

**DESARROLLO DE UNA CUBIERTA POLIMÉRICA NANOREFORZADA COMO
BARRERA DE PROTECCIÓN ANTE INFECCIONES ASOCIADAS A LA
ATENCIÓN EN SALUD**

Jennifer Zapata Giraldo

Tesina de Maestría en Ingeniería, Área Ingeniería Biomédica

Directora

Luz Elena Botero Palacio, Bact, Ph.D.

Co-director

Lina Marcela Hoyos Palacio, IQ, Ph.D.

Asesora

Diana Paola Cuesta Castro, MD, Ph.D.



UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA

ESCUELA DE INGENIERÍAS

MEDELLÍN – COLOMBIA

2017

18 Julio 2017

Jennifer Zapata Giraldo

“Declaro que este trabajo de grado no ha sido presentado para optar a un título, ya sea en igual forma o con variaciones, en esta o cualquier otra universidad” Art 82 Régimen Discente de Formación Avanzada.

Jennifer Zapata Giraldo

Jennifer Zapata Giraldo, IB.
Estudiante
Programa Maestría en Ingeniería
Escuela de Ingenierías
Universidad Pontificia Bolivariana

Personal Vinculado

ESTUDIANTE:

Nombre: Jenniffer Zapata Giraldo. **Cédula:** 1.128.440.760 / Medellín (Ant.)

Teléfono (s): 321 632 52 46 **ID:** 000144908

E-mail: ferzapatagiraldo@gmail.com

DIRECTOR:

Nombre: Luz Elena Botero Palacio, Bact, Ph.D. **Cédula:** 43.569.887 / Medellín (Ant.)

Teléfono (s): 448 83 88 | Ext: 19333 **ID:** 000004093

E-mail: luz.boterop@upb.edu.co

CO-DIRECTOR:

Nombre: Lina Marcela Hoyos, IQ, Ph.D. **Cédula:** 43.279.606 / Medellín (Ant.)

Teléfono(s): 448 83 88 | Ext. 19331 **ID:** 000091813

E-mail: lina.hoyos@upb.edu.co

ASESOR:

Nombre: Diana Paola Cuesta Castro, MD, Ph.D. **Cédula:** 45.504.862 / Cartagena (Bol.)

Teléfono (s): 448 83 88 | Ext. 19324 **ID:** 000005343

E-mail: diana.cuesta@upb.edu.co

GRUPOS DE INVESTIGACIÓN

Grupo Biología de Sistemas **Empresa:** Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad Pontificia Bolivariana.

Teléfono(s): 448 83 88 | Ext: 19331

Grupo de Investigación en Salud Pública **Empresa:** Escuela de Ciencias de la Salud,
Universidad Pontificia Bolivariana.

Teléfono(s): 448 83 88 | Ext: 19323

Grupo de Investigaciones en Bioingeniería Empresa: Escuela de Ciencias de la Salud,
Escuela de Ingeniería, Universidad Pontificia Bolivariana.

Teléfono(s): 448 83 88 | Ext: 19200

CONFIDENCIAL

*Más allá de la noche que me cubre,
Negra como el abismo de polo a polo,
Agradezco a cualquier Dios que pudiera existir
Por mi alma inconquistable.*

*En las feroces garras de las circunstancias
No he gemido ni llorado.
Bajo los golpes del destino
Mi cabeza ensangrentada sigue erguida.*

*Más allá de este lugar de ira y llanto
Es inminente el horror de la sombra,
Y sin embargo, la amenaza de los años
Me encuentra, y me encontrará sin miedo.*

*No importa cuán estrecho sea la puerta,
Cuán cargada de castigos la sentencia,
Soy el amo de mi destino:
Soy el capitán de mi alma.*

William Ernest Henley

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de maestría realizado a lo largo de tres años (increíble que pasara tanto) ha tenido muchas personas a las cuales tengo que agradecerles toneladas y media. Empiezo por Dios, sin él en mi corazón no hubiese tenido la fortaleza en los momentos tan cruciales que enfrente a lo largo de esta etapa de mi vida.

En mi plano personal quiero agradecer a mis padres, quienes han creído en mí siempre, muchas gracias por la paciencia cuando estuve de humor negro, muchas gracias por las palabras de ánimo cuando pensaba que no iba a lograrlo y mil y mil gracias por el amor y la confianza que me transmiten, sin ellos pienso que sería una mujer completamente diferente. A mis tíos Ruby y Diego, que, aunque nunca terminan de entender qué diablos hago yo, siempre me han dado lindas y motivadoras palabras. Finalmente, a mis mejores amigos, Angie, Sebas y Vane, quienes continuamente piensan que soy una especie de superhéroe y que estoy loca por meterme en cosas tan complejas, siempre están ahí para lo que haga falta.

Pasando al plano científico, ¿Qué hubiera sido de mí sin Luz, Diana y Lina? Creo que encontrármelas en mi camino investigativo ha sido de las mejores cosas que he tenido en mi vida. A Luz por su infinita sabiduría y fortaleza mental, por saber jalarme las orejas cuando me lo merecía; a Diana por su carácter y apoyo, siempre ahí cuando más lo necesitaba; finalmente Lina, quién me dio la oportunidad de formar parte de la línea de investigación más cool de la universidad y me abrió las puertas cuando otras partes me lo negaron: mil y mil gracias.

