

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**  
**FACULTAD DE INGENIERIA MECANICA Y ELECTRICA**  
**SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



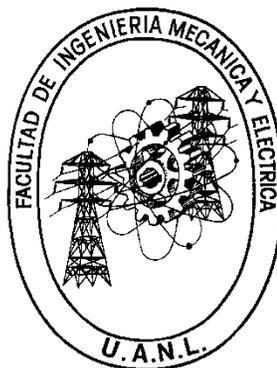
**“INFLUENCIA DE LA ESTRUCTURA MOLECULAR DE LOS  
POLISACÁRIDOS EN LA ACTIVIDAD BACTERICIDA Y CITOTOXICIDAD DE  
COMPÓSITOS BASADOS EN NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y  
CARBOXIMETIL-CELULOSA”**

**Por:**  
**MARÍA DE LOS ANGELES MARTÍNEZ RODRÍGUEZ**

**EN OPCIÓN AL GRADO DE:**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA CON ORIENTACIÓN EN  
NANOTECNOLOGÍA**

**SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, NUEVO LEÓN**  
**AGOSTO 2020**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**  
**FACULTAD DE INGENIERIA MECANICA Y ELECTRICA**  
**SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**“INFLUENCIA DE LA ESTRUCTURA MOLECULAR DE LOS  
POLISACÁRIDOS EN LA ACTIVIDAD BACTERICIDA Y CITOTOXICIDAD DE  
COMPÓSITOS BASADOS EN NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y  
CARBOXIMETIL-CELULOSA”**

**Por:**  
**MARÍA DE LOS ANGELES MARTÍNEZ RODRÍGUEZ**

**EN OPCIÓN AL GRADO DE:  
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA CON ORIENTACIÓN EN  
NANOTECNOLOGÍA**

**SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, NUEVO LEÓN**

**AGOSTO 2020**



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA Y ELÉCTRICA

**Universidad Autónoma de Nuevo León**  
**Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica**  
**Subdirección de Estudios de Posgrado**

Los miembros del Comité de Tesis recomendamos que la Tesis "Influencia de la estructura molecular de los polisacáridos en la actividad bactericida y citotoxicidad de compósitos basados en nanopartículas de plata y carboximetil-celulosa", realizada por el alumno Maria De Los Angeles Martínez Rodríguez, con número de matrícula 1490139, sea aceptada para su defensa como requisito para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Ingeniería con Orientación en Nanotecnología.

El Comité de Tesis

Dr. Marco Antonio Garza Navarro  
Director

Dr. Virgilio Angel González González  
Revisor

Dra. Myriam Angélica de la Garza Ramos  
Revisor

Vo. Bo.

Dr. Simón Martínez Martínez  
Subdirector de Estudios de Posgrado

San Nicolás de los Garza, Nuevo León, agosto de 2020

## **Contenido**

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN GENERAL .....	3
1. ANTECEDENTES.....	5
1.1. Introducción .....	5
1.2. Características bactericidas y citotóxicas de las AgNPs.....	5
1.3. Síntesis verde de compósitos basados en AgNPs .....	9
1.4. Hipótesis y objetivo .....	11
1.4.1. Hipótesis .....	11
1.4.2. Objetivo.....	11
2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL .....	12
2.1. Introducción .....	12
2.2. Síntesis de los compósitos CMC/Ag .....	13
2.2.1. Materiales .....	13
2.2.2. Metodología de síntesis .....	13
2.3. Ensayos de actividad bactericida y citotoxicidad. ....	16
2.3.1. Preparación se especímenes.....	16
2.3.2. Actividad bactericida.....	17
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	20
3.1. Introducción .....	20
3.2. Características morfológicas y cristalinas .....	20
3.3. Caracterización espectroscópica .....	26
3.4. Actividad bactericida .....	34
3.5. Citotoxicidad .....	36
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	39
4.1 Conclusiones .....	39
4.2. Recomendaciones.....	40
5. REFERENCIAS.....	42
INDICE DE FIGURAS.....	50
INDICE DE TABLAS .....	51

## RESUMEN

En este trabajo de investigación se reporta la influencia de la estructura molecular de los polisacáridos en la actividad bactericida y citotoxicidad de compósitos basados en nanopartículas de plata y carboximetil-celulosa, sintetizados a partir de una ruta de química verde, que implica el uso de polisacáridos con distintos grados de sustitución y pesos moleculares como agente reductor e inmovilizador. Estos compósitos fueron caracterizados por las técnicas de microscopia electrónica de transmisión, espectroscopia de infrarrojo, espectroscopia de ultravioleta, espectroscopia Raman y espectroscopia foto-electrónica de rayos X. La actividad bactericida de estos compósitos se evaluó usando la cepa bacteriana *Enterococcus faecalis*; y su citotoxicidad contra fibroblastos gingivales.

La evidencia experimental obtenida por microscopia electrónica de transmisión indica que la distribución de tamaño de partícula y morfología de las nanopartículas depende del grado de sustitución de la CMC usada para su síntesis. Asimismo, la estructura cristalina de las nanopartículas es congruente con la esperada para un apilamiento compacto tipo FCC característico de la plata. Además, los resultados obtenidos de UV-vis indican que fue posible la completa reducción de  $\text{Ag}^+$  a  $\text{Ag}^0$  mediante la ruta de química verde seguida en esta investigación.

Como lo sugieren los datos obtenidos por la técnica de espectroscopia de infrarrojo, la distribución de tamaño de partícula y morfología de las AgNPs dependen de la habilidad de la CMC para inmovilizarlas durante su síntesis. Esta inmovilización ocurre debido a la adhesión de las cadenas de CMC a la superficie de las AgNPs. Tal como lo indican los resultados obtenidos de Raman y espectroscopia foto-electrónica de rayos X, esta adhesión ocurre a través de la formación de enlaces de coordinación Ag-O entre las AgNPs y los grupos  $\text{COO}^-$

de la CMC; y da como resultando partículas más pequeñas para polisacáridos con alto grado de sustitución.

Más aún, los enlaces de coordinación Ag-O entre las AgNPs y los grupos  $\text{COO}^-$  de la CMC modifican la habilidad de las nanopartículas para producir y liberar iones  $\text{Ag}^+$  en medio acuoso, ajustando su actividad bactericida y la inducción de citotoxicidad en los medios biológicos probados. Por lo tanto, este trabajo de investigación establece las bases para el desarrollo de compósitos sintetizados a través de rutas de química verde cuya actividad bactericida puede regularse a fin de evitar la inducción de citotoxicidad en medios biológicos. Así, es seguro decir que: la estructura molecular de la carboximetil-celulosa determina la actividad bactericida y citotoxicidad de compósitos basados en nanopartículas de plata inmovilizadas en el polisacárido.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

La convivencia del ser humano con otras especies ha conducido a una inherente búsqueda de protección; el fuego y los sonidos estridentes son ejemplo de defensas de los primeros hombres ante sus depredadores, pero ¿cómo protegerse de aquello que es invisible ante sus ojos y que además se extiende por todo el territorio?: las bacterias. A pesar de su diminuto tamaño, el taxón bacteriano constituye, aproximadamente, el 15% de biomasa global, superando por cuatro ordenes de magnitud al porcentaje atribuido al ser humano. Dicho en palabras sencillas, las bacterias son más abundantes que el hombre. Esto ocasiona que la interacción entre ambas especies sea inevitable. Actualmente se vive en una relativa calma ya que se encuentran una gran cantidad de antibióticos disponibles en el mercado. No obstante, la exploración de nuevos métodos de defensa ante la inminente resistencia bacteriana se encuentra en constante investigación.

Algunas de las alternativas propuestas incluyen el uso de nanomateriales, principalmente aquellos que contienen plata; ya sea individualmente o dentro de un compuesto estos nanomateriales han presentado resultados prometedores. Algunas características que se deben tomar en cuenta en la propuesta de agentes bactericidas además de su eficacia, es su reacción con microorganismos sanos como las células, por lo tanto, debe procurarse la eliminación de especies tóxicas durante su elaboración. Una estrategia es la síntesis de química verde, en que se usan primordialmente polímeros naturales, destacando entre ellos el uso de polisacáridos.

En este sentido, este trabajo de investigación tiene como propósito estudiar la influencia de la estructura molecular de los polisacáridos en la actividad bactericida y citotóxica de compósitos basados nanopartículas de plata y carboximetil-celulosa, sintetizados a partir de una ruta de química verde, que

implica el uso de polisacáridos con distintos grados de sustitución y pesos moleculares como agente reductor e inmovilizador.

# 1. ANTECEDENTES

## 1.1. Introducción

En años recientes, la nanotecnología ha impulsado el desarrollo de nuevos materiales funcionales basados en nanoestructuras. Entre los también llamados nanomateriales, las nanopartículas de plata (AgNPs) han emergido como una especie prometedora para ser usada en aplicaciones biomédicas como bactericida, fungicida y antiviral. En específico, las AgNPs exhiben una gran área superficial, lo que favorece el contacto con bacterias y permite su adherencia y penetración de membrana celular. Además, las AgNPs son susceptibles a liberar iones  $\text{Ag}^+$  cuando se encuentran en dispersión acuosa, que penetran la pared celular de bacterias y les infligen un daño adicional al interactuar con sus proteínas y ADN. No obstante, una de las principales preocupaciones acerca del uso de AgNPs en aplicaciones biomédicas es su citotoxicidad. Esta citotoxicidad se relaciona a la generación de especies reactivas de oxígeno durante el proceso de liberación de  $\text{Ag}^+$  desde su superficie.

En consecuencia, es necesario desarrollar nuevos materiales basados en AgNPs que presenten una adecuada actividad bactericida y baja producción de especies reactivas de oxígeno, a fin de minimizar la inducción de citotoxicidad en medios biológicos. Al respecto, en este capítulo se expondrán los antecedentes que motivan este trabajo de investigación, para posteriormente plantear la hipótesis que lo sustenta.

## 1.2. Características bactericidas y citotóxicas de las AgNPs

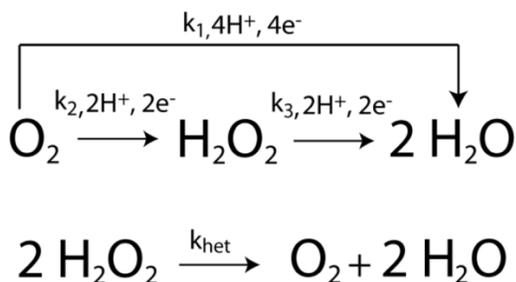
La plata ha sido usada por la humanidad desde hace aproximadamente 700 años para acuñar monedas y fabricar ornamentos, así como por sus características bactericidas [1]. Heródoto fue uno de los primeros personajes en elucidar su actividad antibacteriana y la relacionó a los iones de plata. Al respecto, y debido

inmensa variedad de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos, la plata es usada hoy en día para desinfectar y recubrir instrumental médico e implantes, ya sea en forma de ion  $\text{Ag}^+$  o nanopartícula, así como en textiles y desodorantes para eliminar malos olores debido a la sudoración [1–4]; o en la preparación de películas comestibles y embalajes para extender la vida de anaquel de frutas y legumbres [5–7].

Las AgNPs se conocen desde hace aproximadamente 120 años [2], y en la actualidad son sintetizadas mediante la reducción de sales de plata usando agentes tales como citratos, glucosa, etilen-glicol o brohidruro de sodio, en medios acuosos u orgánicos [8]. Además, es usual encontrar reportado en la literatura el uso de reactivos para controlar el tamaño de partícula y evitar la formación de agregados de AgNPs, lo cual es crucial para su uso como antibacterial [3].

En virtud de su tamaño, las AgNPs exhiben una gran área superficial, lo cual favorece su contacto y adhesión a la pared celular de las bacterias, así como la subsecuente penetración de su membrana celular. De hecho, se ha documentado que su eficacia contra bacterias y hongos aumenta a medida que su tamaño cae por debajo de 50 nm [9]. Al respecto, existen estudios a cerca de la actividad bactericida de las AgNPs contra bacterias gram-negativas, en donde se indica que nanopartículas con un tamaño de entre 1 y 10 nm pueden adherirse a la superficie de su membrana celular y modificar su permeabilidad y respiración [10]. Además, las AgNPs pueden liberar iones  $\text{Ag}^+$  en dispersión acuosa, que penetran la pared celular de bacterias gram-negativas y gram-positivas e infringen un daño adicional a las bacterias [11]. Los cationes  $\text{Ag}^+$  son un ácido de Lewis débil que tienen afinidad con los grupos funcionales fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), tiol (R-SH) y amino ( $\text{NH}_2$ ), por lo que puede inhibir la capacidad del ADN de la bacteria para replicarse y así como también desactivar sus proteínas [11,12].

No obstante, una de las principales preocupaciones sobre el uso de AgNPs en aplicaciones como las antes mencionadas es su toxicidad. La citotoxicidad que estas nanopartículas presentan en medio acuoso es dependiente del tamaño y se debe principalmente a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), como el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), en soluciones aeróbicas [13]. La reducción del oxígeno asociada con la generación de ROS ocurre a través de una reacción redox de varias etapas, que incluye la protonación y ruptura de enlaces [14]. En el esquema 1 se muestra de forma simplificada las posibles rutas para la reducción del oxígeno, la cual puede ocurrir ya sea por un proceso directo ( $k_1$ ) o por pasos ( $k_2$ ), en donde se forma  $\text{H}_2\text{O}_2$  como intermediario. Como se ilustra, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede reducirse electroquímicamente ( $k_3$ ) o sufrir una descomposición catalítica para formar  $\text{H}_2\text{O}$  y oxígeno ( $k_{\text{het}}$ ).

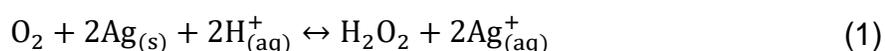


**Figura 1.** Posibles rutas de la reducción del oxígeno.

Como se ha indicado en la literatura, la reducción del oxígeno bajo condiciones alcalinas y en presencia de Ag ocurre a través de  $k_1$  [15]; mientras que pH más bajos, el número total de electrones transferidos a cada molécula con oxígeno cae a  $n = 3.3$  o  $2$  para  $\text{pH} = 5.8$  o  $1$ , respectivamente [16,17]. Esto sugiere que la reducción de oxígeno en ambientes biológicos (con pH cercanamente neutro) puede ocurrir a través de  $k_2$  y producir ROS. Esta reducción se da en la superficie de las partículas de Ag mediante un mecanismo mixto que involucra la oxidación de  $\text{Ag}^0$  a  $\text{Ag}^+$ , así como la reducción de oxígeno en  $\text{H}_2\text{O}_2$  y subsecuente formación de  $\text{H}_2\text{O}$ ; lo que es factible siempre y cuando el tamaño de partícula de Ag sea cercano a  $1 \mu\text{m}$  [13,17]. Para partículas de menor tamaño, el oxígeno es

mayormente reducido para formar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que difunde rápidamente a través del medio de dispersión, lo que impide su eventual reducción a H<sub>2</sub>O.

