero aquellos SE formados por la existencia de BSE son designados como SE_{II}.

Dado que los SE_{II} son una señal a consecuencia de los BSE y todo cambio en SE_{II} responde a los cambios de BSE ésta es una señal de baja resolución. Por lo que SE_I y SE_{II} son señales con información diferente.

2.1.2.1 ESPECTROMETRÍA DE DISPERSION DE ENERGIA DE RAYOS X (EDS)

Al interaccionar el haz de electrones incidente con los átomos del material, puede incluso arrancar electrones (secundarios) de las capas electrónicas internas de los átomos, ionizándolos y por ende dejándolos en un estado excitado.

Para regresar al estado base o de mínima energía, un electrón de una capa externa ocupara la vacancia, emitiéndose el remanente de energía en forma de un rayo X característico o un electrón Auger.

Para esto tenemos que entender el volumen de interacción, que está directamente relacionado con el voltaje de aceleración y la muestra utilizada, para esto utilizaremos las siguientes imágenes (Figura 5).

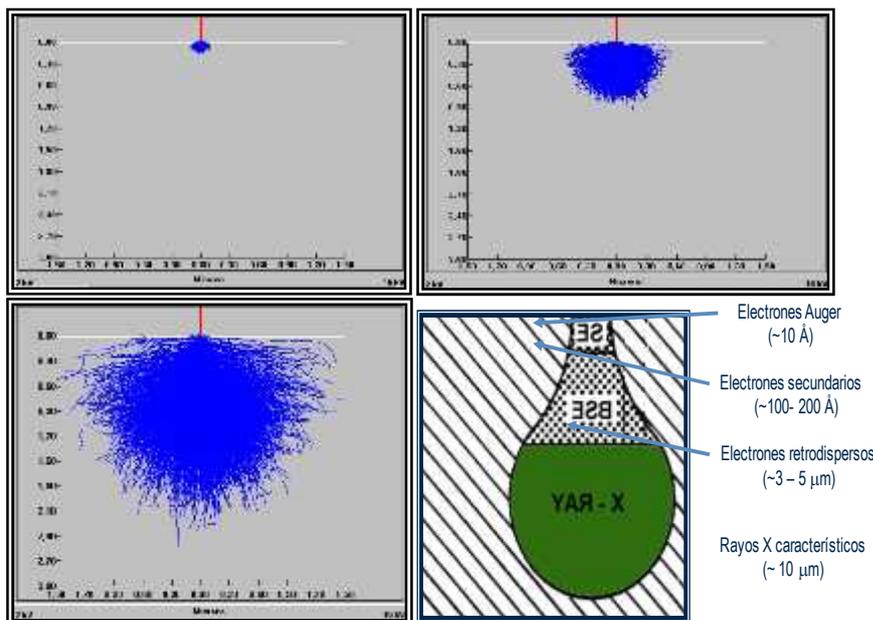


Figura 5. Profundidad de emisión de Rayos X con respecto al voltaje de aceleración de electrones

El mecanismo de detección consiste principalmente de un detector de Si (Li) montado en tubo enfriado con N₂ líquido (dedo frío), la electrónica asociada al detector, una analizador multicanal y procesador de datos (Figura 6).

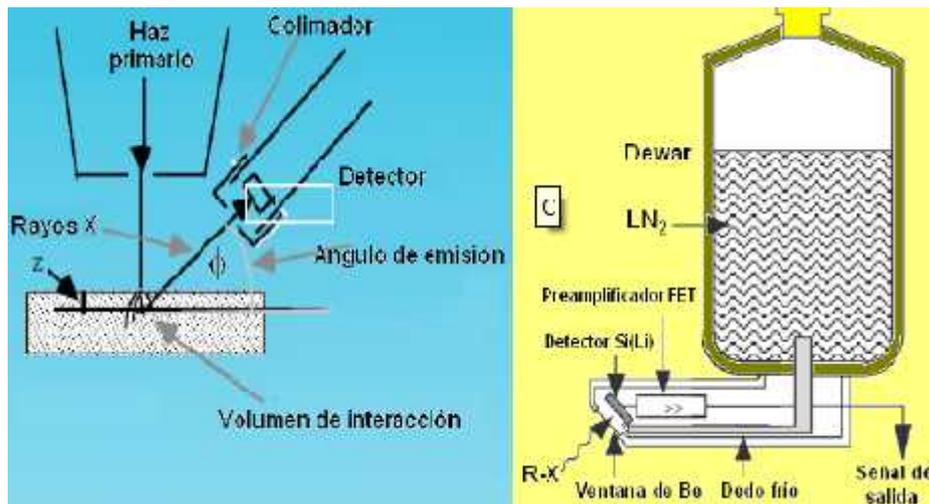


Figura 6. Detector de Rayos X en EDS

2.1.2.2 Condiciones del análisis por SEM y EDS

Las muestras fueron recubiertas de oro en una máquina de sputtering DENTON VACUM DESK IV por 60 s A 30 mtorr y a 40 % intensidad del plasma. Con esto se cumplió el requerimiento de que la muestra debe ser conductora para microscopia electrónica. Se utilizó un voltaje de aceleración de 20kV, una distancia de trabajo de 10mm y la señal de electrones secundarios para obtener las micrografías.

2.1.3 Microscopia electrónica de transmisión

Al igual que la microscopia electrónica de barrido esta técnica se basa en el bombardeo de una muestra con un haz de electrones, pero en este caso la muestra es atravesada por algunos electrones produciendo diferentes tipos de interacciones y señales. Los electrones difractados y transmitidos forman imágenes generando información sobre la estructura de la muestra. Finalmente, las señales son recolectadas por detectores apropiados.

Lo característico de este microscopio es el uso de una muestra ultra fina (100 nm) y que la imagen se obtiene de los electrones que atravesaron la muestra. Ahora bien, en un microscopio electrónico de transmisión, los electrones de una fuente de electrones entran en la muestra, se dispersan al pasar a través de ella y se enfocan con un lente objetivo, se amplifican mediante un proyector y finalmente se produce la imagen deseada; a continuación se muestra como está estructurado un microscopio electrónico de transmisión (Figura 7).

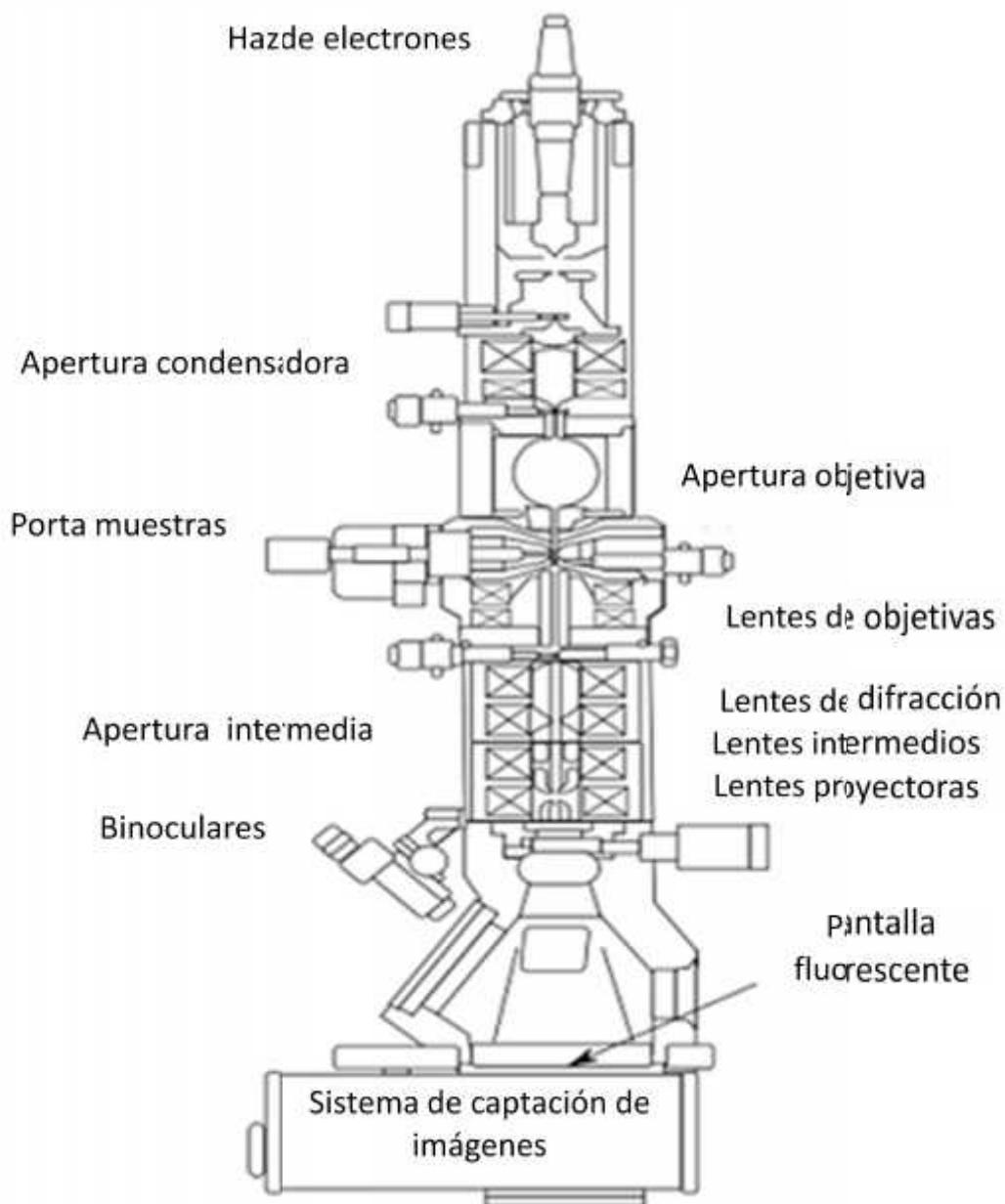


Figura 7. Esquema del microscopio electrónico de transmisión

Sus componentes principales son:

- **Cañón de electrones:** emite los electrones que chocan o atraviesan la muestra
- **Lentes magnéticas:** crea campos que dirigen y enfocan el haz de electrones

- **Sistema de vacío:** este es indispensable en el microscopio electrónico de transmisión, ya que de no ser lo suficientemente alto los electrones pueden ser desviados por las moléculas de aire
- **Placa fotográfica o pantalla fluorescente:** la cual se coloca detrás de la muestra para poder observar la imagen aumentada con el ojo humano
- **Sistema de registro:** muestra la imagen producida por los electrones, que generalmente es una cámara digital acoplada a una computadora.