Puesto que este trabajo de maestría se realizó en dos campus, Laureles y Robledo, quiero dar las gracias a los coordinadores de los laboratorios en ambos campus, Nelson y Gloria Mercedes, por su disposición y por permitirme usar los equipos. A los auxiliares de los laboratorios de química y operaciones unitarias Humberto, Adalberto y Alonso, gracias por todo. También quiero dar las gracias a las auxiliares del quinto piso de la facultad de la facultad de medicina: Isleny, Mary, Marly y Maria Eugenia, nunca olvidaré la ayuda tan increíble que me brindaron. Doña Rosa que hace parte del laboratorio de análisis de suelos de la Universidad Nacional jugó un papel muy importante, siempre tendrá una parte de mi corazón.

El haber realizado esta maestría entre dos campus me permitió tener un gran número de conocidos y amigos, entre charlas y café contamos desventuras y hasta tratamos de dar soluciones, algunos de ellos son Sandy, Pedro, Marcelita, Juan, Anita, Naty, Cristian, Ruth, Jenn, Chavo, Lilipop, Vane, Gio, Yepes, Vanegas, Cata. A todos ustedes muchas gracias por hacer más agradables las jornadas de trabajo, ha sido un verdadero placer compartir el tiempo y el espacio con ustedes.

GRACIAS TOTALES

Jennifer Zapata Giraldo, julio de 2017

CONFIDENCIAL

FINANCIACIÓN

Este trabajo de maestría fue financiado por la Universidad Pontificia Bolivariana a través del proyecto UPB INNOVA 2015 con radicado número 438B-08/15-65 y por la beca-pasantía investigativa otorgada por el CIDI para terminar los estudios de maestría; adicionalmente por COLCIENCIAS a través de la convocatoria para Proyectos de Ciencia, Tecnología E Innovación en Salud 711 de 2015, proyecto 111571149742.

CONFIDENCIAL

CONTENIDO

Tabla de contenido

1. LISTA DE FIGURAS	11
2. LISTA DE TABLAS	13
3. ABREVIATURAS	14
4. RESUMEN	17
5. ABSTRACT	19
6. PRESENTACIÓN DE LA TESIS DE MAESTRÍA	21
6.1 Introducción	21
6.2 Objetivos	23
6.2.1 General.....	23
6.2.2 Específicos.....	23
7. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE.....	24
7.1 Contaminación por microorganismos en textiles de uso hospitalario.....	24
7.2 Nanomateriales para el control de infecciones	26
7.2.1 Nanopartículas de plata (NP-Ag).....	26
7.2.1.1 Síntesis de nanopartículas de plata	27
7.2.1.2 Mecanismo de acción antimicrobiano de nanopartículas de plata	27
7.2.2 Nanopartículas de dióxido de titanio (NP-TiO ₂).....	31
7.3 Caracterización físico-química de las nanopartículas con efecto antimicrobiano	33
7.3.1 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	33
7.3.2 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)	33
7.3.3 Espectroscopía de rayos X de dispersión de energía (EDX)	34
7.3.4 Espectroscopía ultravioleta visible (UV-vis).....	34
7.3.5 Espectroscopía de absorción atómica (AAS).....	35
7.3.6 Dispersión dinámica de la luz (DLS)	35
7.3.7 Dispersión de Rayos X (DRX).....	36
7.4 Electrohilado	36

7.5	Textiles funcionales: innovación en propiedades a través de nanopartículas	38
8.	METODOLOGÍA	42
8.1	Desarrollo de una metodología de síntesis química de nanopartículas metálicas y/o óxido metálicas y caracterización	42
8.1.1	Nanopartículas de plata (NP-Ag)	42
8.1.2	Nanopartículas de dióxido de titanio (NP-TiO ₂)	43
8.2	Evaluación del efecto antimicrobiano de las nanopartículas	45
8.2.1	Evaluación antimicrobiana de NP-Ag	45
8.2.2	Evaluación antimicrobiana de NP-TiO ₂	48
8.3	Desarrollo de un tejido por la técnica de electrohilado	51
8.4	Evaluación antimicrobiana del no tejido	52
9.	RESULTADOS	53
9.1	Desarrollo de una metodología de síntesis química de nanopartículas metálicas y/o óxido metálicas y su caracterización	53
9.1.1	Nanopartículas de plata (NP-Ag)	53
9.1.2	Nanopartículas de dióxido de titanio (NP-TiO ₂)	60
9.2	Evaluación del efecto antimicrobiano de las nanopartículas	62
9.2.1	Nanopartículas de plata	62
9.2.2	Nanopartículas de dióxido de titanio	66
9.3	Desarrollo de un no tejido por la técnica de electrohilado	66
9.4	Evaluación antimicrobiana del no tejido nanoreforzado sintetizado	69
10.	DISCUSIÓN	71
11.	CONCLUSIONES	78
12.	PERSPECTIVAS	80
13.	PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	81
13.1	Metodología de fabricación	81
13.2	Ponencias	81
13.3	Artículo revisión	81
14.	REFERENCIAS	82
15.	ANEXOS	98

1. LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Proceso de síntesis química de las nanopartículas de plata según Brown *et al.* (1).
- Figura 2.** Evaluación del efecto antibacteriano de los lotes de NP-Ag.
- Figura 3.** Evaluación del efecto antifúngico de los lotes de NP-Ag.
- Figura 4.** Evaluación del efecto antibacteriano de los lotes de NP-TiO₂.
- Figura 5.** Espectro UV del lote NP02 de NP-Ag y propiedades químicas reproduciendo la metodología de síntesis de Brown *et al.* (1).
- Figura 6.** Espectro UV y propiedades físico-químicas de los lotes NP04a y NP04b de NP-Ag sintetizados con el método de Brown *et al.* (1) modificado.
- Figura 7.** Análisis morfológico de las NP-Ag sintetizadas con el método de Brown *et al.* (1) modificado. a) NP04a sin ajuste del pH y b) NP04b con ajuste a pH 11 usando NaOH 1.25 M. Microscopía Electrónica de Transmisión.
- Figura 8.** Espectro UV-vis y propiedades físico-químicas de NP-Ag sintetizados con el método de Brown *et al.* (1) modificado, lotes: a) NP11; b) NP12; c) NP13; d) NP14; e) NP22.
- Figura 9.** Espectro UV-vis y propiedades físico-químicas de NP-Ag sintetizados con el método de Brown *et al.* (1) modificado, lotes: a) NP19; b) NP23 (*replica NP19*).
- Figura 10.** Espectro UV-vis y propiedades físico-químicas de NP-Ag sintetizados con el método de Brown *et al.* (1) modificado, lote NP20.
- Figura 11.** Desarrollo de una metodología de síntesis química de las nanopartículas de plata según el método de Brown *et al.* (1) modificado.
- Figura 12.** Esquema de síntesis de NP-TiO₂ por el método de sol-gel.
- Figura 13.** Morfología y composición química obtenida para las NP-TiO₂ sintetizadas con métodos químicos evaluadas en SEM y EDX.
- Figura 14.** Patrones observados en NP-TiO₂ sintetizadas con el método de sol-gel y evaluadas en DRX.
- Figura 15.** Evaluación antibacteriana a través del tiempo de los lotes NP13 y NP22 (réplica NP13) contra *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* AmpC y *P. aeruginosa*.

Figura 16. Evaluación antibacteriana a través del tiempo de los lotes NP19 y NP23 (réplica NP19) contra *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* AmpC y *P. aeruginosa*.

Figura 17. Imágenes de SEM obtenidas a partir de muestras de electrohilado de Nylon-6 no tejido. a) Muestra 1; b) Muestra 2; c) Muestra 3; d) Muestra 4.

Figura 18. Imágenes de SEM obtenidas a partir de muestras de electrohilado. a) Muestra 5; b) Muestra 6.

CONFIDENCIAL

2. LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Efecto en la morfología de la fibra de los parámetros de procesamiento, solución y ambientales.

Tabla 2. Metodologías usadas para dispersar las NP-TiO₂.

Tabla 3. Características físico-químicas de NP-Ag sintetizadas con el método de reducción química.

Tabla 4. Rutas de síntesis de NP-TiO₂ con sus respectivos diámetros.

Tabla 5. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) de la actividad antibacteriana a las 24 horas de incubación de NP-Ag.

Tabla 6. Evaluación del efecto antifúngico de NP-Ag.

Tabla 7. Propiedades físico-químicas de las soluciones preparadas para electrohilar Nylon-6 no tejido.

Tabla 8. Condiciones de electrohilado para obtención de Nylon-6 no tejido.

Tabla 9. Crecimiento bacteriano de *E. coli* ATCC 25922 en el no tejido impregnado con NP-Ag hasta las 24 horas.

Tabla 10. Valores de CMB obtenidos por otros autores para NP-Ag.

Tabla 11. Valores de CMI obtenidos en este estudio y por otros autores para NP-Ag contra *C. albicans*.

3. ABREVIATURAS

AAS	Espectroscopía de absorción atómica
ADN	Ácido desoxirribunucleico
Ag	Plata
AgNO ₃	Nitrato de plata
ARN	Ácido ribonucleico
Au	Oro
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CDC	Centro de Control de Enfermedades
<i>C. difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>
CH ₃ CH ₂ OH	Etanol
C ₆ H ₅ O ₇ Na ₃	Citrato de sodio
cm	Centímetro
CMB	Concentración mínima bactericida
CMF	Concentración mínima fungicida
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CO ₂	Dióxido de carbono
DLS	Dispersión dinámica de luz
DRX	Dispersión de rayos X
e ⁻	Electrón
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDX	Espectroscopía de rayos X de dispersión de energía
H ⁺	Hidrógeno
H ₂ O	Agua
HCl	Ácido clorhídrico
HNO ₃	Ácido nítrico
HPIV	Virus de la parainfluenza humana
HSV	Virus Herpes Simplex
IAAS	Infecciones asociadas a la atención en salud

J	Jules
J/cm ²	Jules por centímetro cuadrado
kV	Kilo voltios
LC ₅₀	Concentración letal al 50%
M	Molar
mm	Milímetros
ml	Mililitros
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
NaBH ₄	Borohidruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NH ₃	Amonio
NIR	Infrarrojo cercano
NP	Nanopartícula
NP-TiO ₂	Nanopartículas de dióxido de titanio
NP-Ag	Nanopartículas de plata
OH	Grupo hidroxilo
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PET	Polietilentereftalato
PLLA	ácido poli-L-láctico
PVA	poli vinil alcohol
ROS	Especies reactivas del oxígeno
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RPS	Resonancia plasmónica de superficie
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión
Ti(OCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃) ₄	Butóxido de titanio
TiO ₂	Dióxido de titanio
UCI	Unidad de Cuidado Intensivos
ul	Microlitros

UFC	Unidades formadoras de colonia
UFC/ml	Unidades formadoras de colonia por mililitro
ug/ml	Microgramos por mililitro
UVA	Rayos ultravioleta tipo A
UVB	Rayos ultravioleta tipo B
UV-vis	Espectroscopía ultravioleta-visible
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VRE	<i>Enterococcus</i> sp resistente a la vancomicina

CONFIDENCIAL

4. RESUMEN

El desarrollo de no tejidos reforzados con nanopartículas, se ha convertido en un área de la investigación que busca disminuir y erradicar las infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS), un problema de salud pública en el mundo que conlleva una alta carga de morbi-mortalidad en la población y pérdidas millonarias de recursos económicos a causa de las mismas. Con la presente propuesta se desarrolló una metodología de síntesis química para nanopartículas de plata (NP-Ag) modificada de Brown *et al.* (1) y nanopartículas de dióxido de titanio (NP-TiO₂) y se evaluó su propiedad antimicrobiana; adicionalmente, la mejor nanopartícula (NP) fue impregnada en un no tejido a base de nylon-6 y nuevamente se evaluó su efecto antimicrobiano.