Ahora bien, en medio biológicos las AgNPs pueden aglomerarse entorno a la pared de células sanas, en virtud de la interacción de Ag<sup>+</sup> en su superficie con grupos R-SH de las proteínas [9,18]. Esta aglomeración provoca que el proceso de generación de ROS sea localizado e incrementa sustancialmente la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las inmediaciones o incluso en el interior de las células. La interacción entre grupos R-SH y Ag<sup>+</sup> resulta en la formación de complejos de coordinación que causan que el equilibrio de la reacción redox en la que participan Ag y el oxígeno se corra a la derecha de [13]:



Esto anterior indica que la generación de ROS en medios acuosos aeróbicos debido a la oxidación de la superficie de AgNPs induce un significativo estrés oxidativo y localizado de células sanas, como ha sido reportado para el caso de células alveolares de pulmón, algunas líneas celulares de hígado, tejido cerebral y células germinales [18–21].

Con la finalidad de abatir los efectos negativos de las AgNPs se ha propuesto su modificación superficial con agentes como el citrato de sodio (CIT), polivinilpirrolidona (PVP), polietilenimina (PEI) y silicato (Si) [22–25]. La efectividad de estos recubrimientos se ha validado usando como modelo fauna marina como *Danio rerio* (pez cebra), *Oncorhynchus mykiss* (trucha arcoíris), *Daphnia magna* (un tipo de crustáceo planctónico) y *Chlorococccum infusionum* (alga verde). De estos estudios se ha concluido que el recubrimiento de AgNPs con PVP disminuye la inducción *in vivo* de toxicidad en medio biológico, mismo que se expresa de manera negativa en la replicación del ADN; y afecta principalmente el tracto digestivo y branquias del *Danio rerio* [22]. Este resultado es congruente con lo reportado de estudios en que se usó *Oncorhynchus mykiss* como modelo,

ya que las AgNPs con un recubrimiento de carga neutra como el PVP y Si presentan un menor efecto tóxico e inflamatorio que aquellas funcionalizadas con moléculas con carga negativa o positiva como el CIT y PEI, respectivamente [23]. No obstante, para el caso de *Daphnia magna* es el recubrimiento de AgNPs con CIT en donde se observa una nula expresión de estrés oxidativo relacionada con daño en el ADN, comparado con PVP [24]. Sin embargo, un resultado interesante de este tipo de trabajos es que, a pesar de su recubrimiento, las nanoestructuras basadas en Ag presentan una citotoxicidad dependiente del área superficial expuesta al medio biológico [25].

En consideración de esto, y a fin de que el uso de nanomateriales basados en AgNPs se viable en aplicaciones biomédicas, es necesario buscar nuevas estrategias para aminorar los efectos tóxicos derivados del estrés oxidativo que éstas inducen. En este sentido, se ha propuesto la síntesis de materiales compósitos a través de rutas de química verde. A continuación, se describirán algunas de las aproximaciones reportadas en la literatura.

### **1.3. Síntesis verde de compósitos basados en AgNPs**

De acuerdo con su definición, la química verde implica el diseño, desarrollo y aplicación de productos químicos y procesos para reducir o eliminar el uso o generación de sustancias peligrosas para la salud humana y el medio ambiente. Al respecto se ha reportado la síntesis de AgNPs desde soluciones de extracto de té verde o de epicatequina, usando dichas sustancias como agentes reductores y surfactantes [26]. Como lo sugieren los resultados obtenidos, la adhesión de estos polifenoles a la superficie de las AgNPs reduce considerablemente la generación de ROS al interior de células como los queratinocitos humanos, debido en gran medida a sus características antioxidantes.

Asimismo, se ha sugerido de polímeros naturales o semi-sintéticos como el quitosán, celulosa y carboximetil-celulosa (CMC) para la síntesis verde de compósitos basados en AgNPs [27–29]. Por ejemplo, se ha indicado la síntesis de compósitos de quitosán/AgNPs y CMC/AgNPs usando el galato de epigallocatequina (EGCG) como agente reductor [30,31]. La reducción de AgNPs con EGCG provee al compósito de características bactericidas y citotóxicas adecuadas para su uso en medios biológicos o incluso su ingesta.

La CMC es un polisacárido semi-sintético derivado de la celulosa que se obtiene de la sustitución parcial de sus grupos hidroximetilos ( $RCH_2OH$ ) por carboximetilos ( $RCOOH$ ) [32]. El grado de sustitución (DS) de  $RCH_2OH$  por  $RCOOH$  normalmente se reporta como un promedio de grupos carboximetilos por unidad repetitiva del polisacárido. La CMC se comercializa como una sal de sodio ( $RCOONa$ ) soluble en medio acuoso, que puede cargarse con iones metálicos como  $Ag^+$  a partir de una reacción de desplazamiento de  $Na^+$  [33].

En virtud de ello, la CMC ha sido usada exitosamente para la síntesis totalmente ecológica de AgNPs, debido a su solubilidad en medios acuosos, abundantes grupos hidroxilo ( $R-OH$ ) y la presencia de grupos carboximetilo ( $R-CH_2COO^-$ ) [34]. Este proceso de síntesis consiste en un solo paso y no emplea o produce agentes tóxicos, ya que se logra desde disoluciones acuosas de nitrato de plata ( $AgNO_3$ ) y CMC. Se ha documentado que siguiendo esta ruta de síntesis es posible la obtención de compósitos basados en AgNPs dispersas en CMC, con distribuciones de tamaño de partícula estrechas aún a relaciones en peso CMC/ $AgNO_3$  tan altas como 23.8.

De hecho se ha reportado la habilidad de estos compósitos para inhibir la proliferación de bacterias gram-positivas y -negativas como lo son el *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*, respectivamente, con una citotoxicidad adecuada [35]. Sin embargo, a la fecha, no existe evidencia experimental a cerca del rol de la estructura molecular de polisacáridos como la

CMC en la actividad bactericida y citotoxicidad de compósitos basados en AgNPs. En consideración de ello, a continuación, se planteará la hipótesis y objetivo de este trabajo de investigación.

#### **1.4. Hipótesis y objetivo**

##### 1.4.1. Hipótesis

La hipótesis que sustenta este trabajo de investigación es: “La estructura molecular de la carboximetil-celulosa determinará la actividad bactericida y citotoxicidad de compósitos basados en nanopartículas de plata inmovilizadas en el polisacárido”.

##### 1.4.2. Objetivo

Descripción de la actividad bactericida y citotóxica de compósitos basados en nanopartículas de plata y carboximetil-celulosa, sintetizados a partir de una ruta de química verde, que implica el uso de polisacáridos con distintos grados de sustitución y pesos moleculares como agente reductor e inmovilizador.

## 2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

### 2.1. Introducción

Como se indicó en el capítulo anterior, en este trabajo de tesis se llevó a cabo la síntesis de materiales compósitos basados en nanopartículas de plata y carboximetil-celulosa, a partir de la reducción de sales de plata en soluciones acuosas de dicho polisacárido; para su posterior caracterización cristalina, morfológica, espectroscópica y de sus propiedades bactericidas y citotóxicas. De manera general, la síntesis de estos compósitos se realizó mezclando soluciones acuosas de nitrato de plata y CMC en distintas concentraciones, a fin de obtener compósitos con distintas relaciones en peso CMC/Ag; haciendo uso de CMC con diferentes grados de sustitución como agente reductor de los iones  $\text{Ag}^+$  en solución y como estabilizante para el control de tamaño de partícula.

En este capítulo se presentará la metodología seguida para la síntesis del material compósito; y se detallarán las técnicas de caracterización empleadas para su estudio. Asimismo, se describirá la metodología seguida para la evaluación de su actividad bactericida y de su citotoxicidad. Es importante señalar que la actividad bactericida se determinó a partir de la concentración mínima inhibitoria de los compósitos CMC-AgNPs contra *Enterococcus faecalis*, clasificada como una bacteria tipo Gram-positiva comensal, que habita el tracto gastrointestinal de humanos y otros mamíferos; y su citotoxicidad a partir de la concentración media máxima de inhibición, usando un modelo celular de fibroblastos gingivales humanos.

## 2.2. Síntesis de los compósitos CMC/Ag

### 2.2.1. Materiales

Para la síntesis de los compósitos desarrollados en este trabajo de tesis se usó CMC con DS= 0.7 y peso molecular de  $M_w = 90$  kDa (0.7CMC), CMC con DS = 0.9 y  $M_w = 250$  kDa (0.9CMC), CMC con DS = 1.2 y  $M_w = 250$  kDa (1.2CMC) y nitrato de plata ( $AgNO_3$ ), adquiridos con la compañía Sigma-Aldrich y usados tal como se recibieron. Para preparación de todas las soluciones usadas en la síntesis de estos compósitos se usó agua desionizada (Barnstead EASYpure II system with  $\rho = 13$  M $\Omega$ -cm).

### 2.2.2. Metodología de síntesis

La síntesis de los compósitos se llevó a cabo de acuerdo al ~~a partir del~~ siguiente protocolo experimental:

1. Preparar dos soluciones en acuosas, la primera de CMC a una concentración de 15 mg/mL, disolviendo 1.5 g del polisacárido en agua desionizada y aforando a 100 mL; y otra de  $AgNO_3$  a una concentración de entre 0.24 y 1.26 mg/mL, disolviendo la masa indicada en la Tabla 1 en agua desionizada y aforando a 10 mL.
2. Verter 20 mL de la solución acuosa de CMC en un matraz de tres bocas (reactor) y agitar vigorosamente a temperatura ambiente.
3. Verter 10 mL de la solución acuosa de  $AgNO_3$  al reactor con la solución de CMC y agitar vigorosamente durante 20 min.
4. Incrementar de la solución resultante del paso anterior a una temperatura a 90 °C y mantener la reacción a esta temperatura y bajo condiciones de reflujo de agua durante 24 horas.
5. Enfriar de manera natural hasta alcanzar la temperatura ambiente, para posteriormente congelar la solución resultante a una temperatura de -50

°C, haciendo uso de hielo seco (CO<sub>2</sub> sólido) y secar el material mediante liofilización a una presión de 0.16 mbar (muestras sólidas).

6. Pesar el material resultante a fin de preparar dispersiones a concentración conocida según se requiera para su posterior caracterización.

Siguiendo esta metodología fue posible la obtención de compósitos CMC/AgNPs con relaciones en peso de 200, 100, 50 y 37.5, correspondientes a la síntesis de 1.5, 3, 6 y 8 mg de AgNPs en CMC, respectivamente (véase Tabla 1). El cálculo de estas relaciones en peso se realizó considerando la completa reducción de Ag<sup>+</sup> a Ag<sup>0</sup>, de manera que, por ejemplo, para el caso de las muestras con relación CMC/AgNO<sub>3</sub> = 124.5 se tiene que:

$$m \text{ AgNO}_3 = 2.41 \text{ mg}$$

$$n \text{ AgNO}_3 = (2.41 \times 10^{-3} \text{ g}) / (160.87 \text{ g/mol}) = \mathbf{1.5 \times 10^{-5} \text{ mol}}$$

suponiendo total reducción de Ag:

$$\mathbf{n \text{ Ag} = n \text{ AgNO}_3}$$

$$m \text{ Ag} = n \text{ AgNO}_3 \times A \text{ Ag} = (1.5 \times 10^{-5} \text{ mol}) (107.9 \text{ g/mol}) (1000 \text{ mg/g}) = \mathbf{1.5 \text{ mg}}$$

La relación en peso CMC/AgNPs obtenida fue corroborada a partir de técnicas espectroscópicas en las que se pudo observar la ausencia de trazas atribuibles a Ag<sup>+</sup>. Los resultados de este estudio serán presentados y discutidos en el siguiente capítulo de este trabajo de tesis.

### 2.2.3. Caracterización de compósitos CMC/AgNPs

La caracterización morfológica y cristalina de las muestras de materiales compósitos se realizó por microscopía electrónica de transmisión (TEM) en un microscopio de emisión de campo (FEG) marca FEI, modelo Titan G2 80-300,

utilizando las técnicas de imagen en campo claro (BF), campo oscuro anular de ángulo amplio (HAADF-STEM), así como difracción de electrones (SAED) y análisis elemental mediante espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (XEDS). Para ello, una pequeña porción de cada muestra seca fue dispersa en agua desionizada, para luego diluirse y colocar una alícuota de dicha dilución en rejillas de Cu recubiertas con C amorfo con patrón “lacey” (lacey-carbon Cu-grids).

**Tabla 1.** Reactivos usados en la síntesis de cada muestra de material compuesto

<b>Nombre Muestra</b>	<b>Masa AgNO<sub>3</sub> (mg)</b>	<b>[AgNO<sub>3</sub>] (mg/mL)</b>	<b>Masa CMC (mg)</b>	<b>[CMC] (mg/mL)</b>	<b>Relación en peso CMC/AgNO<sub>3</sub></b>	<b>Relación en peso CMC/Ag</b>
1.2CMC1	2.41	0.24	300	15	124.5	200.0
1.2CMC2	4.82	0.48	300	15	62.2	100.0
1.2CMC3	9.45	0.94	300	15	31.8	50.0
1.2CMC4	12.59	1.26	300	15	23.8	37.5
0.9CMC1	2.41	0.24	300	15	124.5	200.0
0.9CMC2	4.82	0.48	300	15	62.2	100.0
0.9CMC3	9.45	0.94	300	15	31.8	50.0
0.9CMC4	12.59	1.26	300	15	23.8	37.5
0.7CMC1	2.41	0.24	300	15	124.5	200.0
0.7CMC2	4.82	0.48	300	15	62.2	100.0
0.7CMC3	9.45	0.94	300	15	31.8	50.0
0.7CMC4	12.59	1.26	300	15	23.8	37.5

La caracterización espectroscópica de las muestras se realizó por la técnica de espectroscopia de UV-vis (UV-vis), en un espectrómetro Agilent Technologies, modelo UV-Vis-NIR Cary series 5000, en un intervalo de longitud de onda de entre 200 y 800 nm. Para ello se prepararon dispersiones acuosas de las muestras, partiendo de una concentración de 60 mg/mL y preparando diluciones según se requiriera, a fin de obtener espectros cuya absorbancia máxima fuera menor o igual a 1, haciendo uso de celdas de cuarzo para espectroscopia.