Obtención de imágenes en campo claro.

Existen diferentes modos de formación de la imagen en un microscopio de transmisión: si la imagen se forma a partir del haz transmitido, que no ha sufrido dispersión, entonces la imagen del objeto es oscura sobre un fondo brillante y se le denomina campo claro y es el modo que se utilizó en este proyecto (Figura 8).

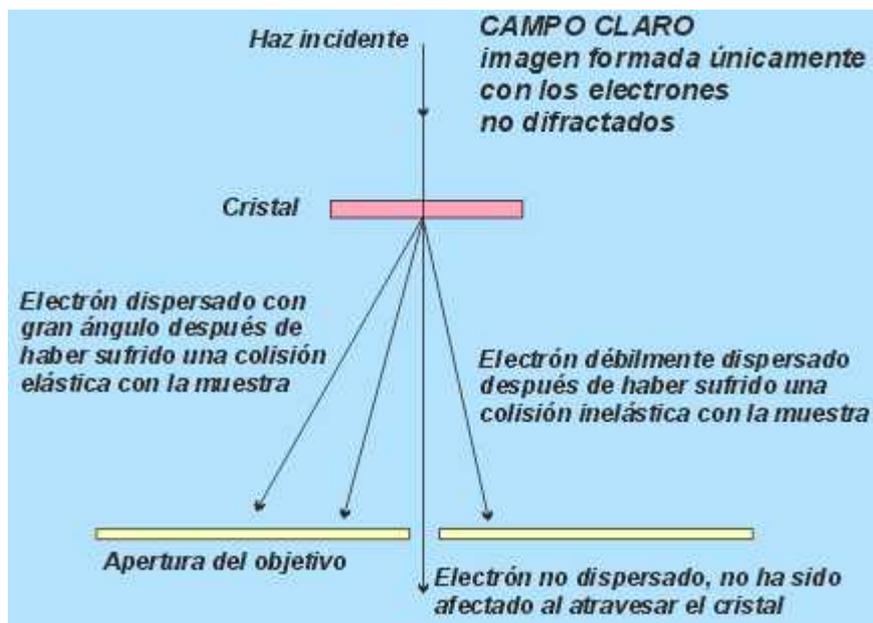


Figura 8. Diferentes haces de electrones que pueden ser detectados por TEM

2.1.3.1 Condiciones de análisis por TEM

Para la preparación de las muestras para el microscopio electrónico de transmisión, se colocó una gota de suspensión coloidal de nanopartículas de plata en alcohol sobre rejillas de cobre recubiertas con una capa de carbono, las nanopartículas metálicas fueron extraídas de las fibras poliméricas, con 4 horas de sonicación en un equipo BRANSONIC Ultra Sonic Cleaner 2510R-MH, posteriormente se dejaron secar para su evaporación, y se analizaron en un microscopio marca JEOL modelo 2010 operado a 200kV de aceleración y utilizando el modo de campo claro.

2.1.4 Pruebas microbiológicas

Para realizar las pruebas microbiológicas se prepararon cajas Petri esterilizadas, con agar semisólido Muller-Hinton, y se realizó una prueba de esterilidad del agar (Figura 9).



Figura 9. Preparación de cajas Petri, con agar Muller-Hinton.

Posteriormente se preparó un inóculo de células “jóvenes” menores a 24 horas a 1.5×10^8 CFU/mL bacterias, midiendo esto comparando con una solución Mcfarland al 0.5 por turbiedad (Figura 10).



Figura 10. Medición por turbiedad de inóculo 1.5×10^8 CFU/mL

Después de esto se realizó la siembra de los microorganismos utilizando el método de cultivo por estrías (Figura 11).

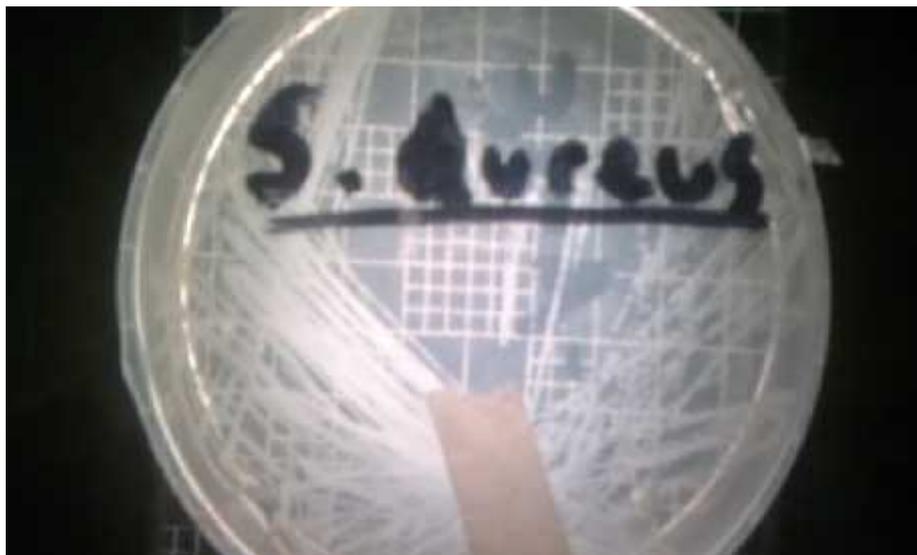


Figura 11. Siembra de *S.Aureus* vía cultivo por estrías

Una vez teniendo la siembra se colocaron las fibras con nanopartículas de plata y se incubaron las cajas Petri por 24 horas para el crecimiento del microorganismo verificando que sea axénico, el crecimiento se monitoreó a las 18 y 24 horas para medir el halo inhibitorio dejado por el composito.

2.1.5 Pruebas de tensión

Fundamentos teóricos

Propiedades mecánicas de los materiales

En ingeniería se necesita saber cómo responden los materiales sólidos a fuerzas externas como la tensión, la compresión, la torsión, la flexión o la cizalladura. Los materiales sólidos responden a dichas fuerzas con una deformación elástica (en la que el material vuelve a su tamaño y forma originales cuando se elimina la fuerza externa), una deformación plástica o permanente o una fractura.

La tensión es una fuerza que tira; por ejemplo, la fuerza que actúa sobre un cable que sostiene un peso. Bajo tensión, un material suele estirarse, y recupera su longitud original si la fuerza no supera el límite elástico del material. Bajo tensiones mayores, el material no vuelve completamente a su forma original, y cuando la fuerza es aún mayor, se produce la ruptura del material.

La elasticidad es la propiedad de un material que le hace recuperar su tamaño y forma original después de ser comprimido o estirado por una fuerza externa. Cuando una fuerza externa actúa sobre un material causa un esfuerzo o tensión en el interior del material que provoca la deformación del mismo. En muchos materiales, entre ellos los metales y

los minerales, la deformación es directamente proporcional al esfuerzo. Esta relación se conoce como ley de Hooke, así llamada en honor del físico británico Robert Hooke, que fue el primero en expresarla. No obstante, si la fuerza externa supera un determinado valor, el material puede quedar deformado permanentemente, y la ley de Hooke ya no es válida. El máximo esfuerzo que un material puede soportar antes de quedar permanentemente deformado se denomina límite de elasticidad.

La relación entre el esfuerzo y la deformación, denominada módulo de elasticidad, así como el límite de elasticidad, están determinados por la estructura molecular del material. La distancia entre las moléculas de un material no sometido a esfuerzo depende de un equilibrio entre las fuerzas moleculares de atracción y repulsión. Cuando se aplica una fuerza externa que crea una tensión en el interior del material, las distancias moleculares cambian y el material se deforma. Si las moléculas están firmemente unidas entre sí, la deformación no será muy grande incluso con un esfuerzo elevado. En cambio, si las moléculas están poco unidas, una tensión relativamente pequeña causará una deformación grande. Por debajo del límite de elasticidad, cuando se deja de aplicar la fuerza, las moléculas vuelven a su posición de equilibrio y el material elástico recupera su forma original. Más allá del límite de elasticidad, la fuerza aplicada separa tanto las moléculas que no pueden volver a su posición de partida, y el material queda permanentemente deformado o se rompe.

2.1.5.1 Condiciones para las pruebas mecánicas

Para preparar las muestras de las fibras para las pruebas mecánicas se cortaron buscando uniformidad de diámetro a lo largo de la fibra. Para poder sujetar las fibras con las mordazas se colocó resina epóxica en cada lado de la fibra (Figura 12).



Figura 12. Resina epóxica utilizada para sujetar las fibras

Se utilizaron 10 muestras por cada una de las diferentes fibras, verificando que estas se rompieran de la parte central de la fibra para poder validar la prueba (Figura 13).



Figura 13. Hilo de seda con nanopartículas de Plata sujetado en prensa

Los parámetros de el experimento fueron de capacidad máxima de 1000 libras, velocidad inicial de 50 mm/s, y se realizó en una maquina universal MTS QTEST/5 (Figura 14).



Figura 14. Fotografía del equipo de pruebas mecánicas MTS QTEST/5

2.1.6 ESPECTROSCOPIA FOTOELECTRONICA DE RAYOS X

La espectroscopia fotoelectronica de rayos X es el método de caracterización de superficies más ampliamente utilizado hoy en día, la popularidad de esta técnica deriva del alto contenido de información que suministra y la flexibilidad para ser utilizada en una gran variedad de muestras. El más básico análisis XPS de una superficie puede proporcionar información cualitativa y cuantitativa de todos los elementos presentes, excepto H y He. Con aplicaciones más sofisticadas de la técnica se obtiene información detallada de la química, organización y morfología de la superficie.