Las NP-Ag se sintetizaron mediante reducción química, mientras que las NP-TiO₂ usando la técnica de sol-gel. Su propiedad antimicrobiana se evaluó mediante ensayos *in vitro* utilizando bacterias y hongos provenientes de aislamientos clínicos criopreservados en el laboratorio y con cepas de referencia tanto sensibles como resistentes a los antibióticos que con frecuencia están relacionados con IAAS. Para determinar el efecto antimicrobiano de las NPs se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) hasta 24 horas de exposición. El no tejido de nylon-6 se obtuvo a partir de la técnica de electrohilado con algunas modificaciones; finalmente, el no tejido se impregnó con NP-Ag y su efecto antimicrobiano se evaluó mediante el método de Kirby-Bauer.

Se sintetizaron 22 lotes de NP-Ag y 14 lotes de NP-TiO₂. Los diámetros obtenidos para NP-Ag variaron de 15 – 43 nm los cuales dependieron del ajuste de pH, a mayor pH menor diámetro pero mayor concentración de la solución. La resonancia plasmónica de superficie (RPS) se encontró entre los 380 – 410 nm con una sola banda, lo que indica la presencia de NPs esféricas. Para las NP-TiO₂ se encontró un diámetro de 20 nm y la estructura cristalina predominante fue anatasa; sin embargo, también se encontró estructura rutilo.

La CMB encontrada con el lote de NP-Ag con mejores propiedades físico-química fue de 10 ug/ml para *Escherichia coli* ATCC 25922, 5 ug/ml para *E. coli* con resistencia AmpC, 20

ug/ml para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27823 y >65 ug/ml para *Staphylococcus aureus* ATCC25923. La CMF encontrada contra *Candida albicans* ATCC 14053 fue de 2,4 ug/ml. No se pudo determinar CMB ni CMF para las NP-TiO₂ inclusive luego de la activación por UVB.

El no tejido de nylon-6 fue multicapas, con un diámetro promedio de fibra de 350 nm. Al impregnarlo con el mejor lote de NP-Ag se obtuvo una inhibición del crecimiento de *E. coli* ATCC 25922 al contacto con el material. El producto evaluado tuvo un efecto microbicida al contacto, por lo que puede contribuir a la disminución o erradicación de los depósitos de microorganismos viables en elementos inertes del ambiente hospitalario, mejorando así la seguridad del paciente, sus familias y profesionales prestadores del servicio de salud.

Palabras clave: Nanopartículas, Infecciones asociadas a la atención en salud, Control de la infección, Microbicidas, Textiles.

5. ABSTRACT

The development of nanoparticles reinforced nonwoven has become an area of research that seeks to reduce and eradicate health care associated infections (HAIs), a public health problem in the world that carries a high burden of morbidity-mortality in the population and million-dollar losses of economic resources because of them. With the present proposal, a chemical synthesis methodology for modified silver nanoparticles (NP-Ag) was developed starting from Brown *et al.* (1) and titanium dioxide nanoparticles (NP-TiO₂), their antimicrobial property was evaluated; Additionally, the best nanoparticle (NP) was impregnated in a nonwoven based on nylon-6 and its antimicrobial effect was evaluated.

NP-Ag was synthesized by chemical reduction, while NP-TiO₂ was used using the sol-gel technique. Its antimicrobial property was evaluated by *in vitro* assays using bacteria and fungi from cryopreserved clinical isolations in the laboratory and with antibiotic resistant and sensitive reference strains that are frequently related to HAIs. To determine the antimicrobial effect of the NPs, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) were determined up to 24 hours of exposure. The nonwoven based on nylon-6 was obtained from the electrospinning technique with some modifications; Finally, the nonwoven was impregnated with NP-Ag and its antimicrobial effect was evaluated by the Kirby-Bauer method.

22 batches of NP-Ag and 14 batches of NP-TiO₂ were synthesized. The diameters obtained for NP-Ag ranged from 15 - 43 nm which depended on the pH adjustment, at higher pH, lower diameter but higher concentration of the solution. Surface plasmon resonance (SPR) was found between 380 - 410 nm with a single band, indicating the presence of spherical NPs. For the NP-TiO₂ a diameter of 20 nm was found and the predominant crystal structure was anatase; However, rutile structure was also found. The CMB found with the batch of NP-Ag with better physicochemical properties was 10 ug / ml for *Escherichia coli* ATCC 25922, 5 ug / ml for *E. coli* with AmpC resistance, 20 ug / ml for *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27823 and > 65 ug / ml for *Staphylococcus aureus* ATCC25923. The CMF found

against *Candida albicans* ATCC 14053 was 2.4 ug / ml. It was not possible to determine MBC or MFC for NP-TiO₂ even with UVB activation.

The nonwoven based on nylon-6 was multilayer, with an average fiber diameter of 350 nm. When impregnated with the best batch of NP-Ag, growth inhibition of *E. coli* ATCC 25922 was obtained on contact with the material. The evaluated product had a microbicide effect on the contact, so it can contribute to the decrease or eradication of the deposits of viable microorganisms in inert elements of the hospital environment, thus improving the safety of the patient, their families and professionals providing the health service.