Las interacciones entre CMC y AgNPs en las muestras de compósitos fueron evaluadas mediante las técnicas de espectroscopia de infrarrojo (ATR-FTIR) y Raman en espectrómetros Perkin Elmer, modelos Frontier MIR FT-IR Spectrometer, Universal ATR y DXR Raman microscope, respectivamente; así como por espectroscopia foto-electrónica de rayos X (XPS), en un espectrómetro Thermo-Scientific, modelo K-Alpha; a partir de la medición de muestras sólidas. Los espectros de ATR-FTIR se obtuvieron en un intervalo de número de onda de entre 4000 y 800  $\text{cm}^{-1}$ . Los espectros Raman se adquiriendo luego de 60 s de exposición, con un tiempo de adquisición de 90 s y usando una radiación con longitud de onda de 532 nm. Finalmente, los espectros C1s, O1s y Ag3d de las muestras se obtuvieron por XPS a partir de radiación Al-K $\alpha$  (E = 1.5 keV) y un tamaño de rendija (spot) de 400  $\mu\text{m}$ .

### **2.3. Ensayos de actividad bactericida y citotoxicidad.**

#### 2.3.1. Preparación se especímenes

Como lo muestra la tabla 1, el contenido en peso de AgNPs en cada muestra sintetizada de compósito es distinto. A fin de evaluar la actividad bactericida y citotoxicidad, y asociarlas con las características morfológicas de las AgNPs, es necesario que cada uno de los especímenes para estos ensayos contengan el mismo contenido en peso de nanopartículas. Para ello, se prepararon dispersiones coloidales de los materiales compósitos a una concentración [AgNPs] = 60  $\mu\text{g/mL}$ . La tabla 2 muestra la concentración de compósito [CMC/AgNPs] en solución para la cual se cuenta, en cada caso, con la concentración parcial [AgNPs] = 60  $\times 10^{-3}$  mg/mL en dispersión acuosa. A continuación, se muestra un ejemplo de la manera en la que fue calculada [CMC/AgNPs] a fin de obtener [AgNPs] = 60  $\times 10^{-3}$  mg/mL, a saber:

$$[\text{CMC}/\text{AgNPs}] = [\text{AgNPs}] \left( \frac{m_{\text{CMC}+\text{AgNPs}}}{m_{\text{AgNPs}}} \right)$$

$$[\text{CMC}/\text{AgNPs}] = 60 \times 10^{-3} \text{ mg/mL} \left( \frac{301.5 \text{ mg}}{1.5 \text{ mg}} \right)$$

$$[\text{CMC}/\text{AgNPs}] = 12 \text{ mg/mL}$$

**Tabla 2.** Concentraciones [CMC/AgNPs] de las dispersiones de material compuesto usadas para las pruebas biológicas.

Nombre Muestra	Masa CMC (mg)	Masa de AgNPs (mg/mL)	[AgNPs] ( $10^{-3}$ mg/mL)	[CMC/AgNPs] (mg/mL)
1.2CMC1	300	1.5	60	12.0
1.2CMC2	300	3.0	60	6.0
1.2CMC3	300	6.0	60	3.0
1.2CMC4	300	8.0	60	2.3
0.9CMC1	300	1.5	60	12.0
0.9CMC2	300	3.0	60	6.0
0.9CMC3	300	6.0	60	3.0
0.9CMC4	300	8.0	60	2.3
0.7CMC1	300	1.5	60	12.0
0.7CMC2	300	3.0	60	6.0
0.7CMC3	300	6.0	60	3.0
0.7CMC4	300	8.0	60	2.3

### 2.3.2. Actividad bactericida

Para realizar la evaluación de la actividad bactericida de los compósitos CMC/AgNPs (tratamiento) se usó el método estándar de micro dilución en caldo. La concentración mínima inhibitoria (MIC) del tratamiento contra *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) se determinó en una microplaca de 96 pozos que contenían 50  $\mu\text{L}$  de diluciones de compósitos CMC/AgNPs de concentración [AgNPs] de

entre 3.75 y 60 ~~60 a 3.75~~ µg/mL en medio de Infusión Corazón Cerebro (BHI) (Becton Dickinson Bioxon); y 50 µL de *E. faecalis* (ATCC® 29212™) a 1.0×10<sup>8</sup> CFU/mL, para completar un volumen de 100 µL por pozo. De manera adicional, se usó ampicilina a una concentración de 5 µg/mL como control positivo para la inhibición del crecimiento bacteriano, mientras que el medio BHI sin tratamiento se usó como control negativo para esta evaluación. Los cultivos preparados se incubaron a 37°C por 24 horas en una atmosfera aeróbica. El crecimiento bacteriano se estimó a partir de la absorbancia de cada uno de los cultivos a 595 nm, usando un lector de microplacas iMark™ (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA). El porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = 100 - \left\{ \left[ \frac{(\text{muestra} - \text{control positivo})}{(\text{control negativo} - \text{control positivo})} \right] \times 100 \right\} \quad (2)$$

En este estudio, la MIC se consideró como la concentración más baja de CMC/AgNPs en tratamiento que inhibió el 99% del crecimiento de bacterias.

### 2.3.3. Citotoxicidad

La citotoxicidad de los compósitos CMC/AgNPs (tratamiento) se evaluó usando como modelo celular a los fibroblastos gingivales humanos (ATCC®PCS-201-018™), a partir de un ensayo de viabilidad celular con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), también conocido como ensayo MTT. La línea celular fue cultivada en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), suplementado con 10% de FBS, 1X de antibiótico-antimicótico y 6 mM de L-glutamina (también llamado DMEM-completo), a 37 °C por 48 horas en una atmosfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Luego, 100 µL de DMEM-completo conteniendo 5 x 10<sup>4</sup> células viables se depositaron en cada uno de los 96 pozos de una microplaca con fondo plano y se dejaron crecer hasta alcanzar una confluencia de aproximadamente 90%. Entonces, 100 µL de diluciones de

CMC/AgNPs con concentración [AgNPs] de entre 60 a 3.75  $\mu\text{g/mL}$  fueron agregadas a cada pozo e incubadas por 24 horas. Para esta evaluación el Triton X-100 al 2% y DMEM-completo fueron usados como control positivo y negativo, respectivamente. Después de la incubación, el sobrenadante en los pozos se descartó y las células fueron lavadas cuidadosamente con PBS. Posteriormente se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de una dilución de MTT a 0.5  $\text{mg/mL}$  en DMEM-completo a cada uno de los pozos en la microplaca, para luego ser incubados por 4 horas. Transcurrido este periodo, se descartó el sobrenadante en cada pozo y se disolvieron los cristales de formazan con 200  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido. Finalmente, la absorbancia de cada cultivo fue analizada a 570 nm usando un lector de microplacas. El porcentaje de citotoxicidad se calculó usando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ citotoxicidad} = 100 - \left\{ \left[ \frac{(\text{muestra} - \text{control positivo})}{(\text{control negativo} - \text{control positivo})} \right] \times 100 \right\} \quad (3)$$

## **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

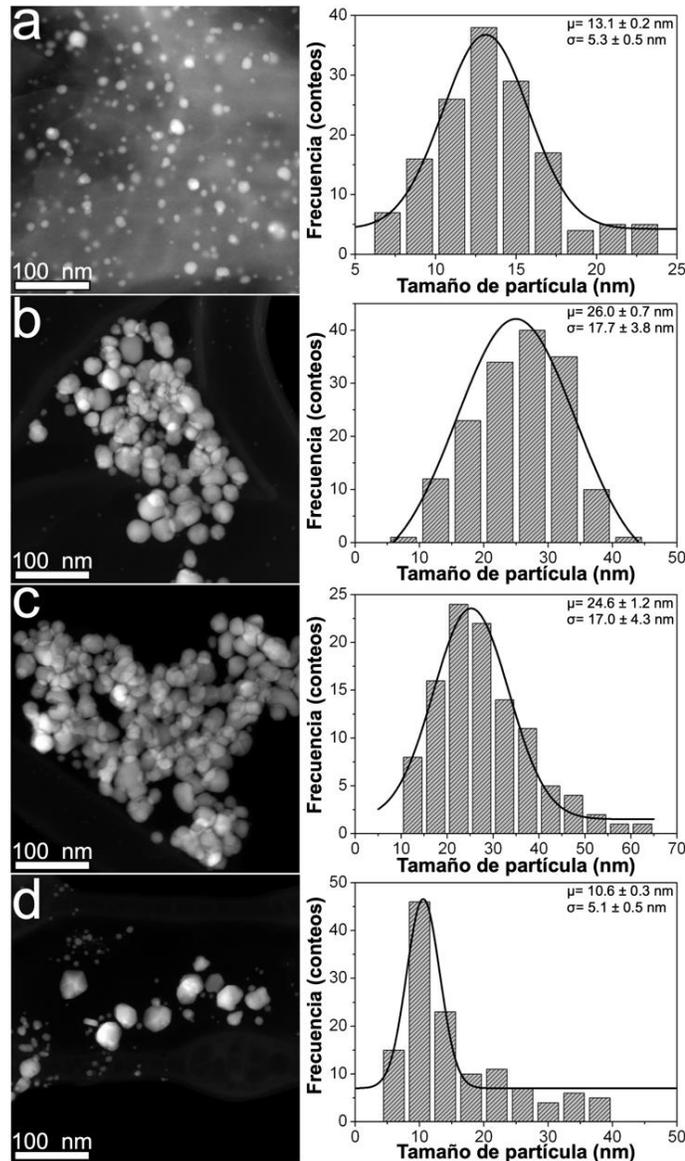
### **3.1. Introducción**

En el presente capítulo se expondrán y discutirán los resultados obtenidos de la caracterización morfológica, cristalina y de composición química de los compósitos CMC/AgNPs sintetizados de acuerdo con la metodología presentada en el capítulo 2. Para ello, primeramente, se abordarán los resultados obtenidos de la caracterización por TEM, mediante las técnicas de BF, HAADF-STEM, SAED y XEDS, de las muestras sintetizadas. Posteriormente se presentará el estudio realizado a las muestras mediante las técnicas espectroscópicas de UV-vis, ATR-FTIR, Raman y XPS. Finalmente se presentarán y discutirán los resultados obtenidos de la evaluación de la actividad bactericida y citotoxicidad de los compósitos CMC/AgNPs.

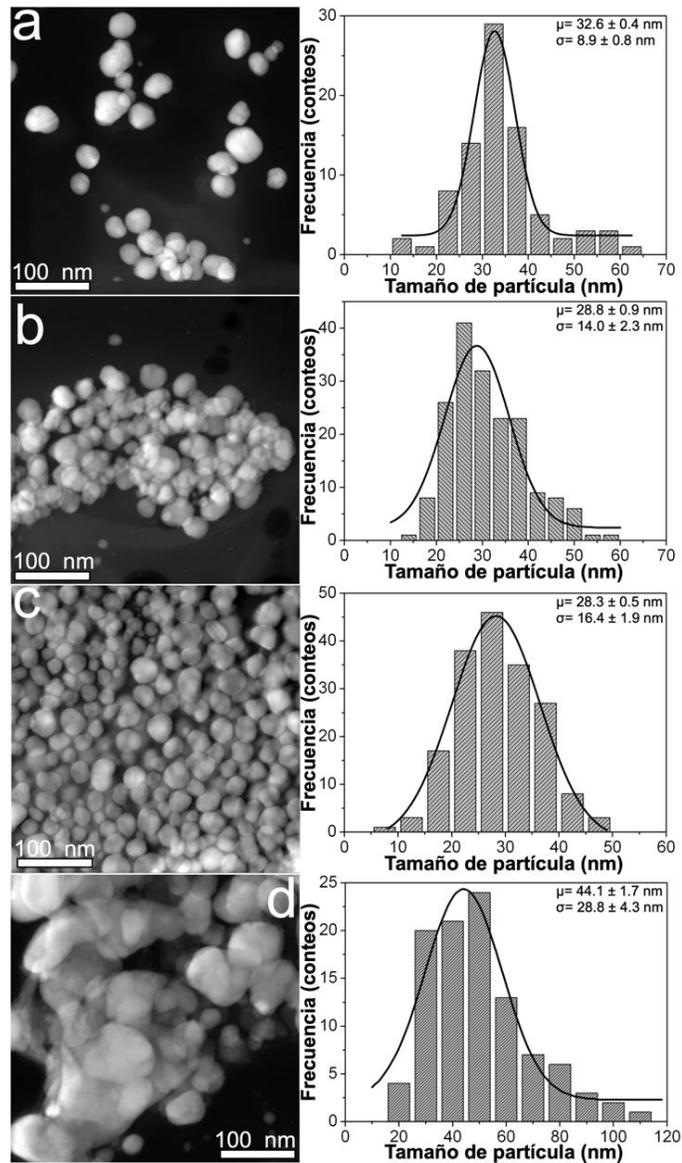
### **3.2. Características morfológicas y cristalinas**

La Figura 2 muestra imágenes de HAADF-STEM obtenidas de las muestras CMC/AgNPs sintetizadas a partir de 0.7CMC. En esta figura también se muestra el ajuste de los datos experimentales obtenidos de la medición de tamaño de partícula al modelo estadístico de Gauss. Los datos experimentales fueron obtenidos de la medición de al menos 300 partículas aleatoriamente seleccionadas de distintas zonas analizadas de cada muestra. Como se observa en la Figura 2a, las nanopartículas en 0.7CMC1 muestran una morfología cuasi-esférica, así como una distribución de tamaño de partícula centrada en 13.1 nm, con una desviación estándar de 5.2 nm. No obstante, la distribución estadística obtenida para 0.7CMC2 y 0.7CMC3 están centradas en tamaños de partículas mayores a 26 y 24.6 nm, respectivamente; además de ser más anchas, con desviaciones estándar de 17.7 y 17.0 nm, respectivamente (véase Figuras 2b y 2c). Asimismo, estas muestras denotan un cambio en la morfología de las nanopartículas, de cuasi-esférica a una poligonal. Este tipo de morfología

también se observa en las nanopartículas del compuesto 0.7CMC4, junto a una gran población de pequeñas nanopartículas con un tamaño medio de 10.6 nm y desviación estándar de 5.1 nm. El cambio en la distribución de tamaño de partícula y su morfología podría relacionarse con la disminución en la habilidad de la CMC para controlar el crecimiento de las nanopartículas, como resultado del aumento en el contenido en peso de  $\text{AgNO}_3$  agregado para la síntesis de cada estas muestras (véase Tabla 1).