Para conocer la técnica XPS se ha de comprender el efecto fotoeléctrico y de fotoemisión.

Cuando un fotón se encuentra con un átomo puede ocurrir (Figura 15):

- que pueda atravesarlo sin interacción alguna
- que sea dispersado por un electrón de un orbital atómico con lo que ocurre una pérdida de energía.
- que el fotón interaccione con electrón de un orbital atómico con una transferencia total de la energía del fotón hacia el electrón, ocurriendo la emisión del electrón del átomo.

El segundo proceso es conocido como la dispersión Compton puede ser importante en procesos de alta energía, mientras que el tercer proceso resulta ser básico para la técnica XPS. Cuando ningún electrón ha sido emitido por el átomo, se debe a que la energía del fotón es

demasiado baja. Cuando aumentamos gradualmente la energía del fotón se comienza a observar la fotoemisión de electrones del átomo. Una vez superada la frecuencia umbral, el número de electrones emitidos será proporcional a la intensidad de iluminación (mayor número de fotones de alta frecuencia de excitación).

Por otra parte, la energía cinética de los electrones emitidos es linealmente proporcional a la frecuencia de los fotones excitantes, si se utiliza fotones de energía muy superior al umbral, el exceso de energía es transmitido al electrón que se emite. El proceso de fotoemisión resulta ser extremadamente rápido, 10^{-16} s, y su física básica se describe mediante la ecuación de Einstein:

$$E_B = h\nu - KE$$

Donde E_B es la energía de enlace del electrón en el átomo, $h\nu$ es la energía de la fuente de rayos X, y KE es la energía cinética del electrón detectado que es medida por el espectrómetro del XPS. Un electrón cargado negativamente se unirá al átomo por atracción con su núcleo positivo. Cuanto más interno es el electrón, más fuerte será su enlace. La energía de enlace de un electrón variará según el tipo de átomo (valor absoluto de su carga nuclear) y de los átomos que a él se unan (los cuales pueden alterar la distribución electrónica). En el caso de los isótopos, estos poseen distintos número de neutrones pero igual carga nuclear, por tanto no varía la energía de enlace la energía de enlace que se mide por XPS.

Instrumentación

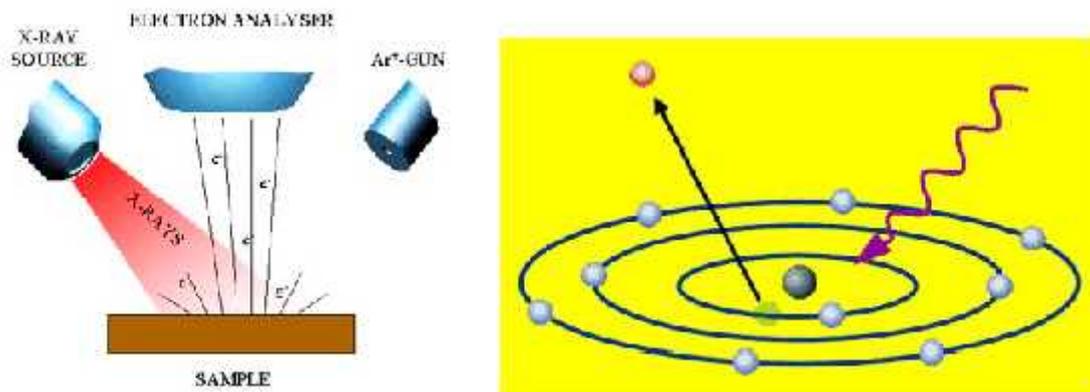


Figura 15. Esquema de producción de fotoelectrones producidos por Rayos X

- Los componentes primarios de un instrumento XPS son el sistema de vacío, la fuente de rayos X, un analizador de energía del electrón y un sistema de datos.
- La parte central del equipo lo constituye la cámara principal de vacío en la que la muestra es analizada, la realización del experimento en condiciones de vacío se debe a:
 - Los fotoelectrones han de viajar desde la muestra hasta el detector sin colisionar con ninguna partícula de fase gaseosa.
 - Algunos componentes tales como la fuente de rayos X requieren condiciones de vacío para mantener la operatividad.

- La composición superficial de la muestra ha de permanecer invariable durante el experimento.
- Las muestras son introducidas en una primera cámara donde se procede a vaciar la atmósfera existente y acercarse a un vacío de 10^6 torr. Alcanzar el ultra-alto vacío es una operación lenta, cuya duración oscila entre varios minutos y horas.
- La colocación de la muestra en el interior de la cámara se realiza mediante una barra unida a un porta muestras. Dentro de la cámara principal, la muestra puede ser orientada en distintas posiciones y se puede elegir la zona de la superficie a trabajar, todo ello es controlado mediante una cámara de vídeo.
- La fuente de rayos X más utilizadas son las que emplean ánodos de Al o Mg, otros ánodos son Si, Zr, Ag, Ti, Cr. La radiación X es monocromatizada antes de llegar a la muestra mediante el uso de un cristal de cuarzo. Esto permite aprovechar el rango de energía en que la intensidad de la radiación X es máxima (normalmente un ancho de 1 – 2 eV), evitar los picos satélites de fluorescencia de rayos X, e impedir que electrones de alta energía provoquen golpes de calor a la muestra y la degraden.
- El área de muestra que puede ser irradiada por los rayos X varía entre zonas circulares de unos pocos centímetros de diámetro hasta unas 50 micras. Esta focalización depende de la geometría de

la fuente y del tipo de cañón de electrones utilizado para estimular la emisión de rayos X.

- La utilización de un monocromador disminuye la intensidad de rayos X que alcanzan a la muestra. Esta disminución en el flujo energético es compensada en el sistema analizador, constituido por lentes eficaces de captación de radiación, un analizador de energía y un sistema detector multicanal.

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1 METODOLOGÍA

Para llevar a cabo el presente proyecto, se siguieron los siguientes pasos experimentales.

- Caracterización de las fibras en su forma original (sin nanopartículas de plata o algún otro tratamiento) por medio de SEM y EDS
- Caracterización de las fibras en su forma original (sin nanopartículas de plata o algún otro tratamiento) por medio de XPS
- Reducción de plata Ag^{+1} a Ag^0 por medio de agentes naturales con propiedades antiinflamatorias y cicatrizantes, utilizando Árnica mexicana.

Las fibras se impregnaron con los iones plata en una solución con la sal del metal por intervalos de tiempo, controlando cada una de las variables, posteriormente se llevó a cabo la reducción en presencia del bioreductor por intervalos de tiempo y finalmente se dejó secar el material, permitiendo la pasivación de las nanopartículas dejándolas listas para su caracterización

VARIABLES A CONTROLAR EN LA SÍNTESIS

- Concentración de la solución precursora (0.01M a .0.0001M)
- Tiempo de inmersión en la solución metálica (15-30 minutos)
- Tiempo de inmersión en el agente reductor (30-60 minutos)

- Concentración del agente reductor (10, 25 , 50 g/100ml)
- Caracterización de las fibras con nanopartículas de plata por medio de SEM y EDS
- Caracterización de las nanopartículas de plata por medio de UV-VIS
- Caracterización de las fibras con nanopartículas de plata por medio de XPS
- Caracterización de las nanopartículas de plata por medio de TEM
- Pruebas microbiológicas de E Coli (Gram -) staphylococcus aureus (Gram+) vaciado en placa, medición del halo inhibitorio en caja petri
- Evaluación de pruebas mecánicas

3.2 MATERIALES Y REACTIVOS

El material de vidrio utilizado tal como vasos de precipitado, matraces Erlenmeyer y aforados así como pipetas, se lavaron previamente con agua corriente y posteriormente con agua desionizada, asimismo, se utilizó un matraz Kitazato y papel filtro Whatman No 5.

La sal metálica utilizada para la síntesis fue AgNO_3 y fue adquirida de la empresa Sigma-Aldrich, con una pureza de 99.999%

Para realizar la infusión de *hetherothecainuloidesse* adquirieron sobres de té preparados de la marca Anáhuac de 1 g cada uno, con una pureza del 99.0%

Las fibras de *agave lechuguilla* fueron obtenidas del sur del Estado de México, estas, trabajadas de manera artesanal. Se llevó a ebullición en agua para quitar impurezas y lignina, posteriormente se cortaron buscando un diámetro uniforme a lo largo de la fibra, posteriormente se trata con una solución de azul de metileno con la finalidad de suavizar las fibras. Este tratamiento consiste en llevar a ebullición una solución de azul de metileno al 0.1 % de concentración durante 5 minutos.

En cuanto a las fibras de seda se utilizaron hilos de sutura comerciales de la marca Atramat, regular diámetro 3-0 negra, trenzada y siliconizada de 75 cm de largo.

3.3 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA SOBRE FIBRAS DE AGAVE LECHUGUILLA E HILO DE SEDA CON *HETHEROTHECA INULOIDES*

3.3.1 Impregnación de iones de plata en las fibras

Se preparó una solución de AgNO_3 a una concentración de 1×10^{-3} M con agua desionizada, se colocaron las fibras en dicha solución por 30 minutos, posteriormente se retiraron y se secaron.

3.3.2 Obtención de nanopartículas por reducción in situ

Se utilizó 1g de árnica por cada 100 ml de agua desionizada, se llevó a ebullición por 10 minutos, se filtró con un matraz Kitazato, embudo Buchner y papel filtro Whatman No 5, y se colocaron las fibras previamente impregnadas con iones de plata por 10 minutos a temperatura ambiente, cumplido este tiempo se retiraron de la solución reductora y se dejaron secar para ser caracterizadas

• **NANO - Co-Author Notification - [EMID:f4c66d877fcdc101]**

Journal of Nanoparticle Research (NANO) (supriya.nair@springer.com)

[Agregar a contactos](#)

29/05/2013

Para: ALDO LOPEZFUENTES RUIZ ADRIAN LOPEZFUENTES RUIZ



De: **em.nano.0.336bde.e3aa8bfe@editorialmanager.com** en nombre de **Journal of Nanoparticle Research (NANO)** (supriya.nair@springer.com)

Enviado:miércoles, 29 de mayo de 2013 02:20:36 p.m.