Keywords: Nanoparticles, Health care associated infections, Infection control, Microbicides, Textiles.

6. PRESENTACIÓN DE LA TESIS DE MAESTRÍA

6.1 Introducción

Las infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS), se definen como *“aquellas infecciones que el paciente adquiere mientras recibe tratamiento para alguna condición médica o quirúrgica y en quien la infección, no se había manifestado ni estaba en período de incubación en el momento del ingreso a la institución”* (2).

Las IAAS representan un importante problema sanitario y financiero en el mundo debido a la frecuencia con que se producen; la morbilidad y mortalidad que provocan; y la carga económica que imponen a pacientes, personal sanitario y sistemas de salud, relacionados con períodos de estancia hospitalaria más extensos, así como con procedimientos de mayor complejidad, comprometiendo la salud del paciente (3).

Su frecuencia es notoriamente mayor en países en vía de desarrollo donde cada 6 a 20 de 100 pacientes que consultan desarrollarán una IAAS (4). En Estados Unidos y Europa se estima que ocasionan entre 99 y 110 mil muertes anuales y 16 millones de días de estancia extra en hospitales (4)(5). Según el Centro de Control de Enfermedades (CDC), los costos médicos anuales de infecciones en el ámbito hospitalario en Estados Unidos oscilaron entre \$ 28 y \$ 45 mil millones de dólares hacia el 2007. En América Latina, a pesar de que las IAAS son una causa importante de morbilidad y mortalidad, se desconoce la carga de enfermedad producida por estas infecciones, aunque algunos países e instituciones se han aproximado a su cuantificación de manera independiente (3). A su vez, el problema de las IAAS se ha agravado por dos factores, la presencia de la resistencia antimicrobiana y la capacidad de algunos microorganismos de sobrevivir por periodos de tiempo prolongados en elementos inertes (6). Las IAAS causadas por gérmenes resistentes aumentan la gravedad de las patologías en los pacientes, el riesgo de infección en los trabajadores y los sobrecostos por parte de las instituciones de salud; por ello las estrategias de contención para las IAAS necesitan tener en cuenta la acción frente a microorganismos resistentes (7).

La adquisición de las IAAS tiene en cuenta tres escenarios determinantes asociados con la susceptibilidad del paciente a la infección, la virulencia de los microorganismos y el tipo de

exposición del paciente al agente infeccioso, relacionado con los mecanismos de transmisión que incluyen contacto directo con alimentos o implementos contaminados, la transferencia a través de las manos del personal de la salud, por inhalación de partículas infecciosas suspendidas en el aire, por vectores o superficies contaminadas (8).

La contaminación de las superficies del ambiente hospitalario por microorganismos varía de acuerdo con el número de personas y tipo de actividad laboral que se realiza, la humedad ambiental, la frecuencia de recambio de filtros para la purificación del aire, y la orientación de la superficie. Otros factores que contribuyen son la contaminación y crecimiento microbiano en textiles como cortinas, cubiertas para equipos, material de uso en el cuidado del paciente y del personal de salud como mantas, toallas, batas que están en contacto con fluidos corporales o partículas del ambiente (9)(10).

La prevención de IAAS está enfocada a las condiciones de la atención del paciente y del medio ambiente. Cuando una superficie está contaminada no significa que causará una infección en un paciente o en el personal de la salud. Para que una infección se considere transmitida por el ambiente se debe completar la cadena de transmisión, es decir, que exista un hospedero susceptible, una puerta de entrada adecuada y un inóculo de microorganismo suficientemente virulento (11).

Los nanomateriales se han convertido en una herramienta que ha producido un impacto en el ámbito médico, posicionándose como la tecnología del presente y futuro. Las nanopartículas (NP) poseen propiedades únicas basadas en características específicas (tamaño, distribución y morfología) que han permitido mejorar algunas características existentes en los textiles y han incorporado nuevas propiedades a los mismos como la auto-limpieza, repelencia al agua y la suciedad, propiedades antimicrobianas, conductividad y antiestáticos, resistencia a la abrasión y a la radiación UV y, disminución de permeabilidad a los gases e inflamabilidad (12). En el futuro la producción de nanotextiles que combinen nuevas funcionalidades, es decir, nanotextiles inteligentes multifuncionales podrían ser aplicados como una barrera de protección que impacte en la propagación de las IAAS (13).

En esta investigación se pretende sintetizar nanopartículas metálicas y óxido metálicas con características físico-químicas determinadas y con actividad microbiana que puedan ser

inmersas en textiles funcionales como posible estrategia para la contención de IAAS en el ambiente hospitalario.

6.2 Objetivos

6.2.1 General

Desarrollar una cubierta polimérica reforzada con nanopartículas metálicas y/o óxido metálicas, evaluando su potencial propiedad antimicrobiana para su aplicación en superficies del ambiente hospitalarios.

6.2.2 Específicos

- 6.2.2.1 Desarrollar una metodología de síntesis química de nanopartículas metálicas y/o óxido metálicas con propiedades antimicrobianas.
- 6.2.2.2 Determinar el efecto antimicrobiano de las nanopartículas sintetizadas, antes y después de su activación por radiación UV y visible, frente a bacterias que circulan en el ambiente hospitalario.
- 6.2.2.3 Desarrollar un tejido a partir de un polímero electrohilado reforzado con las nanopartículas sintetizadas.
- 6.2.2.4 Evaluar el efecto antimicrobiano del tejido obtenido, antes y después de su activación por radiación UV y visible.

7. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

7.1 Contaminación por microorganismos en textiles de uso hospitalario

Existe evidencia que soporta el rol que tienen los textiles que se usan en el área de la salud en la supervivencia y transmisión de patógenos en el ambiente hospitalario (14)(15)(16).