**Figura 2.** Imágenes de HAADF-STEM obtenidas de las muestras de compósitos: (a) 0.7CMC1; (b) 0.7CMC2; (c) 0.7CMC3; y (d) 0.7CMC4. También se muestra la distribución de tamaño de partícula de cada muestra, a la izquierda de su correspondiente imagen de HAADF-STEM.



**Figura 3.** Imágenes de HAADF-STEM obtenidas de las muestras de compósitos: (a) 0.9CMC1; (b) 0.9CMC2; (c) 0.9CMC3; y (d) 0.9CMC4. También se muestra la distribución de tamaño de partícula de cada muestra, a la izquierda de su correspondiente imagen de HAADF-STEM.

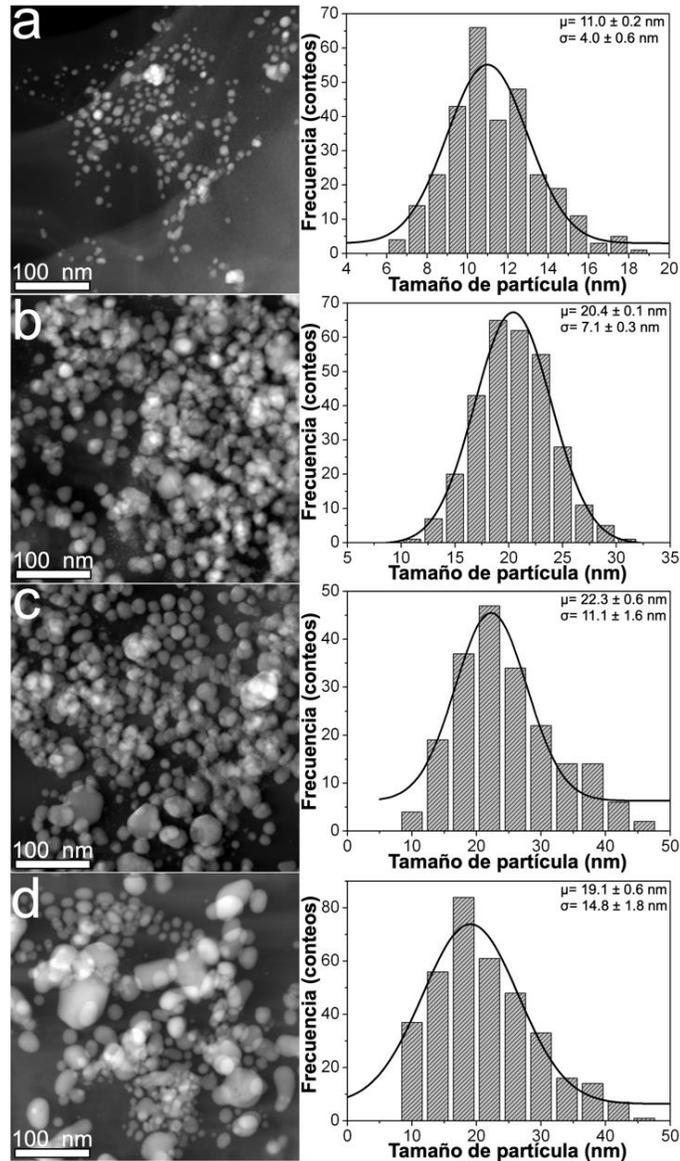
En la Figura 2 se ilustran las características morfológicas de los compósitos obtenidos a partir de soluciones acuosas de 0.9CMC. En este caso se observa que el tamaño de partícula medio disminuye de 32.6 a 28.3 nm como resultado del aumento en el peso de  $\text{AgNO}_3$  agregado para la síntesis de 0.9CMC1, 0.9CMC2 y 0.9CMC3 (véase Tabla 1); mientras que su desviación estándar

aumenta de 8.9 a 16.4 nm (véase Figuras 3a - 3c). Además, las nanopartículas en 0.9CMC4 muestran un aumento tanto en su tamaño medio (44.1 nm), como en su desviación estándar (28.8 nm) (véase Figura 3d). Más aún, en la Figura 3d se observa la formación de agregados de nanopartículas poligonales. De acuerdo con estos resultados, mediante el uso del reactivo 0.7CMC es posible obtener nanopartículas con un menor tamaño medio, pero una mayor desviación estándar que con el reactivo 0.9CMC. Es importante hacer notar que esto ocurre cuando se agrega 2.41, 4.82 o 9.45 mg de  $\text{AgNO}_3$  al medio de reacción.

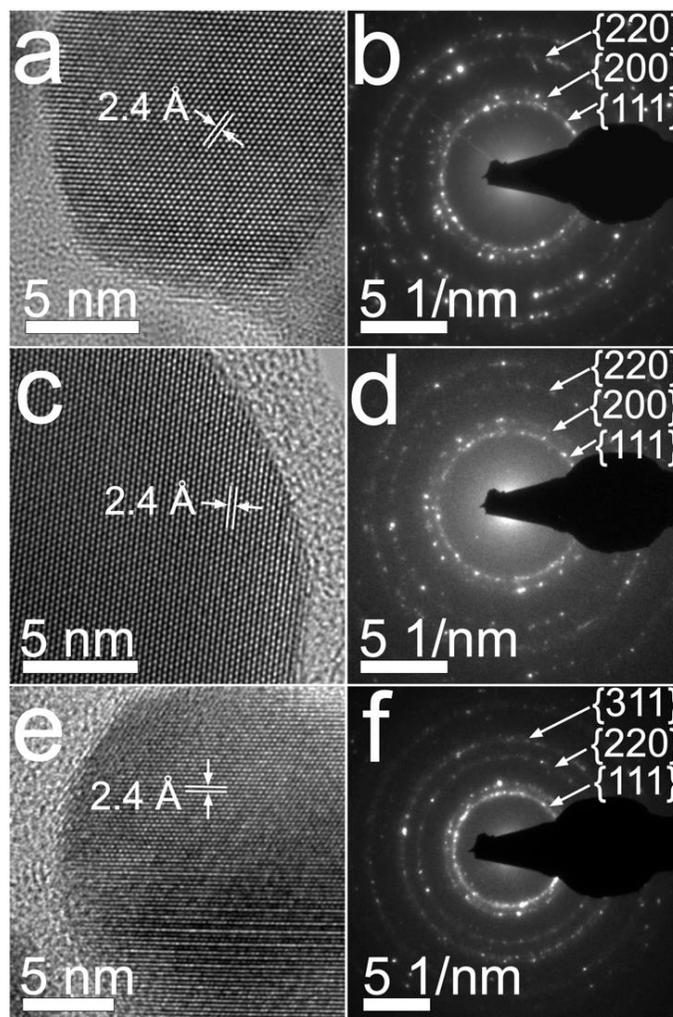
La Figura 4 reporta las características morfológicas de las muestras sintetizadas con el reactivo 1.2CMC. En este caso, el tamaño medio de partícula incrementa de 11.0 a 22.3 nm a medida que el peso de  $\text{AgNO}_3$  agregado para la síntesis de 1.2CMC1, 1.2CMC2 y 1.2CMC3 aumenta (véase Figuras 4a - 4c). Sin embargo, esta tendencia no es seguida por la 1.2CMC4, que muestra un tamaño medio de partícula de 19.1 nm (véase Figura 4d). En la Figura 4d también se observa la presencia de agregados de nanopartículas cuya morfología se asemeja a la vista en la muestra 0.9CMC4. Finalmente, la desviación estándar de este conjunto de muestras varía en proporción directa al incremento del peso de  $\text{AgNO}_3$  agregado para la síntesis de 1.2CMC1, 1.2CMC2, 1.2CMC3 y 1.2CMC4 (véase Tabla 1); y que cubre un intervalo de entre 4.0 y 14.8 nm. Esta evidencia experimental sugiere que el reactivo 1.2CMC provee un mejor control en la distribución de tamaño de partícula que los reactivos 0.7CMC y 0.9CMC a las razones en peso CMC/ $\text{AgNO}_3$  usadas para la síntesis de los compósitos.

La Figura 5 resume las características cristalinas de las muestras preparadas en soluciones acuosas de 0.7CMC, 0.9CMC y 1.2CMC. Como lo muestran las figuras 4a, 4c y 4e, en las nanopartículas en 0.7CMC1, 0.9CMC1 y 1.2CMC1, respectivamente, se observa un arreglo atómico regular, caracterizado por una separación interplanar de 2.4 Å. Esta separación es congruente con la reportada para la familia de planos {111} de la estructura cristalina de Ag (véase JCPDS: 04-0783). Además, en los patrones SAED reportados en las figuras 4b, 4d y 4f

se reconocen anillos de difracción relacionados a las familias de planos {111}, {200}, {220} y {311} que concuerdan con el apilamiento tipo FCC de Ag (véase JCPDS: 04-0783). Esta evidencia confirma la formación de AgNPs en las muestras sintetizadas.



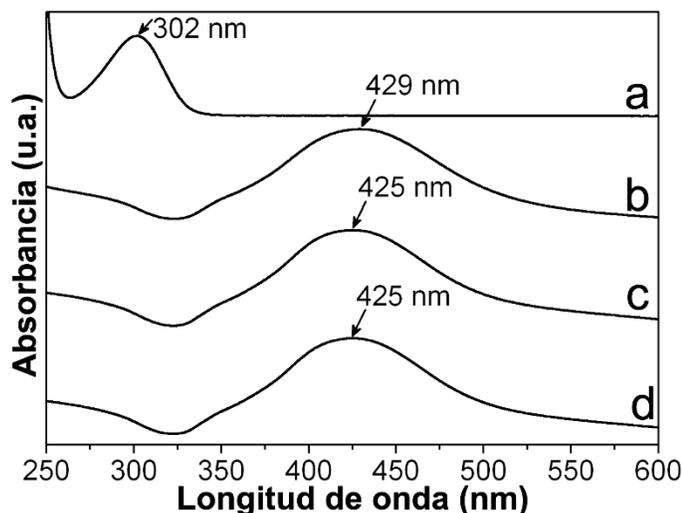
**Figura 4.** Imágenes de HAADF-STEM obtenidas de las muestras de compósitos: (a) 1.2CMC1; (b) 1.2CMC2; (c) 1.2CMC3; y (d) 1.2CMC4. También se muestra la distribución de tamaño de partícula de cada muestra, a la izquierda de su correspondiente imagen de HAADF-STEM.



**Figura 4.** Imágenes de BF y patrones SAED obtenidos de muestras: (a) y (b) 0.7CMC1; (c) y (d) 0.9CMC1; (e) y (f) 1.2CMC1.

No obstante, a fin de corroborar la eficiente reducción de  $\text{Ag}^+$  de acuerdo con la ruta de síntesis seguida en este trabajo, se procedió a medir los espectros de UV-Vis para los compósitos CMC/AgNPs y el reactivo  $\text{AgNO}_3$ . Como se observa en la Figura 6, los espectros obtenidos de CMC/AgNPs no muestran la banda de absorción relacionada a  $\text{Ag}^+$  (véase Figura 5a); en lugar de ello, denotan una banda alrededor de 401 – 425 nm (véase Figura 5b-d). De acuerdo a la literatura, esta banda se relaciona a la resonancia superficial de plasmón (SPR) de las AgNPs [36]. Este resultado indica la completa reducción de  $\text{Ag}^+$  a  $\text{Ag}^0$ , por lo que es posible asegurar que la relación en peso CMC/AgNPs es la indicada en la Tabla 2 para cada una de las muestras sintetizadas (véase sección 2.2.2). Sin

embargo, a fin de obtener más información respecto a la estabilización del tamaño de partícula en los diferentes tipos de CMC usados, es necesaria la evaluación de la manera en que la CMC interactúa con las AgNPs. Por ello, se procedió a la medición de espectros ATR-FTIR de las muestras.

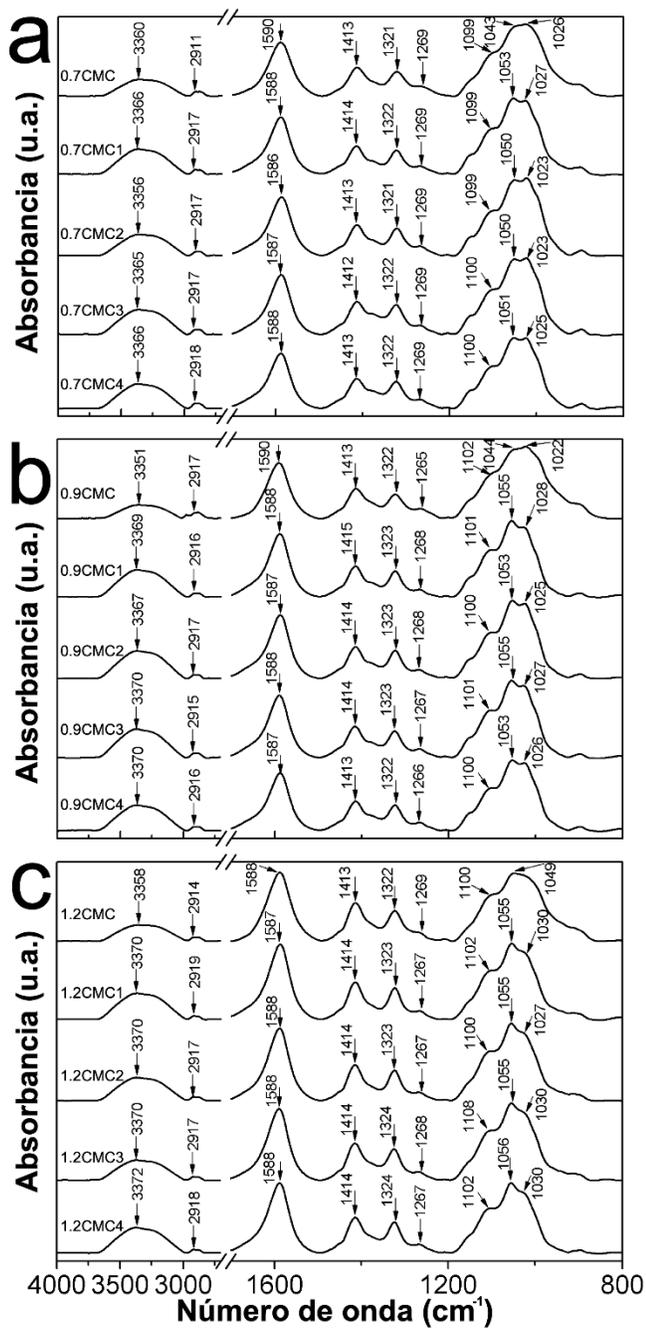


**Figura 5.** Espectros de UV-Vis obtenidos para: (a) AgNO<sub>3</sub>; (b) 0.7CMC4; (c) 0.9CMC4; y (d) 1.2CMC4.

### 3.3. Caracterización espectroscópica

La Figura 7 muestra los espectros obtenidos de los reactivos 0.7CMC, 0.9CMC y 1.2CMC, así como los medidos de los compósitos CMC/AgNPs. La Figura 7a muestra el espectro obtenido de 0.7CMC, en donde se observan bandas de absorción relacionadas a [33,37,38]: estiramiento simétrico y asimétrico del enlace O-H en los grupos hidroxilo (R-OH) a 3360 cm<sup>-1</sup>; estiramiento simétrico del enlace C-H en los grupos hidroximetilo (R-CH<sub>2</sub>OH) a 2911 cm<sup>-1</sup>; estiramientos asimétrico y simétrico del enlace -O-C=O en los grupos carboximetilos (R-CH<sub>2</sub>OCOO<sup>-</sup>) a 1590 y 1413 cm<sup>-1</sup>, respectivamente; flexión de los enlaces -C-CH y O-CH- en los grupos R-CH<sub>2</sub>OCOO<sup>-</sup> a 1321 cm<sup>-1</sup>; estiramiento del enlace C-O en R-CH<sub>2</sub>OCOO<sup>-</sup> a 1269 y 1026 cm<sup>-1</sup>; y estiramiento de los enlaces C-O-C en R-CH<sub>2</sub>OCOO<sup>-</sup> a 1099 y 1043 cm<sup>-1</sup>. En esta figura también se muestran los espectros obtenidos de 0.7CMC1, 0.7CMC2, 0.7CMC3 y 0.7CMC4, en donde se observa