Para: ALDO LOPEZFUENTES RUIZ ADRIAN LOPEZFUENTES RUIZ (adrianrock87@hotmail.com)

Re: "Nanocomposite of Agave lechuguilla natural fibers bearing silver nanoparticles formed by bio-reduction with Heterotheca inuloides aqueous solution and its antibacterial properties"

Full author list: ALDO LOPEZFUENTES RUIZ ADRIAN LOPEZFUENTES RUIZ; RAÚL ALBERTO MORALES LUCKIE, Dr.; OSCAR FERNANDO OLEA-MEJIA, Dr.; Witold Brostow Brostow, Ph. D.; Victor Sanchez-Mendieta, Dr.

Dear Ing. ALDO LOPEZFUENTES RUIZ LOPEZFUENTES RUIZ,

We have just received the submission entitled: "Nanocomposite of Agave lechuguilla natural fibers bearing silver nanoparticles formed by bio-reduction with Heterotheca inuloides aqueous solution and its antibacterial properties" for possible publication in Journal of Nanoparticle Research, and you are listed as one of the co-authors.

The manuscript has been submitted to the journal by Dr. Dr. RAÚL ALBERTO MORALES LUCKIE who will be able to track the status of the paper through his/her login.

If you have any objections, please contact the editorial office as soon as possible. If we do not hear back from you, we will assume you agree with your co-authorship.

Thank you very much.

With kind regards,

Springer Journals Editorial Office
Journal of Nanoparticle Research

4. RESULTADOS

4.1 Nanocomposite of *Agave lechuguilla* natural fibers bearing silver nanoparticles formed by bio-reduction with *Heterotheca inuloides* aqueous solution and its antibacterial properties

Aldo Adrián Lopezfuentes-Ruiz,¹ Raúl. A. Morales-Luckie,^{1*} Oscar F. Olea-Mejía,¹
Víctor Sanchez-Mendieta², Witold Brostow³

¹ Universidad Autónoma del Estado de México. Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable UAEM-UNAM, Carretera Toluca-Atlaconulco Km 14.5, San Cayetano, 50200 Toluca, Estado de México, Mexico.

² Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México. Paseo Colón y Paseo Tolloca, Toluca, Estado de México. 50120. México.

³ Laboratory of Advanced Polymers & Optimized Materials (LAPOM), Department of Materials Science and Engineering and Department of Physics, University of North Texas, 1150 Union Circle # 305310, Denton TX

Abstract

Silver nanoparticles were synthesized in situ, using a one-step green methodology with *Heterotheca inuloides* (Mexican arnica) aqueous extract as reducing agent, and supported on a natural fiber material: *Agave lechuguilla*. UV–Vis spectroscopy, X-Ray photoemission spectroscopy and transmission electron microscopy were used to characterize the nanocomposite. Silver nanoparticles with an average size of 20 nm and with low polydispersity were achieved. XPS studies revealed the presence of AgO phase in the nanoparticles obtained by the same method in silk commercial suture thread, unlike, those nanoparticles embedded on *Agave lechuguilla* fibers are composed entirely of Ag. *Agave lechuguilla* fibers–silver nanoparticles composite exhibited very good antibacterial activity against *S. aureus* and *E. Coli*. Mechanical properties of this novel composite can be compared to those of commercial silk suture thread.

Keywords: Natural fibers; silver nanoparticles; bioreduction; nanocomposites

Corresponding Author: Raúl Alberto Morales Luckie. ramluckie@gmail.com

Introduction

Replacement of artificial fibers commonly used to prepare composites by alternative natural fibers is encouraged in many fields for several reasons, which include the more responsible usage of planetary resources, the manufacture of biodegradable pieces, and the reduction of production costs. (Fernando G. Souza Jr. et.al 2009) Natural fibers are becoming matters of great interest due to their wide range of applications. Industrially natural fibers are attractive due to their low environmental impact, renewability, biodegradability, low cost, lightness, carbon dioxide neutrality, acoustic and thermal insulation properties and resistance, among others. (Mohanty A.K. et.al 2005) The biological nature of cellulose based material provides a direct opportunity to incorporate the highly desirable characteristic of environmental friendliness into many products (Mohanty, A. K. et.al. 2000)

According to the Technology Road Map for Plant/Crop Based Renewable Resources 2020, sponsored by the US Department of Energy (DOE), the application of plant derived renewable resources may increase to 10% of the basic chemical building blocks by 2020, and to 50% by 2050. (Mohanty A. K. et.al. 2002) The insertion of natural fibers in the industrial, building and commercial market sectors has experienced a growth rate of 13%, compounded over the last 10 years. (Natural Fiber Composite Market Report. 2004)

The use of biocomposites in a wide range of applications is expected to improve manufacturing speed and recycling with enhanced environmental compatibility. (Bledzki A. K. 1999). The biodegradability of biocomposites is attributed to organisms that have specific enzyme systems to hydrolyze carbohydrate polymers from the cell wall into digestible units. Cellulose degradation through oxidation hydrolyses and dehydration reactions reduce the biocomposite strength. Therefore, natural fiber reinforced composites offer the production of a material with superior environmental and mechanical performance with a relative cost balance. Nanotechnology had become an important part of materials science due to the capability of changing the materials properties for many applications. Research on inorganic/organic nanocomposite materials is a fast growing interdisciplinary area in materials science and engineering. It is well known that the properties of nanocomposite materials depend not only on the properties of their individual components but also on morphological and interfacial characteristics arising from the combination of distinct materials. (Sanchez, C et.al. 2010).

Recently it has been demonstrated that natural cellulose fibers can be used as supports for nanoparticle synthesis using in situ approaches and electrostatic assembly methods (He et al. 2003; Dong and Hinestroza 2009). However, almost all literature reports on natural fiber's surface modification with nanoparticles refer to cotton and few references to other natural fibers are found so far. The use of unconventional natural fibers as solid supports for metal nanoparticles synthesis is attractive to explore as they exhibit a heterogeneous and oxygen-rich surface structure (Zhu et al. 2009). These unique surface properties can result in diverse nanoparticle shapes, sizes and distributions that could confer, due to the shape- and size-dependent properties of the nanoparticles, varied macroscopic properties such as color, conductivity and improved mechanical resistance to the modified fiber (Liz-Marzan 2004). Among the vast variety of nanoparticles, silver nanoparticles (Ag NP's) have been extensively studied. They are known for their antibacterial properties and have been used in different products such as antimicrobial gel (Jaya J. 2009), preservation of fruits and vegetables (Jochenweiss, P. 2006), healing materials (Silver, S. 2006), antiseptic sprays (Melaiye, A.2005), among others. There are several methods of synthesizing nanoparticles such as, laser ablation (S. Shiv Shankar 2003), chemical reduction (M.V. Roldan, 2008), mechano-synthesis, biological methods, among others. In recent years the bio-reduction of noble metal ions with plant extracts to obtain nanoparticles has been gained importance (Fu, M. 2004 S. Shiv Shankar 2003, Priyabrata Mukherjee Absar Ahmad 2001, Li, W.-R, 2011.) . Main advantages of this method are that expensive equipment or chemical reactants are not required. In addition, these simple methods follow the principles of green chemistry, which refers to the design of products and processes friendly to the environment (Paul T. Anastas 2002).

Heterotheca inuloides is a medicinal plant that had been used for centuries to heal skin wounds and bruises, due to its anti-inflammatory properties. Studies show that these properties could be given by its main compounds: cadalen-15-oic acid, 3,7-dihydroxy-3-isocadalen-4-one, and dicadalenol, found in the aerial parts of *Heterotheca inuloides* (Lok, C. N.; 2007) . In the medical field, when a wound is sutured there is always the risk of infection (Stojadinovic A. 2008), delaying the healing process and in the worst scenario causing a bigger

damage in the wound. Usually, the suture threads used in medical practice requires to the patients to take external antibiotic drugs in order to avoid infection; however, these drugs in many cases show undesirable secondary effects (Moyer, C. A.1965). Therefore, a suture thread that avoids the usage of external antibiotics is desired.

In this work, *Heterotheca inuloides*, also known as Mexican arnica, is used for the first time as a bio-reducing agent of silver ions to generate silver nanoparticles, which are supported on a natural fiber, *Agave lechuguilla*. Structural and morphological characterizations, mechanical properties, and their capability to inhibit bacteria growth, were determined for this *Agave lechuguilla* fibers-Ag NP's novel composite.

Experimental

All reagents used were analytical grade. AgNO₃ was purchased from Sigma-Aldrich. *Heterotheca inuloides* (Mexican arnica) was purchased from Anáhuac Mexican teas, 99.90% of purity. *Agave lechuguilla* fibers were obtained directly from the agave producers in the State of Mexico southern region, Mexico. Commercial suture threads of silk (Atramat) were used, with regular taper point, black, braided, siliconized and non-absorbable.

Agave lechuguilla fibers preparation

Fibers were boiled for 1 hour to remove lignin impurities; then, were carefully cut to achieve a uniform diameter along the whole fibers (400 μm approximately) with 40 cm of length. Additionally, some of these fibers were treated with methylene blue to soften them and improve, thus, their handling for suture uses.

Synthesis of *Agave lechuguilla*/silver nanoparticles composite

1 g of *Heterotheca inuloides* (Mexican arnica) was poured into 100 ml of deionized water. The mixture was boiled for 20 minutes, and then vacuum filtered and let standing to cool at room temperature. 1x10⁻², 5x10⁻³, 1x10⁻³, 1x10⁻⁴ M AgNO₃ deionized water solutions were prepared. *Agave lechuguilla* fibers were submerged inside these solutions, for each concentration, at 1, 10, 30 and 60 min and, after that time, fibers were removed and vacuum filtered. Then, Ag¹⁺ ions- impregnated fibers were soaked in the Mexican arnica solution at room temperature at different times: 1, 10, 30 and 60 min. Finally, fibers were removed and dried at room temperature for characterization. Same experimental procedures were carried out for commercial silk suture thread.