Las cortinas que rodean la cama del paciente, brindan privacidad y comúnmente están en contacto con ellos y con el personal de salud tanto por contacto directo con la piel como con aerosoles que se generan durante la estancia del paciente. Estudios microbiológicos realizados a las cortinas que rodean a los pacientes de diferentes servicios médico-quirúrgicos de dos hospitales en Estados Unidos encontraron estas cortinas contaminadas con patógenos, que con frecuencia se asocian IAAS, incluso resistentes a los antimicrobianos, como 43,9% con *Enterococcus* sp, 17,2-42% *Enterococcus* sp resistente a la vancomicina (VRE), 26,1% *Staphylococcus aureus* sensible, 22% *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) y 4% *Clostridium difficile* (17)(18). En Colombia, un estudio similar en un hospital de alta complejidad en Medellín, encontró que 30,5% de las cortinas de servicios médico quirúrgicos estaban contaminadas con MRSA, 35,5% *S. aureus* sensible y 13,5% con diferentes Gram negativos (19). Existen tres posibles explicaciones para este hallazgo y son el contacto frecuente de los pacientes y personal de salud con las cortinas, la falta de higiene de manos del personal de salud luego del contacto con los pacientes y con objetos inanimados, y la poca frecuencia de cambio o lavado de las cortinas. Una estrategia que pudiera minimizar el impacto de esta contaminación es usar cortinas diseñadas con materiales con propiedades antimicrobianas.

Así como las cortinas y otros textiles de uso ambiental, la ropa que utiliza el personal de salud también es susceptible a contaminarse con patógenos; su desplazamiento permanente por los diferentes servicios hospitalarios representa un vehículo de contaminación a superficies, equipos u otro tipo de materiales y a la transmisión de microorganismos que incluso pueden ser resistentes a múltiples fármacos (24). Un estudio realizado en personal de salud de un hospital de alta complejidad en Israel, encontró que 50% de la ropa (batas, ropa de cirugía o uniformes) del personal médico y de enfermería estaban contaminados por al menos un patógeno, 37% *Acinetobacter* spp., 13% *S. aureus* (incluso cepas MRSA), 8%

enterobacterias y 3% *Pseudomonas aeruginosa* (20). Otros microorganismos asociados con IAAS como *C. difficile*, *VRE*, *E. coli* también se han reportado en otros estudios (24). Frecuentemente los trabajadores de la salud utilizan la misma ropa durante uno o dos días, tiempo suficiente para que se adquieran, retengan y transmitan (directa o indirectamente) patógenos epidemiológicamente importantes como MRSA y VRE a compañeros del trabajo (representando un riesgo laboral), pacientes y el público en general (21)(22).

A pesar de que se ha demostrado la contaminación de la ropa del personal de salud con microorganismos del ambiente hospitalario, son pocos los artículos científicos que relacionan esa contaminación con infección directa con pacientes, debido principalmente a la falta de análisis de los textiles cuando se presentan brotes infecciosos. En la ropa que visten los pacientes y la ropa de cama también se han hallado evidencia de contaminación por patógenos (23). Entre 2005-2006 se reportó en Japón un brote de bacteriemias nosocomial (infecciones asociadas a catéter) por *Bacillus cereus*; los estudios realizados encontraron como principal fuente de la infección la contaminación de la ropa de cama (24) y las toallas de los pacientes, aunque la contaminación se observó en otras superficies ambientales, servicio de lavandería (25). La ropa usada constituye una fuente de sustratos para el crecimiento bacteriano debido a que los microorganismos tienden a proliferar en ambientes ricos en proteínas, humedad, y suciedad, condiciones fácilmente encontradas en los textiles que visten al personal de salud (26)(27). Un estudio realizado en un hospital de alta complejidad de Irlanda, que analizó prospectivamente el medio ambiente de 25 habitaciones de aislamiento de pacientes con MRSA, por un periodo de cuatro semanas, encontró que más de la mitad de las muestras tomadas fueron positivas para MRSA tanto en camas como en colchones y 70% de los aislamientos del medio ambiente eran idénticos o estaban estrechamente relacionados con los obtenidos en los pacientes, lo cual sugiere que la contaminación del medio ambiente pudo contribuir a la endemia de MRSA hospitalario (28).

Los patógenos poseen la maquinaria suficiente para adecuarse y sobrevivir durante largos periodos de tiempos en fómites y superficies exponiendo a los pacientes a pesar de las acciones de limpieza y desinfección que se realizan en los hospitales (29)(30). Si bien existe una creciente publicación de estudios sobre el rol de los textiles en la transmisión de

microorganismos, el impacto es subestimado debido a las pocas investigaciones puntuales durante los brotes o casos de infección en pacientes y su relación con los textiles. Adicionalmente, a pesar de que existen guías internacionales para la limpieza y descontaminación adecuada del ambiente hospitalario que permitan disminuir o erradicar la circulación de estos patógenos, no existen políticas claras, rigurosas y efectivas de su cumplimiento lo cual genera un subregistro de estas enfermedades y por lo tanto la evaluación del verdadero impacto que estas tienen en la salud humana.