un ligero corrimiento batocrómico en la posición de la banda relacionada al estiramiento asimétrico de O-C=O en R-CH<sub>2</sub>OCOO<sup>-</sup>, de 1590 a 1586 cm<sup>-1</sup>; así como uno hipsocrómico de 1043 a 1053 cm<sup>-1</sup>, de la banda asociada al estiramiento C-O-C en este mismo grupo funcional.

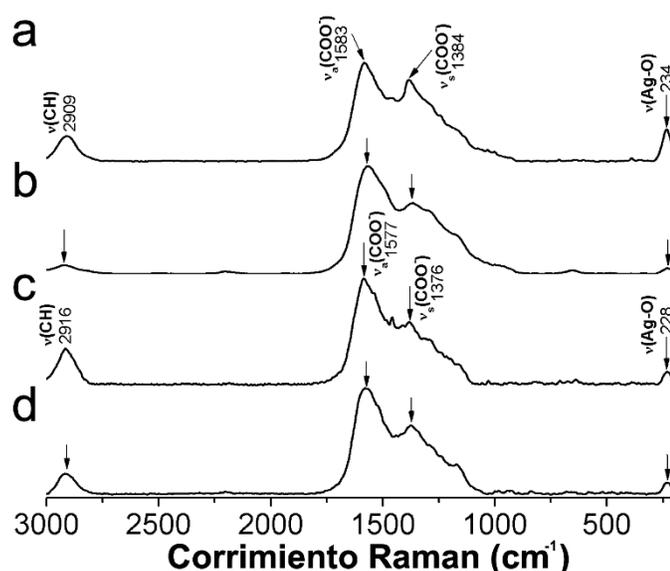


**Figura 6.** Espectros de ATR-FTIR obtenidos de (a) 0.7CMC y sus compósitos; (b) 0.9CMC y sus compósitos; y (c) 1.2CMC y sus compósitos.

Además, la Figura 7b muestra el espectro obtenido de 0.9CMC, así como los medidos de los compósitos sintetizados a partir de este polímero. En el espectro obtenido de 0.9CMC se observan las bandas relacionadas a los estiramientos asimétricos en  $\text{-O-C=O}$  ( $1590\text{ cm}^{-1}$ ) y en los enlaces  $\text{C-O-C}$  ( $1044\text{ cm}^{-1}$ ), los que denotan un corrimiento batocrómico ( $1587\text{ cm}^{-1}$ ), así como uno hipsocrómico ( $1050\text{ cm}^{-1}$ ), respectivamente, en los espectros de los compósitos CMC/AgNPs. Este fenómeno es también observado en los espectros de 1.2CMC1, 1.2CMC2, 1.2CMC3 y 1.2CMC4, caracterizado por un corrimiento en la banda relacionada al estiramiento en  $\text{C-O-C}$ , de  $1049$  a  $1055\text{ cm}^{-1}$  (véase Figura 7c). Estos corrimientos sugieren una interacción entre las cadenas de CMC y las AgNPs, misma que puede atribuirse a la adsorción de los grupos  $\text{R-CH}_2\text{OCOO}^-$  en la superficie de las nanopartículas, tal como se ha propuesto en la literatura [39–41].

A fin de confirmar la adsorción de las cadenas de CMC a la superficie de las AgNPs, se procedió a la medición de los espectros Raman de algunas de las muestras de compósitos CMC/AgNPs. La Figura 8 muestra los espectros obtenidos de 0.7CMC1, 0.7CMC4, 1.2CMC1 y 1.2CMC2. En los espectros se observan bandas relacionadas a modos de vibración de la CMC, tales como el estiramiento de  $\text{C-H}$  a  $2909$  o  $2916\text{ cm}^{-1}$ ; así como los estiramientos asimétrico y simétrico de  $\text{O-C=O}$  a  $1583$  o  $1577\text{ cm}^{-1}$  y  $1384$  o  $1376\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente [40–43]. Además, es posible elucidar un incremento en la intensidad de la dispersión Raman en las bandas asociadas a los estiramientos  $\text{O-C=O}$ , que parece relacionarse con la variación en el contenido en peso de AgNPs en las muestras de compósito. El incremento en la intensidad de estas bandas fue evaluado considerando la intensidad de la banda atribuida al estiramiento de  $\text{C-H}$ . Como se ha documentado en la literatura, el incremento en la intensidad de la dispersión Raman relacionada a la vibración en grupos carboxilos ( $\text{COO}^-$ ) se debe al fenómeno SERS (surface enhanced Raman scattering), que es inducido por SPR de nanopartículas metálicas adheridas a dichos grupos funcionales [44]. Más aún, se detecta una banda a  $234$  o  $228\text{ cm}^{-1}$ , atribuible a la vibración  $\text{Ag-O}$

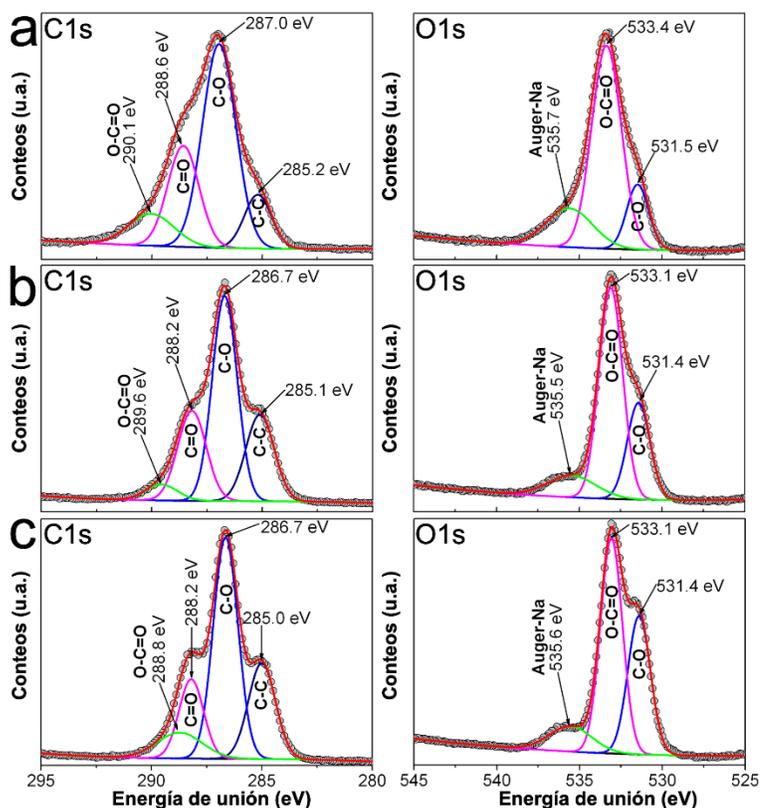
[45,46]. Estos resultados confirman la adsorción de las cadenas de CMC en las AgNPs, y sugieren que ésta ocurre debido a la formación de un enlace Ag-O entre las nanopartículas y el oxígeno en el grupo  $\text{COO}^-$  de la CMC [45].



**Figura 7** Espectros Raman medidos de las muestras (a) 0.7CMC1; (b) 0.7CMC4; (c) 1.2CMC1; y (d) 1.2CMC2.

A fin de obtener más información respecto a la formación de este enlace, se realizó la medición de los espectros C1s, O1s y Ag3d mediante XPS para 0.7CMC, 0.9CMC y 1.2CMC; así como también de algunos de los compósitos CMC/AgNPs. Es importante señalar que, para su adecuado análisis, los picos obtenidos de los espectros C1s y O1s fueron deconvolucionados y ajustados usando el modelo Gaussiano. Al respecto, la Figura 9a muestra los espectros C1s y O1s obtenidos de 0.7CMC. En el espectro C1s se observan cuatro picos a 285.2, 287.0, 288.6 y 290 eV, correspondientes a C en enlaces C-C, C-O, C=O y O-C=O, respectivamente. Además, se identifican tres picos en su espectro O1s, relacionados a C-O, O-C=O y electrones Auger de Na en muestra, a 531.5, 533.4 y 535.7 eV, respectivamente. Asimismo, los espectros C1s medidos de 0.9CMC y 1.2CMC fueron deconvolucionados en cuatro picos a 285.0 eV (C-C), 286.7 eV (C-O), 288.2 eV (C=O) y 289.6 o 288.8 (O-C=O); mientras que sus espectros O1s muestran picos a 531.4 eV (C-O), 533.1 eV (C=O) y 535.6 eV (Auger-Na) (véase

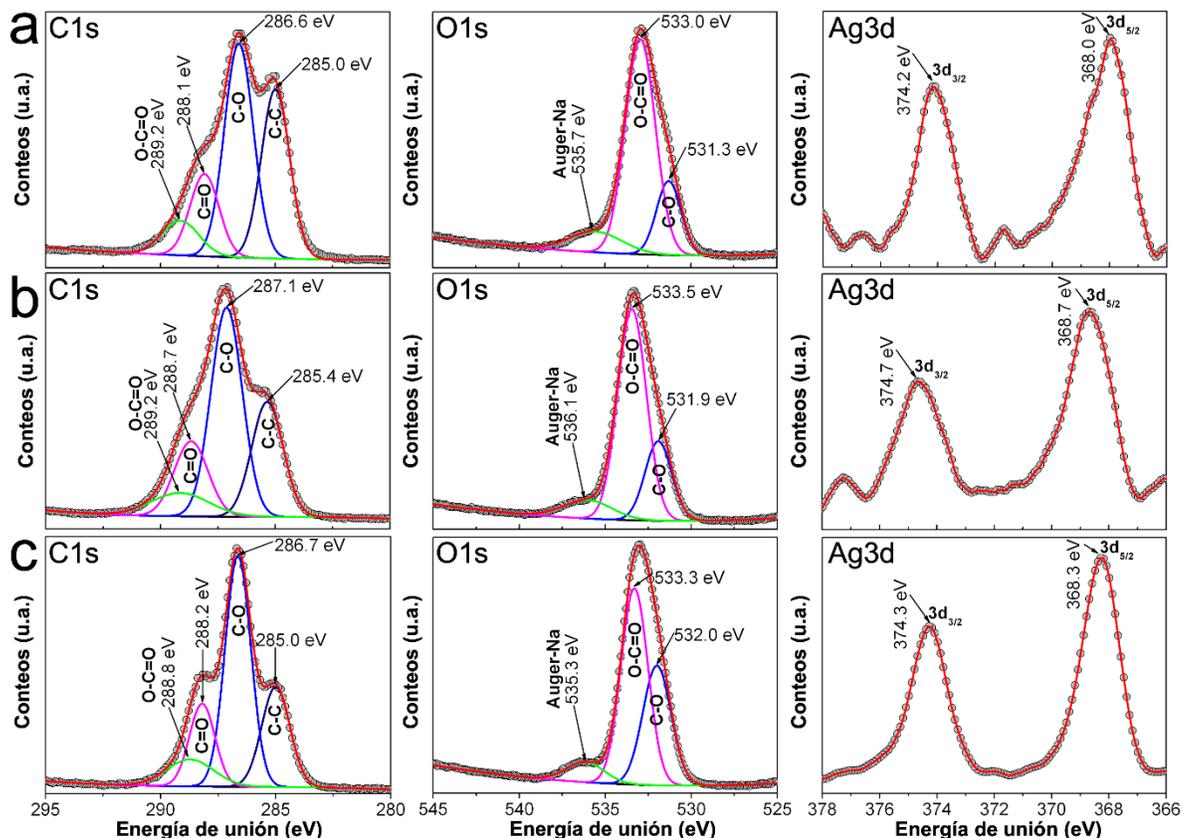
figuras 9b y 9c). Estas señales concuerdan con las esperadas para la estructura molecular de estos polisacáridos [47,48].