Agave lechuguilla/silver nanoparticles composite characterization

UV-Vis spectroscopy was performed in UV-Vis Spectrophotometer Model Carry 5000, using a quartz cell and the wavelength range was from 300 to 600 nm. Scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersive spectroscopy (EDS) analysis were done in a JSM-6510-LV microscope (JEOL) at 20 kV of acceleration voltage using secondary electrons. The samples were gold coated using a sputtering machine (DENTON). Transmission electron microscopy (TEM) was carried on in a JEOL-2100 Microscope (JEOL) at 200 kV of acceleration voltage in the bright field mode. In order to prepare the samples for TEM the polymeric fibers with the silver nanoparticles were sonicated during 4 hours to detach the nanoparticles from the fibers; after that, a drop of the

suspension was carefully placed on carbon coated TEM grid and left to evaporate. Mechanical testing was performed using a QTESTS/5 universal machine (MTS) with a speed head of 100 mm/min. The values of the mechanical properties of the fibers are the mean values of 5 different specimens for each sample.

Antibacterial studies

To perform the microbiological tests, stripe growth Petri dishes with semi solid Muller-Hinton agar were prepared. *Staphylococcus aureus* (gram +) and *Escherichia coli* (gram-) were the chosen control bacteria. Bacteria growth was monitored at 18 and 24 hours.

Results and discussion

In order to find the best conditions for obtaining Ag nanoparticles well dispersed throughout the surface of the fibers without agglomeration and in a sufficient amount to deliver antibacterial properties we studied the effect of the synthesis parameters as mentioned in the previous section. We found the optimum silver ion impregnation time at 30 min. With less time we could not detect any silver on the surface by EDS while for longer times we found big agglomerations of silver particles forming many micrometric clusters. Regarding the AgNO₃ concentration the optimum was 10x10⁻³M. A higher concentration would yield big micrometric aggregates while fewer amounts would lead to a scarce amount of surface silver. We found that 10 minutes of reduction time was enough to reduce all the silver ions since longer times did not result in higher amounts of Ag on the fibers surface. Finally, the most suitable bioreductor concentration was 1 mg/100mL. All higher concentrations resulted in the formation of big agglomerates which were not uniformly dispersed throughout the surface of the fibers. In order to verify the effectiveness of *Heterotheca inuloides* as bio-reductor the plant infusion was mixed with AgNO₃ solution for 10 minutes at ambient conditions. The solution color changed from light yellow to light brown as the reduction of silver ions to nanoparticles took place. This was confirmed by UV-Vis spectroscopy. Figure 1 shows the UV-Vis spectrum of the silver nanoparticle solution, a single broad peak at 450 nm is observed, which is the typical plasmon absorption signal of silver nanoparticles (Fu, M. 2007).

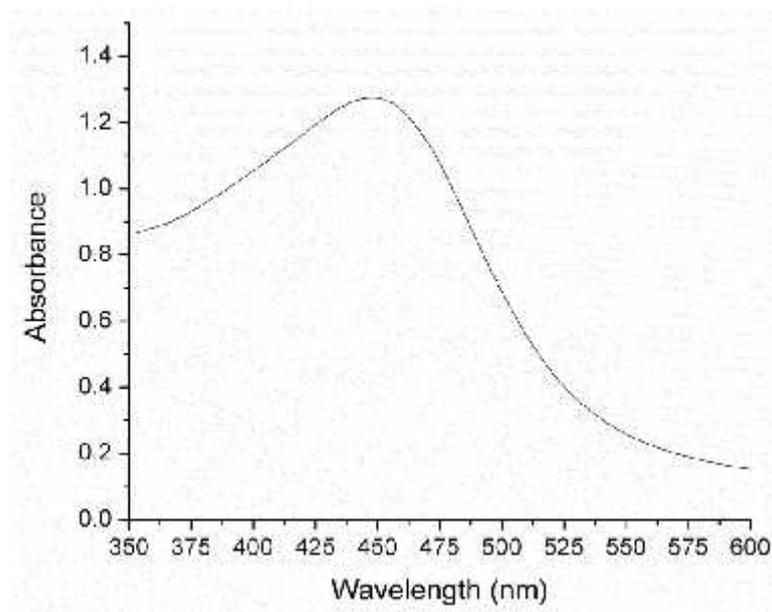


Fig. 1 UV-Vis spectrum of silver nanoparticles obtained with *Heterotheca inuloides* as bioreductor.

According to the composition of *Heterotheca inuloides* (Guillermo Delgado 2001) the main molecules responsible for the bio-reduction are those with phenolic groups, which act similarly than in other plant bio-reduction systems (Bhattacharya, D.2005). These molecules are also responsible of the stabilization of the silver nanoparticles leading to narrow size dispersion and non-agglomerated particles, as confirmed by TEM analysis. Figure 1 also shows TEM images of the silver nanoparticles synthesized with *Heterotheca inuloides* as bioreductor detached from the surface of the agave fiber. As already mentioned, the particle size dispersion is pretty narrow, while their shape tends to be spherical. Furthermore, the particles are well dispersed although a few scattered clusters are also observed (see Figure 4a). The mean particle size is 16 nm, well below 50 nm, which is important to maintain antibacterial properties (Lok, C. 2007).

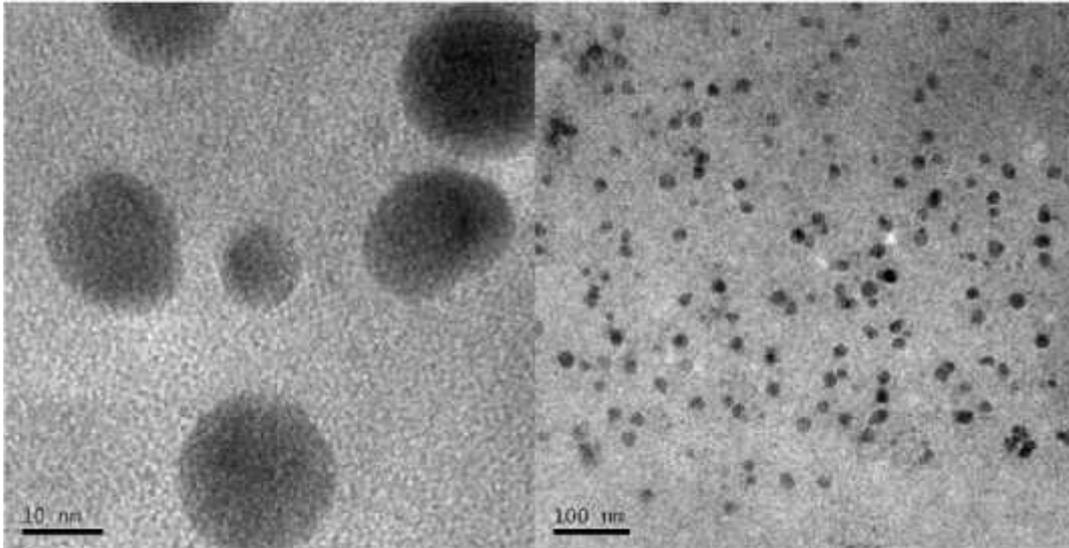


Fig. 2 TEM micrographs of silver nanoparticles synthesized with *Heterotheca inuloides* as bioreductor.

Figure 3 shows the silver nanoparticle sizes histogram, demonstrating their narrow dispersion. Similar results were obtained when silver nanoparticles were grown on silk fibers.

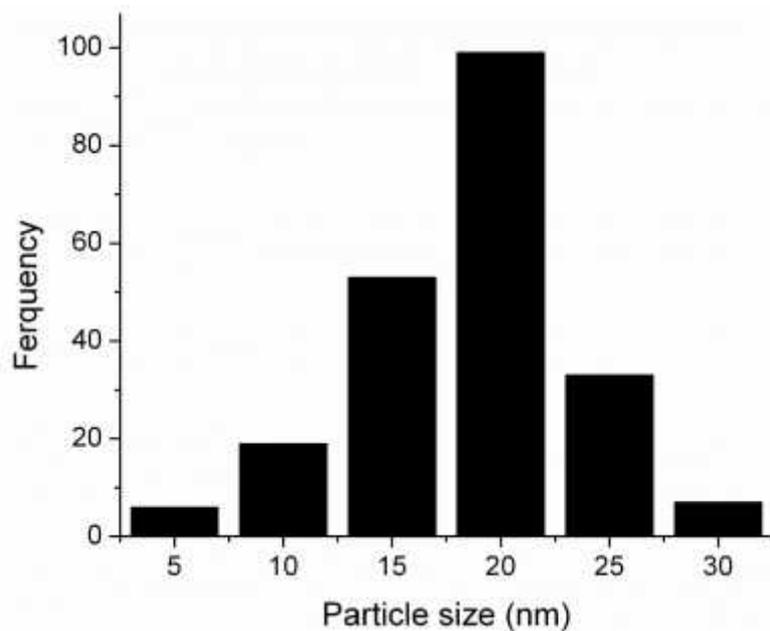


Fig. 3 Size histogram of silver nanoparticles synthesized with *Heterotheca inuloides* as bioreductor

SEM analysis showed that particle agglomerates, with sizes of less than 200 nm, were formed on the surface of the *Agave lechuguilla* fibers (Figure 4A). A chemical mapping using EDS (Figure 4b) shows that elemental Ag particles are present throughout the surface of the *Agave lechuguilla*. In the case of silk fibers, such Ag

nanoparticles agglomerates could not be observed and only the EDS mapping revealed the presence of Ag on the surface similarly to the *Agave lechuguilla* fiber.