7.2 Nanomateriales para el control de infecciones

La nanotecnología ha emergido como un campo multidisciplinario que crece rápidamente con amplias aplicaciones en ciencia y tecnología y con el propósito de manufacturar nuevos materiales en la escala nanométrica. La palabra “*nano*” proviene del griego, que significa extremadamente pequeño. Las nanopartículas son clústers de átomos en el rango de 1 – 100 nm y el uso de ellas está ligado a la mejora en las propiedades mecánicas, ópticas, eléctricas, físicas y químicas. Adicionalmente, poseen propiedades antimicrobianas sobre diferentes microorganismos que pueden atentar contra la salud. Hasta el momento se han sintetizado diferentes tipos de nanopartículas metálicas, entre ellas de plata (Ag), y óxido metálicas, como dióxido de titanio (TiO₂). Estas nanopartículas pueden ser usadas como método de “auto-desinfección” dentro de las nuevas estrategias que se están desarrollando para reducir la carga microbiana en las superficies ambientales y contribuir con una estrategia de prevención contra las infecciones asociadas a la atención en salud (31).

7.2.1 Nanopartículas de plata (NP-Ag)

La plata ha sido utilizada con fines antimicrobianos desde hace varias décadas, sin embargo, en la última década se han convertido en las nanopartículas metálicas más estudiadas y usadas para combatir y prevenir las infecciones de un amplio espectro de microorganismos. Estas poseen aplicaciones en biología, medicina, análisis químico, catálisis, electrónica, y en las industrias farmacéuticas, textil y cosmética. En el campo de la medicina son utilizadas en forma de líquidos o aerosoles para la descontaminación y desinfección de espacios y para modificar superficies de varios materiales, en particular fibras o polímeros (32)(33,34).

7.2.1.1 Síntesis de nanopartículas de plata

La síntesis de nanopartículas de plata se basa en técnicas de condensación y dispersión que corresponden a métodos *top – down*, los cuales consisten en la miniaturización de estructuras más grandes y los métodos *bottom – up* que explotan los procesos de agregación y la auto-organización (33).

Dentro de los métodos *bottom – up* el método de precipitación química es uno de los más utilizados. Este se basa en la reducción de iones metálicos en solución a partir de un agente reductor que puede ser borohidruro de sodio, ascorbato, citratos o hidratos de carbono. Después de la reducción de los iones metálicos, las nanopartículas sintetizadas se estabilizan mediante el recubrimiento con agentes niveladores. La estabilidad de las nanopartículas metálicas puede ser proporcionado por efecto estérico o repulsión electrostática (35). El uso de agentes activos de superficie como polímeros (polietilenglicol, poliácetato de vinilo, polivinilpirrolidona) o surfactantes no-iónicos (*Tween*, *Triton X-100*) mejoran la estabilización estérica. La protección electrostática de las nanopartículas se realiza a través de la adición de surfactantes iónicos (Dodecilsulfato sódico, bromuro de cetiltrimetilamonio) los cuales mejoran la carga en la superficie (35). Por otro lado, la estabilización electrostática y estérica se puede lograr simultáneamente por la absorción de polielectrolitos en la superficie de la nanopartícula (36)(37).

7.2.1.2 Mecanismo de acción antimicrobiano de nanopartículas de plata

La plata ha sido utilizada con fines antimicrobianos desde hace varias décadas, sin embargo, las NP-Ag se han convertido en la NP metálica más estudiada y usada para combatir y prevenir las infecciones relacionadas con un amplio espectro de microorganismos. Las NP-Ag han sido aplicadas en biología, medicina, análisis químico, catálisis, electrónica, y en la industria farmacéutica, textil y cosmética. En el campo de la medicina son utilizadas en forma de líquidos o aerosoles para la descontaminación y desinfección de espacios y para modificar superficies de varios materiales, en particular fibras o polímeros aplicados a ropa (32)(38)

Las NP-Ag no necesitan ser funcionalizadas con antimicrobianos (1), ellas ejercen su actividad antimicrobiana *per se* a través de la formación de iones Ag^+ que interactúan con la

membrana o pared celular y, con los elementos que se encuentran en el interior de los microorganismos(39). En la membrana y pared celular se unen a las partes cargadas negativamente de los grupos de proteínas que contienen disulfuro y fósforo, creando huecos en la membrana por los que fluye el contenido citoplasmático de las células, disipando el gradiente H^+ a través de la misma, y algunas veces causando la muerte celular bacteriana (40,41). Estas interacciones permiten a los iones Ag^+ pasar a través de la membrana y ejercer efectos antimicrobianos adicionales: inhibir los citocromos de la cadena transportadora de electrones; unirse al ADN y ARN ocasionándole daño; inhibir la replicación del ADN y por lo tanto la replicación celular; denaturar la subunidad ribosomal 30S; activar la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) e inhibir la síntesis de pared celular en las bacterias Gram positivas (38)(42,43).

La actividad antimicrobiana de las NP-Ag depende de varios aspectos (39,40)(44):

- *Entrega de los iones de plata a los microorganismos*: la plata metálica tiene efecto antimicrobiano débil, sin embargo, si se libera en forma de NP incrementa considerablemente este efecto.
- *Mecanismo de síntesis*: Lok *et al.* (45) sintetizaron NP-Ag oxidadas y reducidas bajo un ambiente controlado y encontraron que cerca del 12% de la plata se entrega en forma de Ag^+ y el efecto antimicrobiano bactericida o bacteriostático solo permaneció en NP oxidadas y no en las reducidas.
- *Tamaño*: una NP <10 nm tiene mayor efecto antimicrobiano porque pueden penetrar fácilmente la pared celular. Bera *et al.* (46) observaron gran actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas (*Staphylococcus epidermidis* y *Bacillus megaterium*), Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*) y cepas de hongos (*Candida albicans* y *Aspergillus niger*) de NP-Ag fluorescentes con diámetros entre 1 – 5 nm.
- *Forma de las NP-Ag*: está relacionada con una mayor superficie de área con relación al volumen (46). Pal *et al.* (47) reportaron actividad antimicrobiana contra *E. coli* dependiente de la forma. De acuerdo a sus hallazgos, de las tres formas comparadas (esférica, varilla y triangular), las nanopartículas con forma triangular truncada fueron

más reactivas y por lo tanto mostraron mayor actividad antimicrobiana, todo esto ligado a una mayor superficie de área en relación al volumen.