**Figura 8.** Espectros C1s y O1s medidos por la técnica XPS para (a) 0.7CMC; (b) 0.9CMC; y (c) 1.2CMC.

La Figura 10 muestra los espectros C1s, O1s y Ag3d medidos para 0.7CMC1, 0.9CMC1 y 1.2CMC1. En el espectro C1s de estas muestras se observan picos relacionados a enlaces C-C, C-O, C=O y O-C=O, congruentes con los esperados para las cadenas de polisacárido; aunque estos denotan un corrimiento en su energía de unión, tomando como referencia la de cada señal medida para los reactivos CMC; además de un cambio en la intensidad de cada una de estas señales (cantidad de foto-electrones emitidos desde la muestra). Según se observa, el cambio en la energía de unión cubre un intervalo de entre 0.2 y 0.9 eV; y es más evidente para las señales asociadas a enlaces C=O y O-C=O en 0.7CMC1 y 0.9CMC1 (véase figuras 10a y 10b). Además, los espectros O1s obtenidos para estas muestras denota cambios en la energía de unión en las

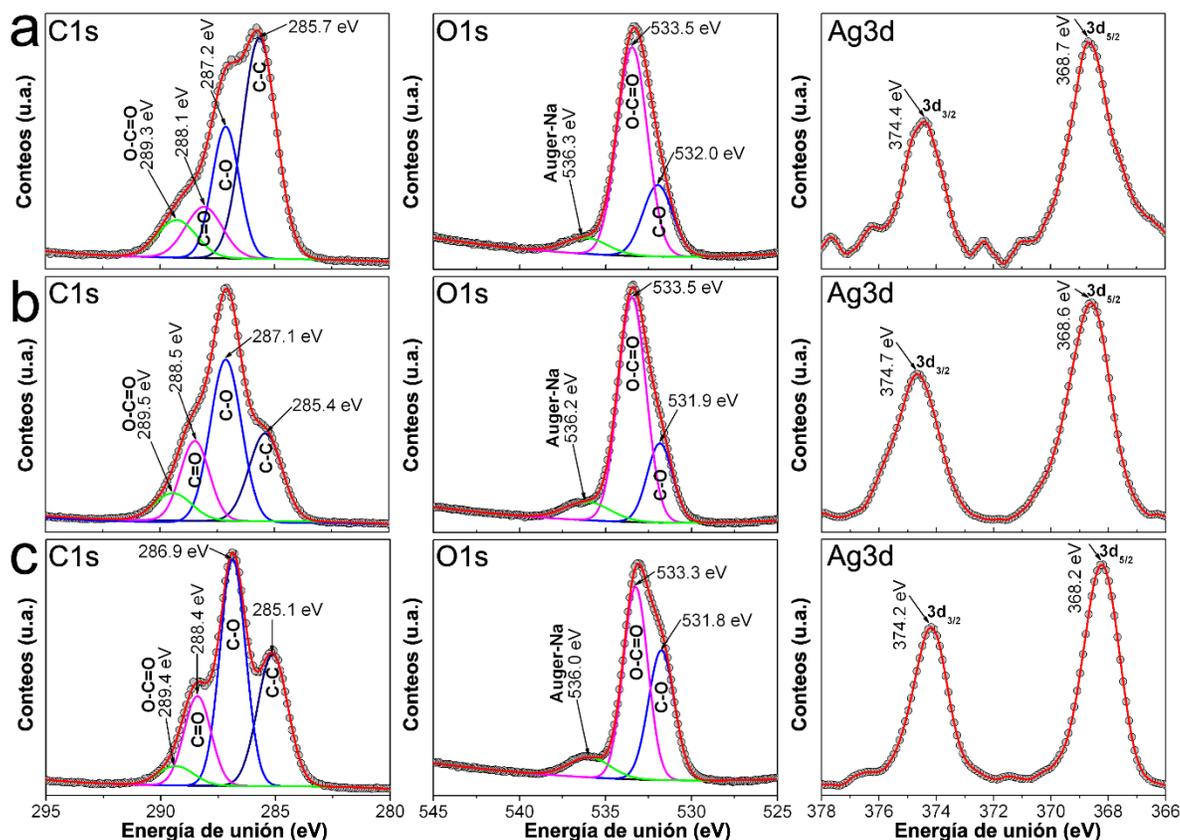
señales relativas a C-O y O-C=O, en un intervalo de entre 0.4 y 0.6 eV. Así también, los espectros Ag3d de 0.7CMC1, 0.9CMC1 y 1.2CMC1 observan picos a energías de entre 374.2 y 374.7, atribuido a la señal 3d<sub>3/2</sub>; y a 368.0 y 368.7 eV, relacionado a 3d<sub>5/2</sub>. Es importante mencionar que la diferencia en energía entre estas dos señales (3d<sub>3/2</sub> y 3d<sub>5/2</sub>) es igual a 6 eV en todos los casos, lo cual confirma que el estado de oxidación de Ag en las muestras es Ag<sup>0</sup> [49–51].



**Figura 9.** Espectros C1s, O1s y Ag3d medidos por la técnica XPS para (a) 0.7CMC1; (b) 0.9CMC1; y (c) 1.2CMC1.

Asimismo, la Figura 11 muestra los espectros obtenidos para 0.7CMC2, 0.9CMC2 y 1.2CMC2. De manera análoga, sus espectros C1s y O1s muestran corrimientos en la energía de unión de hasta 0.9 eV en señales relacionadas a enlaces C=O y O-C=O, tomando como referencia lo reportado en la Figura 9; aunado a la presencia de picos en aproximadamente 374 y 362 eV en su espectro Ag3d, que están relacionados a fotoelectrones emitidos de estados 3d<sub>3/2</sub> y 3d<sub>5/2</sub>,

respectivamente. Tal como se ha documentado en la literatura, el cambio en la energía de unión de C y O en enlaces C=O y O-C=O son señal inequívoca de la formación de un enlace de coordinación Ag-O entre las AgNPs y los grupos COO<sup>-</sup> de CMC [51,52].



**Figura 10.** Espectros C1s y O1s medidos por la técnica XPS para (a) 0.7CMC2; (b) 0.9CMC2; y (c) 1.2CMC2.

Considerando los hallazgos experimentales de este trabajo de investigación, la variación de las características morfológicas de las AgNPs puede explicarse de la siguiente manera. La CMC es capaz de atraer iones Ag<sup>+</sup> a sitios intermoleculares cercanos a los grupos R-CH<sub>2</sub>OCOO<sup>-</sup> cuando ambos se hayan en dispersión acuosa [33]. En estos sitios, los iones Ag<sup>+</sup> son reducidos con electrones liberados desde grupos R-OH y R-CH<sub>2</sub>OH de la CMC a alta temperatura. Subsecuentemente, la coalescencia de Ag<sup>0</sup> conduce a la nucleación y posterior crecimiento de AgNPs, que dependerá de la cantidad del reactivo de

plata agregado a la solución acuosa [34]. Por lo tanto, es posible establecer que cuando CMC con un DS y  $M_w$  dado es usada para la síntesis de AgNPs, su tamaño puede incrementar en la medida en que lo hace el peso de  $\text{AgNO}_3$  agregado a la reacción. Esto puede explicar las distribuciones de tamaño de partícula de casi todas las muestras de composites preparadas con soluciones acuosas de 0.9CMC y 1.2CMC (véase figuras 3 y 4). Además, se observa que los compósitos preparados con el mismo peso de  $\text{AgNO}_3$  pero diferente reactivo de CMC muestran variaciones en su distribución de tamaño de partícula y morfología de AgNPs. De acuerdo a la evidencia experimental, las AgNPs son susceptibles de formar enlaces de coordinación con los grupos  $\text{COO}^-$ . Por lo tanto la distribución de tamaño de partícula y la morfología de las AgNPs depende de la cantidad de grupos  $\text{R-CH}_2\text{OCOO}^-$  disponibles para su inmovilización. La cantidad de grupos  $\text{R-CH}_2\text{OCOO}^-$  disponibles para restringir el tamaño de las AgNPs y evitar su crecimiento secundario varía de acuerdo con el DS de los reactivos 0.9CMC y 1.2CMC.

Esta explicación parece no ser congruente para las características morfológicas de muestras sintetizadas de soluciones acuosas de 0.7CMC, ya que sus distribuciones de tamaño de partícula no cambian en proporción directa con el peso de  $\text{AgNO}_3$  agregado para la síntesis de las AgNPs; y éstas denotan un tamaño de partícula medio que es menor al obtenido para muestras sintetizadas con 0.9CMC al mismo peso de  $\text{AgNO}_3$  (véase figuras 2 y 3). A fin de explicar estas discrepancias, se debe considerar lo siguiente. Como lo muestra la Tabla 1, todas las soluciones de CMC fueron preparadas a la misma concentración para la síntesis de los compósitos. Sin embargo, el reactivo 0.7CMC tiene un  $M_w$  menor que los 0.9CMC y 1.2CMC. Es bien sabido que la viscosidad de una solución polimérica varía en proporción exponencial ~~directa~~ con su  $M_w$  a una concentración dada. Entonces es razonable pensar que, al mismo peso de  $\text{AgNO}_3$  agregado a la reacción, la dispersión de iones  $\text{Ag}^+$  en un medio acuoso de 0.7CMC será distinto a la dispersión en medios de 0.9CMC o 1.2CMC. Más aún, considerando el bajo DS de 0.7CMC, es posible que muchos de los iones

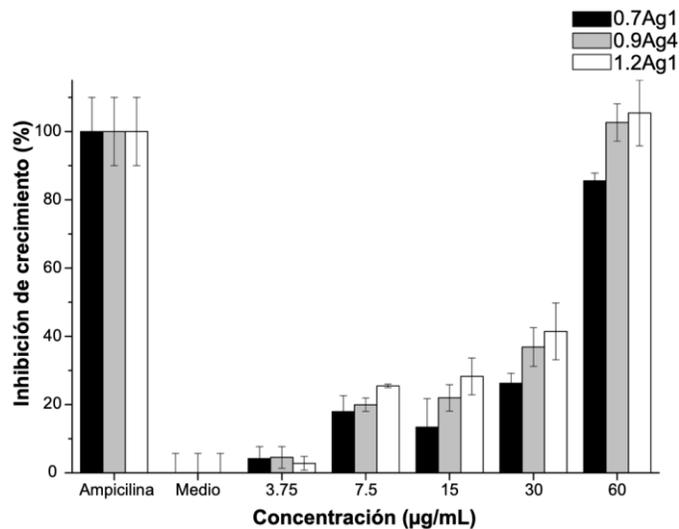
$\text{Ag}^+$  no alcancen un sitio cercano a los grupos  $\text{R-CH}_2\text{OCOO}^-$ , por lo que pueden reducirse en otro sitio. Esto implica que la coalescencia de  $\text{Ag}^0$ , nucleación y crecimiento de AgNPs también ocurre lejos de dichos grupos funcionales de CMC. Esto puede explicar el alto valor de la desviación estándar de las muestras 0.7CMC2 y 0.7CMC3, así como la formación de nanopartículas poligonales en la muestra 0.7CMC4 (véase figura 2). Sin embargo, las AgNPs están inmovilizadas en CMC a través de enlaces de coordinación Ag-O, por lo que es posible argumentar que estos enlaces restringen el crecimiento de un gran número de nanopartículas cuando 0.7CMC es usado para su síntesis. Esto puede explicar el pequeño tamaño de partícula medio obtenido para la muestra 0.7CMC1 (véase figura 2).

Por lo tanto, se puede concluir que el factor clave para el control de la distribución de tamaño de partícula de las AgNPs sintetizadas es la cantidad de grupos  $\text{R-CH}_2\text{OCOO}^-$  disponibles para su inmovilización. La cantidad de estos grupos varía en proporción directa con el DS de la CMC y en general resulta en un tamaño de partícula pequeño para CMC con un alto DS. Es importante mencionar que la explicación correspondiente a los cambios observados en desviación estándar y morfología de las AgNPs debe confirmarse en futuros estudios.

### **3.4. Actividad bactericida**

Como se explicó en sección 3.3, la distribución de tamaño de partícula y la morfología de las AgNPs depende principalmente del DS de la CMC usada para su síntesis. Esto se relaciona con el hecho de que las nanopartículas están inmovilizadas en CMC mediante la formación de enlaces de coordinación Ag-O entre las AgNPs y los grupos  $\text{COO}^-$  de las cadenas del polisacárido. Por lo tanto, a fin de evaluar el efecto de estos enlaces en la actividad bactericida de las AgNPs, se procedió a probar muestras (tratamiento) con una distribución de tamaño de partícula similar, pero con nanopartículas inmovilizadas en CMC con distinto DS, como lo son 0.7CMC1 y 1.2CMC1; así como también la muestra

0.9CMC4, que tiene una diferente distribución de tamaño para AgNPs inmovilizadas en CMC con un DS cercano al de 1.2CMC. Los ensayos se realizaron por triplicado de tres experimentos independientes usando dosis de tratamiento con una concentración conocida de AgNPs, [AgNPs]. En la Figura 12 se observa una importante actividad bactericida de los compósitos CMC/AgNPs a una concentración [AgNPs] = 60 µg/mL para los tres tratamientos probados. Es importante mencionar que esta concentración no muestra diferencia estadística con el control positivo ( $p > 0.05$ ). Por lo tanto, la concentración de [AgNPs] = 60 µg/mL puede establecerse como la MIC de esta evaluación, con excepción del tratamiento 0.7CMC1. Este tratamiento muestra un efecto inhibitorio de  $85.5 \pm 2.3\%$  a esta dosis. Además, se obtuvo una actividad inhibitoria residual a [AgNPs] = 30 µg/mL en los tratamientos 0.7CMC1, 0.9CMC4 y 1.2CMC1 de  $26.3 \pm 2.9\%$ ,  $36.9 \pm 5.7\%$  y  $41.4 \pm 8.3\%$ , respectivamente.



**Figura 11.** Actividad bactericida de los compósitos CMC/AgNPs contra *E. faecalis*. Los datos representan el porcentaje promedio  $\pm$  el porcentaje de desviación estándar.

Estos resultados pueden explicarse de la siguiente manera. Como se ha propuesto en la literatura, la actividad bactericida de las AgNPs está relacionada con la producción y liberación de iones  $Ag^+$  desde su superficie en dispersión acuosa [11]. De acuerdo a esto, las nanopartículas de menor tamaño son capaces de producir una mayor cantidad de  $Ag^+$  en solución acuosa que las más grandes [53]. Los iones  $Ag^+$  liberados pueden ser internalizados por un transporte

bacteriano pasivo a través de los canales de su membrana celular para luego adherirse a elementos estructurales como las enzimas y proteínas, particularmente a sus grupos R-SH [12]. Esta adhesión disminuye la permeabilidad de la pared celular y conduce a la muerte celular [54]. Específicamente, se ha reportado que la MIC para AgNPs en tratamiento contra *E. faecalis* varía entre 500 and 0.19 µg/mL, dependiendo de la ruta de síntesis usada para su preparación, tamaño de partícula y modificación superficial [54–57]. Por lo que este resultado indica que los enlaces de coordinación Ag-O entre las AgNPs y los grupos COO<sup>-</sup> de la CMC no disminuye la habilidad de las nanopartículas para producir y liberar Ag<sup>+</sup> desde su superficie; y en consecuencia mostrar una adecuada actividad bactericida en medio acuoso.