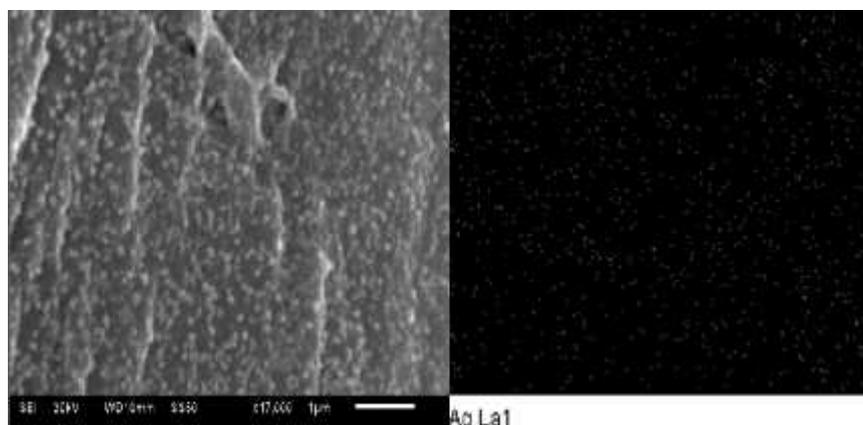


Fig. 4 (A) SEM micrograph of *Agave lechuguilla* fiber with silver nanoparticles. (B) Chemical mapping of Ag in the area. (C) EDS spectrum of the nanocomposite.

Nevertheless, EDS studies are not enough to assure that Ag metallic nanoparticles are present instead of the undesired metal oxide. Therefore, XPS was used to elucidate the oxidation state of silver on the fibers surface. By deconvoluting the Ag peak in the high resolution XPS spectrum of silk with Ag nanoparticles (Figure 5), it was found that silver oxide (AgO) is present with an abundance of about 14% compared to that of the Ag metal peak. From the spectrum is not possible to know if there are metal oxide particles as well as metallic Ag particles or there are metallic particles covered with a thin layer of oxide, or both situations co-existing. On the other hand, for the *Agave lechuguilla* fibers bearing Ag nanoparticles, the AgO signal was not observed (Figure 6) and only the metallic corresponding peaks are shown. Thus, the oxide phase present when using silk as supporting fiber could be formed due to the presence of certain proteins that can lead to a partial oxidation of the Ag atoms (Sutherland TD 2010). This is not the case of *Agave lechuguilla*, since it is mostly composed of nitrogen-free cellulose (Nishiyama, Yoshiharu 2002).

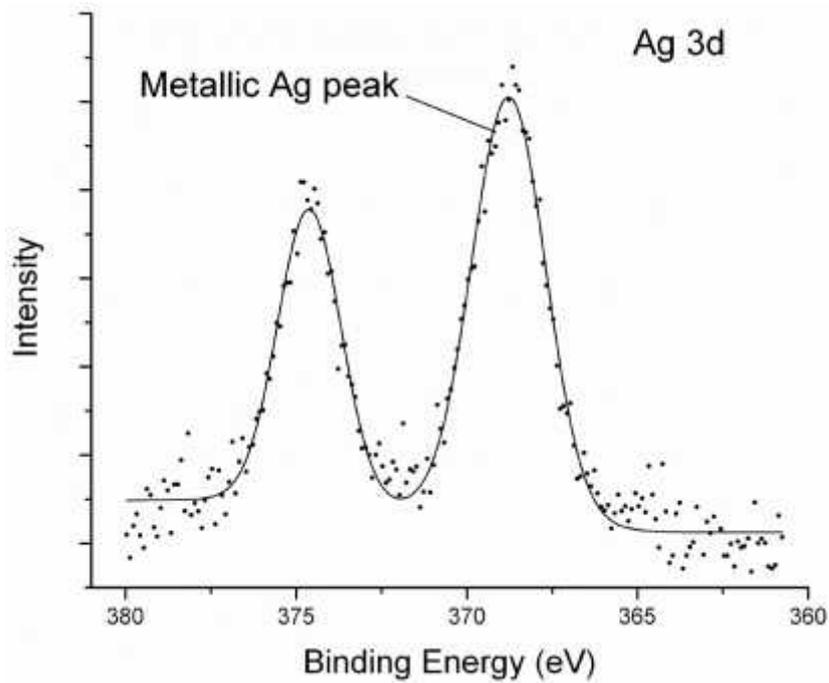


Fig.5 High resolution XPS of Ag 3d_{5/2} from silver nanoparticles on *Agave lechuguilla* fiber.

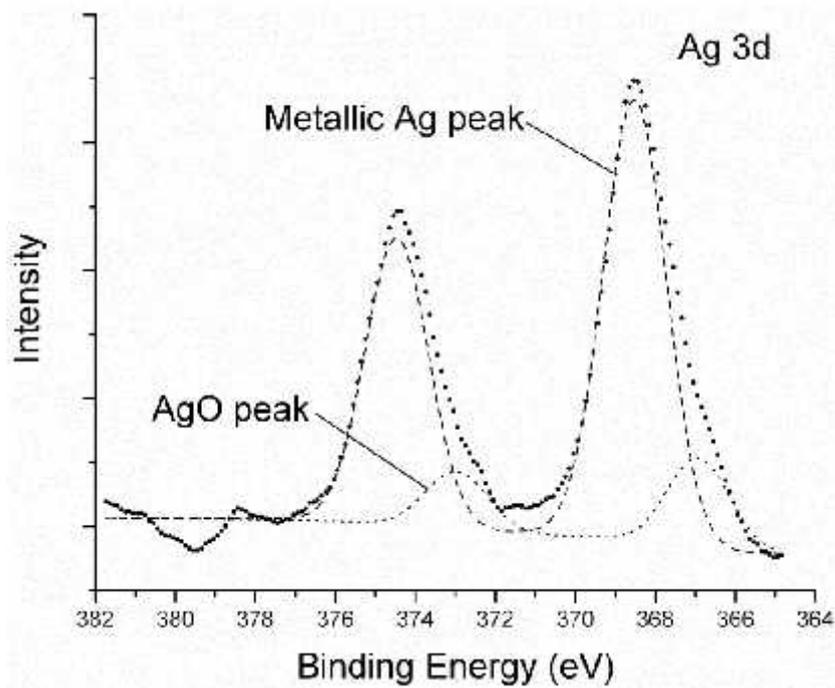


Figure 6. High resolution XPS spectrum of Ag 3d_{5/2} from silver nanoparticles on silk suture thread.

In the antimicrobial study, two types of bacteria were tested in this study: *S.aureus* (gram +) and *E. coli* (gram -). Functional composites silk and *Agave lechuguilla* bearing Ag nanoparticles inhibit the growth of the two types of bacteria. This is clear by observing, in figures 7 and 8, the inhibitory halo around the fibers, which has

approximately three times the fibers' width. However, it is also clear that the inhibitory halo in silk/Ag nanoparticles composite is smaller than the one exhibited for *Agave lechuguilla*/Ag nanoparticles composite, showing weaker antibacterial efficiency for the former; this phenomenon can be due to the presence of AgO in the silk fibers, as demonstrated before with XPS study. As it is well known, the general antibacterial mechanism of silver is by cell wall breakdown and inhibition of intracellular enzyme activity (Li, W.-R. 2011).



Figure 7. *Agave lechuguilla* with silver nanoparticles, in agar Muller-Hinton and *S.aureus* (gram +)

In solution, the antibacterial behavior of Ag nanoparticles arises from the direct contact bacteria-nanoparticle; however, when nanoparticles are attached to a natural polymer fiber, the inhibitory halo appears because of the releasing of Ag into the agar medium (Zhao, Y. 2012).

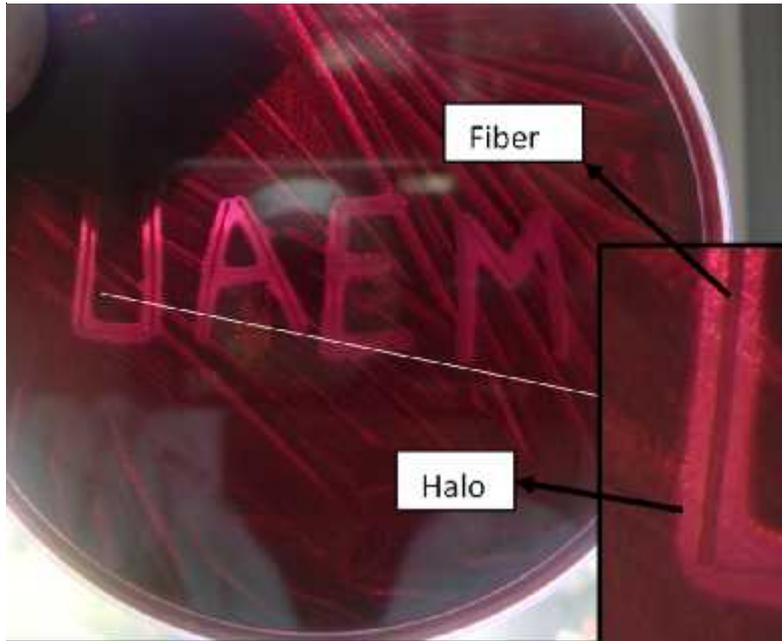


Figure 9. *Agave lechuguilla* with silver nanoparticles in agar Eosin methylene blue with *E. coli* (gram -).



Figure 10. Silk suture thread with silver nanoparticles in agar Muller-Hinton with *S. aureus* (gram+)

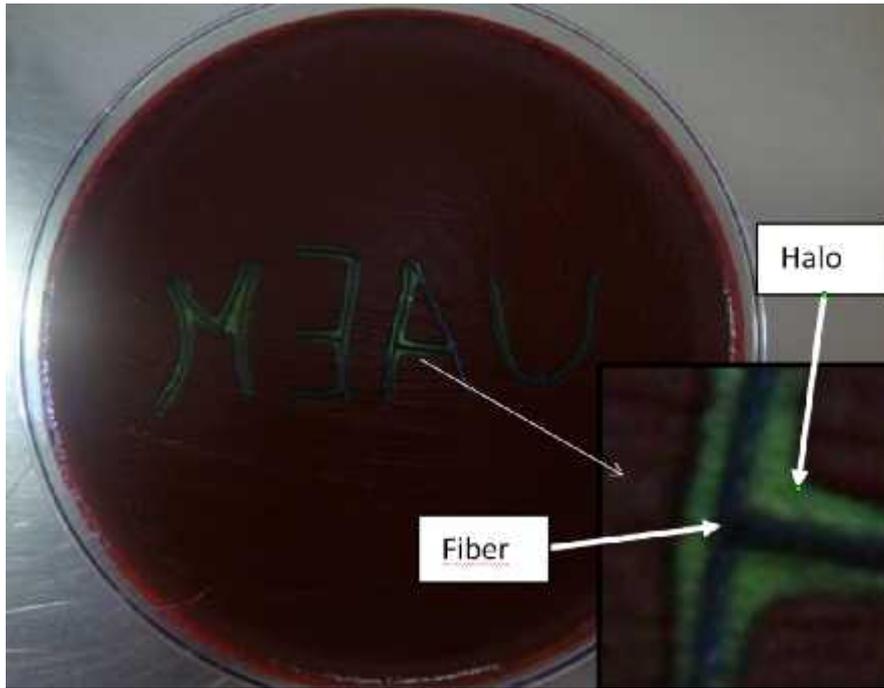


Figure 11 Silk suture thread with silver nanoparticles, in agar Eosin methylene blue with *E. coli* (gram-).

Since these fibers are to be used as suture threads it is important to study their mechanical properties before and after the Ag nanoparticles impregnation. Fig 12 shows the elastic modulus of the fibers. The modulus decreases when nanoparticles are incorporated to the fibers. The most affected fiber is silk since it shows a reduction of 25% with respect to the untreated fiber. However, the fibers of *Agave lechuguilla* and *Agave lechuguilla* treated with methylene blue, shows only a 5% and 9% modulus reduction with respect to the untreated thread.

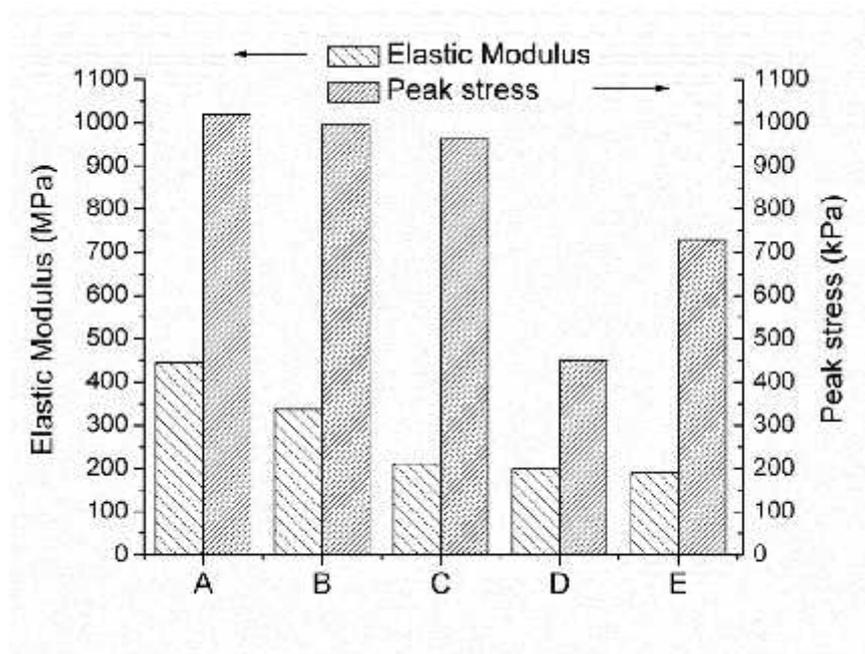


Figure 12. Mechanical properties of the fibers with and without silver nanoparticles. A) Pure silk. B) Silk with Ag nanoparticles. C) Pure *Agave lechuguilla*. D) *Agave lechuguilla* with Ag nanoparticles. E) Treated MB *Agave lechuguilla* with Ag nanoparticles.

Another important mechanical property for these materials is the stress at break, which is the maximum load that the thread can bear before rupture. Figure 12 shows this property for the impregnated and not impregnated fibers. Again, a reduction of the stress at break when Ag nanoparticles are adhered to the fibers can be seen. In silk this reduction is not substantial (only 2%). Unlike, for *Agave lechuguilla* the reduction is 53%. However, when this fiber is treated with methylene blue the stress at break is 24%. The reduction of the mechanical properties of the fibers can be attributed to the entering of water inside the fibers during the impregnation process weakening the material.

Conclusions

Agave lechuguilla fibers–silver nanoparticles composite has been successfully prepared with a novel, one-step green methodology, using *Heterotheca inuloides* (Mexican arnica). This bioreduction method has proved to be uncomplicated, cost-effective and environmentally friendly to obtain silver nanostructures with low polydispersity and with an average size of 20 nm. Another important finding in this study is that Ag nanoparticles obtained on *Agave lechuguilla* fibers are AgO free, as proved by XPS, which could be important for potential applications of the nanocomposite. In fact, the *Agave lechuguilla* fibers–silver nanoparticles composite exhibited very good antimicrobial properties towards both, gram(+) and gram(-) bacteria. In addition, mechanical properties of *Agave lechuguilla* thread bearing silver nanoparticles are improved in comparison to those of commercial silk suture thread, which, besides to the probed antimicrobial properties, make this composite a very good candidate to be used as smart suture thread in surgical procedures.

Acknowledgements

Financial support of this work was provided by Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM) and UNT project UAEM-UNT 3046/2011. One of us (Lopezfuentes-Ruiz) would like to thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) in Mexico for the received scholarship.

References

- A. K. Bledzki, J. Gassan, Prog. Poly. Sci. 1999, 24, 221-274. 1999. [http://dx.doi.org/10.1016/S0079-6700\(98\)00018-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0079-6700(98)00018-5).
- A. K. Mohanty, M. Misra, L. T. Drazel, J. Polym. Environ. 2002,10, 19. 1566-2543/02/0400-0019/0.
- Bhattacharya, D.; Gupta, R. K. Nanotechnology and potential of microorganisms. Crit. Rev. Biotechnol. 2005, 25, 199. doi:10.1080/07388550500361994.

Dong and Hineostroza 2009. *Appl Mater Interfaces*. Metal nanoparticles on natural cellulose fibers: electrostatic assembly and in situ synthesis. 2009 Apr;1(4):797-803. doi: 10.1021/am800225j.

Fernando G. Souza Jr,* Geiza E. Oliveira, Cezar H. M. Rodrigues, Bluma G. Soares, Marcio Nele, Jose Carlos Pinto- DOI: 10.1002/mame.200900033 *Macromolecular Materials and Engineering*.

Fu, M.; Li, Q.; Sun, D.; Lu, Y.; He, N.; Deng, X.; Wang, H.; Huang, J. Rapid preparation process of silver nanoparticles by bioreduction and their characterizations. *Chin. J. Chem. Eng.* 2006, 14, 114. [http://dx.doi.org/10.1016/S1004-9541\(06\)60046-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1004-9541(06)60046-3).

Guillermo Delgado, María del Socorro Olivares, María Isabel Chávez,† Teresa Ramírez -Apan, Antiinflammatory Constituents from *Heterotheca inuloides*, 2001 American Chemical Society and American Society of Pharmacognosy DOI: 10.1021/np0005107.

He et al. 2003; He J, Kunitake T, Nakao A (2003) Facile in situ synthesis of noble metal nanoparticles in porous cellulose fibers. *Chem. Mater* 15(23):4401–4406. doi:10.1021/cm034720r.

Jaya J.; Sumit A.; Kishore M., Silver Nanoparticles in Therapeutics: Development of an Antimicrobial Gel Formulation for Topical Use, *Molecular Pharmaceutics*. 2009. Vol. 6, NO. 5, 1388–1401 DOI: 10.1021/mp900056g.

Jochenweiss, P. T.; McClements, D. J. Functional materials in food nanotechnology. *J. Food Sci.* 2006, 71, 107–116. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2006.00195.x.

Li, W.-R., et al., Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *BioMetals*, 2011. 24(1): p. 135-141. doi: 10.1007/s10534-010-9381-6.

Liz-Marzan Luis M. (2004) Nanometals: Formation and Color. *Materials Today* ISSN:13697021.

Lok, C. N.; Ho, C. M.; Chen, R.; He, Q. Y.; Yu, W. Y.; Sun, H.; Tam, P. K.; Chiu, J. F.; Che, C. M. Silver Nanoparticles: Partial Oxidation and Antibacterial Activities. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2007, 12, 527–534. DOI 10.1007/s00775-007-0208-z.

M.V. Roldan, H. Troiani, M. Granada, O. de Sanctis, N. Pellegrini, (2008) Nanopartículas de plata protegidas superficialmente con PVP. *ANALES AFA*. Vol.20. 166-170.

Melaiye, A.; Youngs, W. J. Silver and its application as an antimicrobial agent. *Expert Opin. Ther. Pat.* 2005, 15, 125–130.

Mohanty AK, Misra M, Drzal LT (2005) *Natural fibers, biopolymers and biocomposites*. CRC Press, Boca Raton ISBN-10: 084931741X | ISBN-13: 978-0849317415.

Mohanty, A. K., M. Misra, G. Hinrichsen, *Macromol. Mater. Eng.* 2000, 276–277, 1. DOI:10.1002/(SICI)1439-2054(20000301)276:1<1::AID-MAME1>3.0.CO;2-W.

Moyer, C. A.; Brentano, L.; Gravens, D. L.; Margraf, H. W.; Monafó, W. W. Treatment of large human burns with 0.5% silver nitrate solution. *Arch. Surg.* 1965, 90, 812–867. Doi:10.1001/archsurg.1965.01320120014002.

Natural Fiber Composite Market Report, Kline and Company, Little Falls, New Jersey 2004.

Nishiyama, Yoshiharu; Langan, Paul; Chanzy, Henri (2002). "Crystal Structure and Hydrogen-Bonding System in Cellulose I β from Synchrotron X-ray and Neutron Fiber Diffraction". *J. Am. Chem.* DOI: 10.1021/ja0257319.

Paul T. Anastas y Mary M. Kirchoff. (2002). Origins, current status, and future challenges of green chemistry. *Accounts of chemical research*. Vol. 35. No9. 686-694. DOI:10.1021/ar010065m.