Más aún, se puede observar que los tratamientos con distribución de tamaño de partícula bastante diferente, pero con AgNPs inmovilizadas en CMC con DS cercano, como es el caso de 0.9CMC4 y 1.2CMC1, muestran casi el mismo efecto inhibitorio en el crecimiento de bacterias. Esto sugiere que los enlaces de coordinación Ag-O mejoran la actividad bactericida de los compósitos CMC/AgNPs. Además, esto es congruente con la actividad bactericida del tratamiento 0.7CMC1, ya que este presenta un efecto inhibitorio menor al observado para 1.2CMC1 aun y cuando ambos tratamientos tienen una distribución de tamaño de partícula similar (véase figuras 2 y 4).

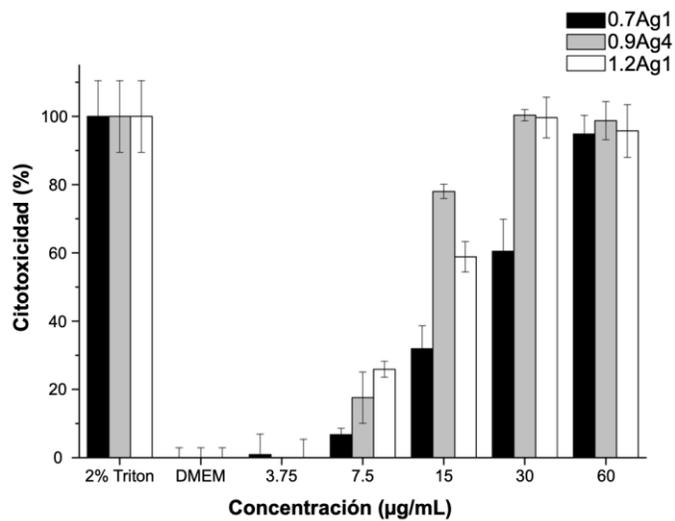
### **3.5. Citotoxicidad**

Considerando el efecto inhibitorio de los tratamientos 0.7CMC1, 0.9CMC4 y 1.2CMC1, se procedió a evaluar su citotoxicidad a las dosis empleadas para los ensayos de actividad bactericida. Los ensayos de citotoxicidad se hicieron triplicando tres experimentos independientes para los tratamientos antes mencionados. Como se muestra en la Figura 13, los tratamientos con concentración [AgNPs] = 60 µg/mL son los que exhiben el más alto efecto citotóxico en este muestreo experimental, con un 95%. Dicho efecto decrece a

medida que la concentración del tratamiento lo hace. Sin embargo, el tratamiento 0.7CMC1 a una concentración [AgNPs] = 30 µg/mL denota una citotoxicidad más baja ( $60.5 \pm 9.4\%$ ) que 0.9CMC4 y 1.2CMC1 con  $100.3 \pm 1.7\%$  and  $99.7 \pm 5.9\%$ , respectivamente. Además, la disminución de citotoxicidad de 0.7CMC1 es más pronunciada que la observada para las otras dos muestras ( $p < 0.001$ ); aunque no se observa citotoxicidad para ninguno de los tratamientos a una concentración [AgNPs] = 3.75 µg/mL. Es importante mencionar que a esta dosis tampoco se observó una actividad bactericida significativa (véase figura 12).

Para explicar estos resultados es necesario considerar lo siguiente. Es bien sabido que la citotoxicidad inducida por AgNPs a células mamíferas depende en gran medida del tamaño de partícula, forma, carga superficial, dosis, estado de oxidación, así como del tipo de célula. Además, se ha demostrado que la actividad bactericida de las AgNPs está relacionada a la oxidación de su superficie y la subsecuente liberación de  $\text{Ag}^+$  en medio acuoso [58]. Esta oxidación provoca la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), que a su vez inducen citotoxicidad [11,59]. En consideración de ello, el hecho de que el tratamiento 0.7CMC1 muestre una toxicidad más baja que los tratamientos 0.9CMC4 y 1.2CMC1 a todas las dosis probadas, sugiere que la generación de ROS se disminuye por el uso de CMC con un bajo DS para la inmovilización de las AgNPs. Lo anterior es congruente con los resultados obtenidos de la actividad bactericida de estos tratamientos.

Por lo tanto, se puede concluir que los enlaces de coordinación Ag-O entre las AgNPs y los grupos  $\text{COO}^-$  de la CMC modifican la habilidad de las nanopartículas para producir y liberar iones  $\text{Ag}^+$  en medio acuoso, ajustando su actividad bactericida y la inducción de citotoxicidad en los medios biológicos probados.



**Figura 12** Citotoxicidad obtenida para los compósitos CMC/AgNPs contra la línea celular ATCC®PCS-201-018™. Los datos representan el porcentaje promedio ± el porcentaje de desviación estándar.

## 4.CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 4.1 Conclusiones

En este trabajo de investigación se reportó la influencia de la estructura molecular de los polisacáridos en la actividad bactericida y citotoxicidad de compósitos basados en nanopartículas de plata y carboximetil-celulosa; que fueron sintetizados a partir de una ruta de química verde, que implicó el uso de polisacáridos con distintos grados de sustitución y pesos moleculares como agente reductor e inmovilizador.

La evidencia experimental obtenida por microscopia electrónica de transmisión indica que la distribución de tamaño de partícula y morfología de las nanopartículas depende del grado de sustitución de la CMC usada para su síntesis. Asimismo, la estructura cristalina de las nanopartículas es congruente con la esperada para un apilamiento compacto tipo FCC característico de la plata. Además, los resultados obtenidos de UV-vis indican que fue posible la completa reducción de  $\text{Ag}^+$  a  $\text{Ag}^0$  mediante la ruta de química verde seguida en esta investigación.

Como lo sugieren los datos obtenidos por la técnica de espectroscopia de infrarrojo, la distribución de tamaño de partícula y morfología de las AgNPs dependen de la habilidad de la CMC para inmovilizarlas durante su síntesis. Esta inmovilización ocurre debido a la adhesión de las cadenas de CMC a la superficie de las AgNPs. Tal como lo indican los resultados obtenidos de Raman y espectroscopia foto-electrónica de rayos X, esta adhesión ocurre a través de la formación de enlaces de coordinación Ag-O entre las AgNPs y los grupos  $\text{COO}^-$  de la CMC; y da como resultando partículas más pequeñas para polisacáridos con alto grado de sustitución.

Más aún, los enlaces de coordinación Ag-O entre las AgNPs y los grupos COO<sup>-</sup> de la CMC modifican la habilidad de las nanopartículas para producir y liberar iones Ag<sup>+</sup> en medio acuoso, ajustando su actividad bactericida y la inducción de citotoxicidad en los medios biológicos probados. Por lo tanto, este trabajo de investigación establece las bases para el desarrollo de compósitos sintetizados a través de rutas de química verde cuya actividad bactericida puede regularse a fin de evitar la inducción de citotoxicidad en medios biológicos. Así, es seguro decir que: la estructura molecular de la carboximetil-celulosa determina la actividad bactericida y citotoxicidad de compósitos basados en nanopartículas de plata inmovilizadas en el polisacárido.

Finalmente es importante mencionar que el ancho de la distribución del tamaño de partícula y la morfología de las AgNPs también depende del peso de AgNO<sub>3</sub> y del M<sub>w</sub> de la CMC usados para su síntesis. Esto podría relacionarse con la forma en que los iones de plata se dispersan en las soluciones acuosas de CMC para su reducción y posterior nucleación y crecimiento de AgNPs. No obstante, la explicación correspondiente a los cambios observados en desviación estándar y morfología de las AgNPs debe confirmarse en futuros estudios.

#### **4.2. Recomendaciones**

Se recomienda extender el estudio de la actividad bactericida presentado en este trabajo a otras cepas bacterianas de tipo gram-positivas y -negativas a fin de validar la efectividad de los compósitos desarrollados para inhibir su proliferación. Además, se recomienda estudiar el mecanismo a través del cual estos compósitos inducen citotoxicidad en sistemas biológicos *in vitro* e *in vivo*; así como explorar su posible uso como recubrimientos comestibles para frutas y legumbre. Asimismo, se recomienda el estudiar el efecto de la estructura molecular de la CMC en el control de la distribución de tamaño de partícula y morfología de AgNPs haciendo uso de polisacáridos con un grado de sustitución constante de 0.7 y peso molecular de entre 90 y 250 kDa.



## 5. REFERENCIAS

- [1] J. Alexander, Wesley, History of the medical use of silver, *Surg. Infect. (Larchmt)*. 10 (2009) 289–294.
- [2] B. Nowack, H.F. Krug, M. Height, 120 Years of Nanosilver History: Implications for Policy Makers, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 1177–1183. <https://doi.org/10.1021/es103316q>.
- [3] S.W.P. Wijnhoven, W.J.G.M. Peijnenburg, C.A. Herberts, W.I. Hagens, A.G. Oomen, E.H.W. Heugens, B. Roszek, J. Bisschops, I. Gosens, D. Van De Meent, S. Dekkers, W.H. De Jong, M. Van Zijverden, A.J.A.M. Sips, R.E. Geertsma, Nano-silver - A review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment, *Nanotoxicology*. 3 (2009) 109–138. <https://doi.org/10.1080/17435390902725914>.
- [4] K. Vasilev, J. Cook, H.J. Griesser, Antibacterial surfaces for biomedical devices, *Expert Rev. Med. Devices*. 6 (2009) 553–567. <https://doi.org/10.1586/erd.09.36>.
- [5] L. Ma, M. Zhang, B. Bhandari, Z. Gao, Recent developments in novel shelf life extension technologies of fresh-cut fruits and vegetables, *Trends Food Sci. Technol.* 64 (2017) 23–38. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.03.005>.
- [6] H.M.C. de Azeredo, Nanocomposites for food packaging applications, *Food Res. Int.* 42 (2009) 1240–1253. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2009.03.019>.
- [7] T. V. Duncan, Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors, *J. Colloid Interface Sci.* 363 (2011) 1–24. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.07.017>.
- [8] B. Khodashenas, H.R. Ghorbani, Synthesis of silver nanoparticles with different shapes, *Arab. J. Chem.* 12 (2019) 1823–1838. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.12.014>.
- [9] C. Carlson, S.M. Hussein, A.M. Schrand, L.K. Braydich-Stolle, K.L. Hess,

- R.L. Jones, J.J. Schlager, Unique cellular interaction of silver nanoparticles: Size-dependent generation of reactive oxygen species, *J. Phys. Chem. B.* 112 (2008) 13608–13619.  
<https://doi.org/10.1021/jp712087m>.
- [10] J.R. Morones, J.L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J.B. Kouri, J.T. Ramírez, M.J. Yacaman, The bactericidal effect of silver nanoparticles, *Nanotechnology.* 16 (2005) 2346–2353. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/059>.
- [11] S. Chernousova, M. Epple, Silver as antibacterial agent: Ion, nanoparticle, and metal, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 52 (2013) 1636–1653.  
<https://doi.org/10.1002/anie.201205923>.
- [12] Q.L. Feng, J. Wu, G.Q. Chen, F.Z. Cui, T.N. Kim, J.O. Kim, A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, *J. Biomed. Mater. Res.* 52 (2000) 662–668.  
[https://doi.org/10.1002/1097-4636\(20001215\)52:4<662::AID-JBM10>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-4636(20001215)52:4<662::AID-JBM10>3.0.CO;2-3).
- [13] C. Batchelor-McAuley, K. Tschulik, C.C.M. Neumann, E. Laborda, R.G. Compton, Why are silver nanoparticles more toxic than bulk silver? Towards understanding the dissolution and toxicity of silver nanoparticles, *Int. J. Electrochem. Sci.* 9 (2014) 1132–1138.
- [14] J.-M. Savéant, *Molecular Catalysis of Electrochemical Reactions. Mechanistic Aspects*, *Chem. Rev.* 108 (2008) 2348–2378.  
<https://doi.org/10.1021/cr068079z>.
- [15] B.B. Blizanac, P.N. Ross, N.M. Marković, Oxygen reduction on silver low-index single-crystal surfaces in alkaline solution: Rotating ring disk  $\text{Ag}(hkl)$  studies, *J. Phys. Chem. B.* 110 (2006) 4735–4741.  
<https://doi.org/10.1021/jp056050d>.
- [16] B.B. Blizanac, P.N. Ross, N.M. Markovic, Oxygen electroreduction on  $\text{Ag}(111)$ : The pH effect, *Electrochim. Acta.* 52 (2007) 2264–2271.  
<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2006.06.047>.
- [17] C.C.M. Neumann, E. Laborda, K. Tschulik, K.R. Ward, R.G. Compton,

Performance of silver nanoparticles in the catalysis of the oxygen reduction reaction in neutral media: Efficiency limitation due to hydrogen peroxide escape, *Nano Res.* 6 (2013) 511–524.  
<https://doi.org/10.1007/s12274-013-0328-4>.