Priyabrata Mukherjee Absar Ahmad, Deendayal Mandal, Satyajyoti Senapati, Sudhakar R. Sainkar, Mansoor Alam, Rajiv Kumar y Murali Sastry (2001) Fungus-mediated Synthesis of silver nanoparticles and their immobilization in the mycelial matrix: Anovel biological approach to nanoparticle Synthesis. *Nano letters*. Vol. 1. No.10. Page:515-519 DOI: 10.1021/nl0155274.

S. Shiv Shankar, Absar Ahmad y Murali Sastry (2003) Geranium Leaf Assisted Biosynthesis of Silver Nanoparticles. *Biotechnology Prog.* Vol.19 1267-1631 doi/10.1021/bp034070w.

Sanchez, C., Rozes, L., Ribot, F., Laberty-Robert, C., Grosso, D., Sassoie, C., Boissiere, C., & Nicole, L. (2010). *Chimie douce: A land of opportunities for the designed construction of functional inorganic and hybrid organic-inorganic nanomaterials*. *C. R. Chim.*, 1, 3 -39 . doi:10.1016/j.crci.2009.06.

Silver, S.; Phung, L. T.; Silver, G. Silver as Biocides in Burnand Wound Dressings and Bacterial Resistance to SilverCompounds. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2006, 33,627–634. DOI 10.1007/s10295-006-0139-7.

Stojadinovic A, Carlson JW, Schultz GS, Davis TA, Elster Topical advances in wound care(PMID:18793796) *EA Gynecologic oncology* [2008 Nov;111(2 Suppl):S70-80] doi: 10.1016/j.ygyno.2008.07.042.

Sutherland TD, Young JH, Weisman S, Hayashi CY, Merritt DJ (2010). " Insect silk: one name, many materials" DOI: 10.1146/annurev-ento-112408-085401.

Zhao, Y., et al., A facile method for electrospinning of Ag nanoparticles/poly (vinyl alcohol)/carboxymethyl-chitosan nanofibers. *Applied Surface Science*, 2012. 258(22): p. 8867-8873. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2012.05.106>.

Zhu C, Xue J, He J (2009) Controlled in situ synthesis of silver nanoparticles in natural cellulose fibers toward highly efficient antimicrobial materials. *J Nanosci Nanotechnol* 9(5):3067–3074 DOI: <http://dx.doi.org/10.1166/jnn.2009.212>.

4.- CONCLUSIONES

Con el desarrollo de este proyecto se puede concluir, que el árnica mexicana (*Hetherotheca inuloides*) es un bioreductor efectivo, ya que con 1g/100ml y 10 minutos de reducción, obtenemos nanopartículas de plata menores a 50 nm con una dispersión baja de forma y tamaño.

La concentración óptima de AgNO_3 fue de 1×10^{-3} M, ya que obtuvimos nanopartículas por debajo de 50 nm, sin aglomeraciones y en una cantidad adecuada para que la fibra presente propiedades antibacteriales.

Las fibras de *Agave lechuguilla* presentaron muy buenas propiedades antibacteriales, como se puede observar en las imágenes de las pruebas microbiológicas, éstas presentan un halo inhibitorio de aproximadamente de 2 veces el diámetro de la fibra, lo cual es importante para cumplir su propósito como hilo de sutura antibacterial.

Las fibras de seda, generaron un halo inhibitorio de menor tamaño que las de *Agave lechuguilla* , pero aun así cumplen como hilo de sutura con propiedades antibacteriales.

Como podemos observar en las pruebas mecánicas se obtuvo un cambio en el comportamiento, con la adición de las nanopartículas, esto se puede atribuir al tratamiento que se les da a las fibras como parte de la síntesis *in situ* de las nanopartículas, como la inmersión en una sal metálica

Las nanopartículas se sitúan en la superficie de las fibras y no como parte estructural, con lo que se concluye que las nanopartículas no afectan el comportamiento mecánico del composito.

Las fibras mostraron una buena factibilidad, para su posible uso como material de sutura, antibacterial con propiedades anti inflamatorias y cicatrizantes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Wilson, M. et al. "Nanotechnology" 1^a.ed. Chapman & Hall/Crc. Australia 2002.
- (2) Conrand, A. H.; Tramp, C. R.; Long, C. J.; Wells, D. C.; Paulsen, A. Q.; Conrand, G. W. Ag⁺ alters cell growth, neurite extension, cardiomyocyte beating, and fertilized egg constriction. *AViat. Space EnViron. Med.* 1999, 70, 1096–1105.
- (3) Jochenweiss, P. T.; McClements, D. J. Functional materials in foodnanotechnology. *J. Food Sci.* 2006, 71, 107–116.
- (4) Melaiye, A.; Youngs, W. J. Silver and its application as an antimicrobial agent. *Expert Opin. Ther. Pat.* 2005, 15, 125–130
- (5) Hong D, Dong W, Juan P. H. Assembly of Metal Nanoparticles on Electrospun Nylon 6 Nanofibers by Control of Interfacial Hydrogen-Bonding Interactions
- (6) Charles Poole P., Frank Owens J. 2003. Introduction to Nanotechnology. Ed.Wiley Interscience, USA.Pp.9.
- (7) Y.Xia, P.Yang, Y. Sun, Y. Wu, B. Gate, Y. Yin, F. Kim, and H. Yan, 2003 *Adv. Mater.* No 15. 353
- (8) Chen, X.; Schluesener, H. J. Nanosilver: A Nanoproduct in Medical Application. *Toxicol. Lett.* 2008, 176, 1–12.

- (9) Mackay, K.M., Mackay, R.A. y Henderson, W. 1996 Introduction to Modern Inorganic Chemistry. 5th edition. Blackie Academic& Professional. Londres
- (10) Jaya J.; Sumit A.; Kishore M., *Silver Nanoparticles in Therapeutics: Development of an Antimicrobial Gel Formulation for Topical Use, Molecular Pharmaceutics*. 2009. Vol. 6, NO. 5, 1388-1401
- (11) H. Miyagawa, A. K. Mohanty, L. T. Drzal, M. Misra. *Nanotechnology*, 16, 118 2005.
- (12) Bolander, M. E.; Mukhopadhyay, D.; Sarkar, G.; Mukherjee, P. The use of microorganisms for the formation of metal nanoparticles and their application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006, 69, 485-492.
- (13) Silver, S.; Phung, L. T.; Silver, G. *Silver as Biocides in Burnand Wound Dressings and Bacterial Resistance to Silver Compounds. J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2006, 33, 627-634.
- (14) Lansdown, A. B. G. Silver in Health Care: Antimicrobial Effects and Safety in Use. *Curr. Probl. Dermatol.* 2006, 33, 17-34.
- (15) Xavier Enrique G, Dib, Ubaldo O, Selene S, Domingo F, Miguel Jose Y, 2009. Síntesis y propiedades de nanopartículas monometálicas y bimetálicas oro y plata. *Ingenierías*, No 45. Vol. 12. 72-77.

- (16) Xavier Enrique G, Dib. Ubaldo O, Selene S, Domingo F, Miguel Jose Y, 2009. Sintesis y propiedades de nanopartículas monometálicas y bimetálicas oro y plata. Ingenierias, No 45.Vol.12.72-77
- (17) Jorge M, Jose M, Maria Q. y Walter E, 2009, Sintesis y caracterización de nanopartículas de plata por la ruta sol-gel a partir de nitrato de plata, Rev.Soc.Quim.Peru.No 7. Vol2.177.184.
- (18) M.V. Roldan, H.Troani, M.Granada, O. de Sanctis, N.Pellegrini, 2008 Nanoparticulas de plata protegidas superficialmente con PVP, ANALES AFA. Vol20. 166-170.
- (19) Russo R. Laser Ablation 1995, Review. Applied Apectrosc. Vol.9.49-52.
- (20) S.Shiv S, Absar A. y Murali Sastry 2003 Geranium Leaf Assisted Biosynthesis of Silver Nanoparticles. Biotechnology Prog.Vol.19. 1627-1631.
- (21)http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/tesis/basic/davila_vc/2.pdf
- (22) Tadao S. Monodispersed Particles.Institute for advanced Materials Processing. Tokio. Elsevier 2001, pp.209

- (23) Soto, G; de la Cruz W; Farias MH 2004. «XPS, AES, and EELS characterization of nitrogen-containing thin films». *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* 135 (1). pp 27-39.)
- (24) Jochenweiss, P. T.; McClements, D. J. Functional materials in food nanotechnology. *J. Food Sci.* 2006, 71, 107–116.
- (25) Y.Xia, P.Yang, Y. Sun, Y. Wu, B. Gate, Y. Yin, F. Kim, and H. Yan, 2003 *Adv. Mater.* No 15. 353
- (26) Melaiye, A.; Youngs, W. J. Silver and its application as an antimicrobial agent. *Expert Opin. Ther. Pat.* 2005, 15, 125–130
- (27) Mackay, K.M., Mackay, R.A. y Henderson, W. 1996 *Introduction to Modern Inorganic Chemistry*. 5th edition. Blackie Academic& Professional. Londres
- (28) Ki, H. Y.; Kim, J. H.; Kwon, S. C.; Jeong, S. H. A Study on Multifunctional Wool Textiles Treated with Nano-Sized Silver. *J.Mater. Sci.* 2007, 42, 8020.
- (29) Kadolph, Sara J. *Textiles*. 10th ed. Upper Saddle River: Pearson Prentice Hall, 2007. 76-81
- (30) Gulrajani, M. L.; Gupta, D.; Periyasamy, S.; Muthu, S. G. Preparation and Application of Silver Nanoparticles on Silk for

Imparting Antimicrobial Properties. *J. Appl. Polym. Sci.* 2008, 108, 614.

- (31) Li, G. H.; Liu, H.; Zhao, H. S.; Gao, Y. Q.; Wang, J. Y.; Jiang, H. D.; Boughton, R. I. Chemical Assembly of TiO₂ and TiO₂@Ag Nanoparticles on Silk Fiber to Produce Multifunctional Fabrics. *J. Colloid Interface Sci.* 2011, 358, 307.