- [18] S. Hussain, E. Meneghini, M. Moosmayer, D. Lacotte, B.M. Anner, Potent and reversible interaction of silver with pure Na,K-ATPase and Na,K-ATPase-liposomes, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1190 (1994) 402–408. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0005-2736\(94\)90100-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0005-2736(94)90100-7).
- [19] S.M. Hussain, K.L. Hess, J.M. Gearhart, K.T. Geiss, J.J. Schlager, In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells, *Toxicol. Vitro.* 19 (2005) 975–983. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tiv.2005.06.034>.
- [20] L. Braydich-Stolle, S. Hussain, J.J. Schlager, M.C. Hofmann, In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells, *Toxicol. Sci.* 88 (2005) 412–419. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi256>.
- [21] A. Krawczyńska, K. Dziendzikowska, J. Gromadzka-Ostrowska, A. Lankoff, A.P. Herman, M. Oczkowski, T. Królikowski, J. Wilczak, M. Wojewódzka, M. Kruszewski, Silver and titanium dioxide nanoparticles alter oxidative/inflammatory response and renin-angiotensin system in brain, *Food Chem. Toxicol.* 85 (2015) 96–105.  
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.08.005>.
- [22] H. Liu, X. Wang, Y. Wu, J. Hou, S. Zhang, N. Zhou, X. Wang, Toxicity responses of different organs of zebrafish (*Danio rerio*) to silver nanoparticles with different particle sizes and surface coatings, *Environ. Pollut.* 246 (2019) 414–422. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.12.034>.
- [23] J. Auclair, P. Turcotte, C. Gagnon, C. Peyrot, K.J. Wilkinson, F. Gagné, The influence of surface coatings on the toxicity of silver nanoparticle in rainbow trout, *Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.* 226 (2019) 108623. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.108623>.
- [24] H.C. Poynton, J.M. Lazorchak, C.A. Impellitteri, B.J. Blalock, K. Rogers, H.J. Allen, A. Loguinov, J.L. Heckman, S. Govindasmawly, Toxicogenomic responses of nanotoxicity in *Daphnia magna* exposed to silver nitrate and

- coated silver nanoparticles, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 6288–6296.  
<https://doi.org/10.1021/es3001618>.
- [25] S.H. Nam, Y.J. An, Size- and shape-dependent toxicity of silver nanomaterials in green alga *Chlorococcum infusionum*, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 168 (2019) 388–393.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.082>.
- [26] M.C. Moulton, L.K. Braydich-Stolle, M.N. Nadagouda, S. Kunzelman, S.M. Hussain, R.S. Varma, Synthesis, characterization and biocompatibility of “green” synthesized silver nanoparticles using tea polyphenols, *Nanoscale*. 2 (2010) 763–770. <https://doi.org/10.1039/c0nr00046a>.
- [27] Shahid-ul-Islam, B.S. Butola, A. Kumar, Green Chemistry based in-Situ Synthesis of Silver Nanoparticles for Multifunctional Finishing of Chitosan Polysaccharide Modified Cellulosic Textile Substrate, *Int. J. Biol. Macromol.* (2019).  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.202>.
- [28] M.A. Martínez-Rodríguez, M.A. Garza-Navarro, I.E. Moreno-Cortez, R. Lucio-Porto, V.A. González-González, Silver/polysaccharide-based nanofibrous materials synthesized from green chemistry approach, *Carbohydr. Polym.* 136 (2016) 46–53.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.09.014>.
- [29] A.H. Basta, H. El-Saied, M.S. Hasanin, M.M. El-Deftar, Green carboxymethyl cellulose-silver complex versus cellulose origins in biological activity applications, *Int. J. Biol. Macromol.* 107 (2018) 1364–1372. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.061>.
- [30] I.X. Yin, O.Y. Yu, I.S. Zhao, M.L. Mei, Q.-L. Li, J. Tang, C.-H. Chu, Developing biocompatible silver nanoparticles using epigallocatechin gallate for dental use, *Arch. Oral Biol.* 102 (2019) 106–112.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.03.022>.
- [31] C. Ruan, Y. Zhang, J. Wang, Y. Sun, X. Gao, G. Xiong, J. Liang, Preparation and antioxidant activity of sodium alginate and carboxymethyl cellulose edible films with epigallocatechin gallate, *Int. J. Biol. Macromol.*

- 134 (2019) 1038–1044. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.143>.
- [32] T. Chakraborty, I. Chakraborty, S. Ghosh, Sodium Carboxymethylcellulose–CTAB Interaction: A Detailed Thermodynamic Study of Polymer–Surfactant Interaction with Opposite Charges, *Langmuir*. 22 (2006) 9905–9913. <https://doi.org/10.1021/la0621214>.
- [33] M.N. Nadagouda, R.S. Varma, Synthesis of thermally stable carboxymethyl cellulose/metal biodegradable nanocomposites for potential biological applications, *Biomacromolecules*. 8 (2007) 2762–2767. <https://doi.org/10.1021/BM700446P>.
- [34] M.A. Garza-Navarro, J.A. Aguirre-Rosales, E.E. Llanas-Vázquez, I.E. Moreno-Cortez, A. Torres-Castro, V.A. González-González, Totally Ecofriendly Synthesis of Silver Nanoparticles from Aqueous Dissolutions of Polysaccharides, *Int. J. Polym. Sci.* 2013 (2013) 436021. <https://doi.org/10.1155/2013/436021>.
- [35] M.A. Laredo-Naranjo, R. Carrillo-Gonzalez, M.A. De La Garza-Ramos, M.A. Garza-Navarro, H.H.H. Torre-Martinez, C. Del Angel-Mosqueda, R. Mercado-Hernandez, R. Carrillo-Fuentevilla, Antimicrobial properties and dental pulp stem cell cytotoxicity using carboxymethyl cellulose-silver nanoparticles deposited on titanium plates, *Acta Biomater. Odontol. Scand.* 2 (2016) 60–67. <https://doi.org/10.3109/23337931.2016.1160783>.
- [36] M.M. Kemp, A. Kumar, S. Mousa, T.-J. Park, P. Ajayan, N. Kubotera, S.A. Mousa, R.J. Linhardt, Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles Stabilized with Glycosaminoglycans Having Distinctive Biological Activities, *Biomacromolecules*. 10 (2009) 589–595. <https://doi.org/10.1021/bm801266t>.
- [37] F. He, D. Zhao, J. Liu, C.B. Roberts, Stabilization of Fe–Pd Nanoparticles with Sodium Carboxymethyl Cellulose for Enhanced Transport and Dechlorination of Trichloroethylene in Soil and Groundwater, *Ind. Eng. Chem. Res.* 46 (2007) 29–34. <https://doi.org/10.1021/ie0610896>.
- [38] J. Liu, F. He, T.M. Gunn, D. Zhao, C.B. Roberts, Precise Seed-Mediated Growth and Size-Controlled Synthesis of Palladium Nanoparticles Using a

Green Chemistry Approach, Langmuir. 25 (2009) 7116–7128.

<https://doi.org/10.1021/la900228d>.

- [39] I. Donati, A. Travan, C. Pelillo, T. Scarpa, A. Coslovi, A. Bonifacio, V. Sergo, S. Paoletti, Polyol synthesis of silver nanoparticles: mechanism of reduction by alditol bearing polysaccharides., *Biomacromolecules*. 10 (2009) 210–213. <https://doi.org/10.1021/bm801253c>.
- [40] N.P. Ivleva, M. Wagner, H. Horn, R. Niessner, C. Haisch, In situ surface-enhanced Raman scattering analysis of biofilm., *Anal. Chem.* 80 (2008) 8538–8544. <https://doi.org/10.1021/ac801426m>.
- [41] J. Wu, F. Zhang, H. Zhang, Facile synthesis of carboxymethyl curdlan-capped silver nanoparticles and their application in SERS., *Carbohydr. Polym.* 90 (2012) 261–269. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.033>.
- [42] K. Kaczmarek, B. Grabowska, T. Szychaj, M. Zdanowicz, M. Sitarz, A. Bobrowski, S. Cukrowicz, Effect of microwave treatment on structure of binders based on sodium carboxymethyl starch: FT-IR, FT-Raman and XRD investigations, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 199 (2018) 387–393. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.03.047>.
- [43] H.A. Ambjörnsson, K. Schenzel, U. Germgård, Carboxymethyl cellulose produced at different mercerization conditions and characterized by nir ft raman spectroscopy in combination with multivariate analytical methods, *BioResources*. 8 (2013) 1918–1932. <https://doi.org/10.15376/biores.8.2.1918-1932>.
- [44] N. Lee, P.J. Schuck, P.S. Nico, B. Gilbert, Surface Enhanced Raman Spectroscopy of Organic Molecules on Magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) Nanoparticles, *J. Phys. Chem. Lett.* 6 (2015) 970–974. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.5b00036>.
- [45] K. Shadak Alee, R. Kuladeep, D. Narayana Rao, In-situ investigation of the formation of silver nanoparticles in polyvinyl alcohol through micro-Raman spectroscopy, *Opt. Commun.* 293 (2013) 69–74. <https://doi.org/10.1016/j.optcom.2012.12.004>.
- [46] S. Chang, H. Ko, R. Gunawidjaja, V. V. Tsukruk, Raman Markers from

- Silver Nanowire Crossbars, *J. Phys. Chem. C.* 115 (2011) 4387–4394.  
<https://doi.org/10.1021/jp109348b>.
- [47] L. Li, F. Wang, Z. Shao, J. Liu, Q. Zhang, W. Jiao, Chitosan and carboxymethyl cellulose-multilayered magnetic fluorescent systems for reversible protein immobilization, *Carbohydr. Polym.* 201 (2018) 357–366.  
<https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2018.08.088>.
- [48] A.A.P. Mansur, F.G. de Carvalho, R.L. Mansur, S.M. Carvalho, L.C. de Oliveira, H.S. Mansur, Carboxymethylcellulose/ZnCdS fluorescent quantum dot nanoconjugates for cancer cell bioimaging, *Int. J. Biol. Macromol.* 96 (2017) 675–686.  
<https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2016.12.078>.
- [49] H. Xu, X. Shi, H. Ma, Y. Lv, L. Zhang, Z. Mao, The preparation and antibacterial effects of dopa-cotton/AgNPs, *Appl. Surf. Sci.* 257 (2011) 6799–6803. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2011.02.129>.
- [50] H. Liu, M. Lv, B. Deng, J. Li, M. Yu, Q. Huang, C. Fan, Laundering durable antibacterial cotton fabrics grafted with pomegranate-shaped polymer wrapped in silver nanoparticle aggregations, *Sci. Rep.* 4 (2014) 5920.  
<https://doi.org/10.1038/srep05920>.
- [51] Q. Xu, X. Ke, L. Shen, N. Ge, Y. Zhang, F. Fu, X. Liu, Surface modification by carboxymethyl chitosan via pad-dry-cure method for binding Ag NPs onto cotton fabric, *Int. J. Biol. Macromol.* 111 (2018) 796–803.  
<https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2018.01.091>.
- [52] Q. Xu, L. Xie, H. Diao, F. Li, Y. Zhang, F. Fu, X. Liu, Antibacterial cotton fabric with enhanced durability prepared using silver nanoparticles and carboxymethyl chitosan, *Carbohydr. Polym.* 177 (2017) 187–193.  
<https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2017.08.129>.
- [53] D. He, A.M. Jones, S. Garg, A.N. Pham, T.D. Waite, Silver Nanoparticle–Reactive Oxygen Species Interactions: Application of a Charging–Discharging Model, *J. Phys. Chem. C.* 115 (2011) 5461–5468.  
<https://doi.org/10.1021/jp111275a>.
- [54] R. Krishnan, V. Arumugam, S.K. Vasaviah, The MIC and MBC of Silver

Nanoparticles against *Enterococcus faecalis* A Facultative Anaerobe, J. Nanomed. Nanotechnol. 6 (2015) 1000285.

- [55] F.Ö. Küp, S. Çoşkunçay, F. Duman, Biosynthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Aesculus hippocastanum* (horse chestnut): Evaluation of their antibacterial, antioxidant and drug release system activities, Mater. Sci. Eng. C. 107 (2020) 110207.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110207>.
- [56] C. Dipankar, S. Murugan, The green synthesis, characterization and evaluation of the biological activities of silver nanoparticles synthesized from *Iresine herbstii* leaf aqueous extracts, Colloids Surfaces B Biointerfaces. 98 (2012) 112–119.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.04.006>.
- [57] M.E. Odabaş, Ç. Çınar, G. Akça, İ. Araz, T. Ulusu, H. Yücel, Short-term antimicrobial properties of mineral trioxide aggregate with incorporated silver-zeolite, Dent. Traumatol. 27 (2011) 189–194.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-9657.2011.00986.x>.
- [58] M.T.S. Alcântara, N. Lincopan, P.M. Santos, P.A. Ramirez, A.J.C. Brant, H.G. Riella, A.B. Lugão, Simultaneous hydrogel crosslinking and silver nanoparticle formation by using ionizing radiation to obtain antimicrobial hydrogels, Radiat. Phys. Chem. 165 (2019) 108369.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2019.108369>.
- [59] J. Khalili Fard, S. Jafari, M.A. Eghbal, A Review of Molecular Mechanisms Involved in Toxicity of Nanoparticles, Adv Pharm Bull. 5 (2015) 447–454.  
<https://doi.org/10.15171/apb.2015.061>.

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Posibles rutas de la reducción del oxígeno.....	7
Figura 2 Imágenes de HAADF-STEM obtenidas de las muestras de compósitos: (a) 0.7CMC1; (b) 0.7CMC2; (c) 0.7CMC3; y (d) 0.7CMC4. También se muestra la distribución de tamaño de partícula de cada muestra, a la izquierda de su correspondiente imagen de HAADF-STEM. ....	21
Figura 3 Imágenes de HAADF-STEM obtenidas de las muestras de compósitos: (a) 0.9CMC1; (b) 0.9CMC2; (c) 0.9CMC3; y (d) 0.9CMC4. También se muestra la distribución de tamaño de partícula de cada muestra, a la izquierda de su correspondiente imagen de HAADF-STEM. ....	22
Figura 4 Imágenes de HAADF-STEM obtenidas de las muestras de compósitos: (a) 1.2CMC1; (b) 1.2CMC2; (c) 1.2CMC3; y (d) 1.2CMC4. También se muestra la distribución de tamaño de partícula de cada muestra, a la izquierda de su correspondiente imagen de HAADF-STEM. ....	24
Figura 5 Imágenes de BF y patrones SAED obtenidos de muestras: (a) y (b) 0.7CMC1; (c) y (d) 0.9CMC1; (e) y (f) 1.2CMC1.....	25
Figura 6 Espectros de UV-Vis obtenidos para: (a) AgNO <sub>3</sub> ; (b) 0.7CMC4; (c) 0.9CMC4; y (d) 1.2CMC4. ....	26
Figura 7 Espectros de ATR-FTIR obtenidos de (a) 0.7CMC y sus compósitos; (b) 0.9CMC y sus compósitos; y (c) 1.2CMC y sus compósitos. ....	27
Figura 8 Espectros Raman medidos de las muestras (a) 0.7CMC1; (b) 0.7CMC4; (c) 1.2CMC1; y (d) 1.2CMC2. ....	29
Figura 9 Espectros C1s y O1s medidos por la técnica XPS para (a) 0.7CMC; (b) 0.9CMC; y (c) 1.2CMC.....	30
Figura 10 Espectros C1s, O1s y Ag3d medidos por la técnica XPS para (a) 0.7CMC1; (b) 0.9CMC1; y (c) 1.2CMC1. ....	31
Figura 11 Espectros C1s y O1s medidos por la técnica XPS para (a) 0.7CMC2; (b) 0.9CMC2; y (c) 1.2CMC2. ....	32

Figura 12 Actividad bactericida de los compósitos CMC/AgNPs contra E. faecalis. Los datos representan el porcentaje promedio  $\pm$  el porcentaje de desviación estándar..... 35

Figura 13 Citotoxicidad obtenida para los compósitos CMC/AgNPs contra la línea celular ATCC®PCS-201-018™. Los datos representan el porcentaje promedio  $\pm$  el porcentaje de desviación estándar..... 38

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Reactivos usados en la síntesis de cada muestra de material compósito ..... 15

Tabla 2 Concentraciones [CMC/AgNPs] de las dispersiones de material compósito usadas para las pruebas biológicas. .... 17