El espectro de microorganismos que son sensibles al efecto de las NP-Ag es amplio e incluyen aislamientos de microorganismos resistentes a los fármacos utilizados para su control.

Diferentes estudios han demostrado que las NP-Ag inhiben la tasa de crecimiento bacteriano desde el primer contacto de la NP, y además producen un efecto bactericida y bacteriostático. Lara *et al.* (42) demostró un efecto antimicrobiano con NP-Ag con un diámetro promedio de 100nm contra *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente, *Escherichia coli* O157:H7 resistente a ampicilina, *Streptococcus pyogenes* resistente a eritromicina. Kim *et al.* (48) reportó que las NP-Ag a bajas concentraciones inhibían el crecimiento de *E. coli* mientras que poseía un efecto medio contra *S. aureus*; estos hallazgos sugieren que la actividad antimicrobiana de las NP-Ag depende si la bacteria es Gram negativa o Gram positiva, es decir que es probable que las primeras sean más susceptibles a los iones Ag^+ que las segundas debido a las diferencias presentes en la composición de la pared celular. Otros autores sugieren que en las bacterias Gram negativas el efecto es inferior dado que ingresa menor cantidad de iones Ag^+ al citoplasma; su teoría se basa en que los iones Ag^+ se unen más fuertemente al lipopolisacárido cargado negativamente de la pared celular más externa y disminuye el ingreso de iones al citoplasma, mientras que en las Gram positivas se unen a la capa de peptidoglicano de la pared (42)(49).

Las NP-Ag también a bajas concentraciones inhiben el crecimiento de hongos como *Aspergillus* spp, *Trichophyton mentagrophytes* y diferentes especies de *Candida*, entre ellas *Candida albicans* (48)(50).

Kim *et al.* (51) reportó un efecto antifúngico de NP-Ag de forma esférica respecto a anfotericina B (1 – 5 $\mu\text{g/ml}$) y un efecto superior respecto a fluconazol (10 – 30 $\mu\text{g/ml}$), antifúngicos ampliamente utilizados en la práctica médica. Artunduanga *et al.* (52) demostraron el efecto antifúngico de NP-Ag contra tres tipos de especies de *Candida*. Se encontró que la concentración mínima fungicida (CMF) estuvo en el rango 0,25 – 0,5 $\mu\text{g/ml}$, y al evaluar la citotoxicidad en células fibroblásticas murinas se encontró una concentración potencialmente

citotóxica 100 veces mayor a la CMF (10 µg/ml), lo cual sugiere que las NP-Ag pueden ser usadas como antifúngico.

Según lo demostrado por Kim *et al.* (53), Hwang *et al.* (54), Monteiro *et al.* (55) y Vazquez-Muñoz *et al.* (56), el mecanismo de acción propuesto de las NP-Ag contra diferentes tipos de hongos está relacionado con la acumulación de las NP-Ag alrededor de la pared celular, inducción de la apoptosis a través de la exposición de fosfatidilserina, daño en el ADN, activación de las metacaspasas, disrupción de la integridad de la mitocondria, inducción de liberación de citocromo c e inhibición de formación de biopelículas.

Adicionalmente, las NP-Ag han demostrado ser agentes antivirales efectivos contra un espectro de virus como el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), el virus de la Influenza y virus Herpes Simplex (HSV) actuando tanto dentro del hospedero, inhibiendo la replicación del virus, y actuando a nivel de membrana celular, inhibiendo la entrada de partículas virales (57). Lara *et al.* (58) evaluaron NP-Ag entre 30-50 nm contra VIH-1. El estudio concluyó que las NP-Ag ejercen una actividad anti-VIH en la etapa temprana de la replicación viral, probablemente como un agente virucida o como un inhibidor de la entrada viral por la unión a la proteína gp120 de la envoltura viral, evitando así la unión, fusión e infectividad del virión dependiente de CD4. Los autores además concluyen que a pesar de que las NP-Ag tenga propiedades anti-VIH aún no queda claro cuál es el mecanismo de acción exacto de la NP-Ag, por lo que sugieren futuros estudios.

Por otro lado, Xiang *et al.* (59) revelaron que las NP-Ag con un diámetro promedio de 9.5nm destruyen selectivamente la estructura morfológica viral de Influenza H3N2 en un rango de 30 minutos – 2 horas.

Finalmente, Gaikwad *et al.* (60) demostraron la actividad antiviral dependiente del tamaño y el potencial Z de NP-Ag contra HSV-1, HSV-2 y el virus de la parainfluenza humana tipo 3 (HPIV-3). A menor tamaño, las NP-Ag se podrían unir al virus impidiendo su unión a la célula hospedera y, finalmente, resultando en la atenuación de la replicación viral.

Las nanopartículas de plata también han demostrado efecto antimicrobiano contra algunos parásitos. Un estudio realizado por Saini *et al.* (61) reportaron el efecto antiparasitario de

NP-Ag con un tamaño promedio de 15nm contra microfilarias de *Setaria cervi*. Se encontró un LC₅₀ de 5,61 µg/ml y un LC₉₀ de 15,54 µg/ml. Las nanopartículas indujeron apoptosis a través de la generación de ROS. Por otro lado, Rahimi *et al.* (62) encontraron que las NP-Ag a una concentración de 0.15mg/ml y un tiempo de exposición de 120 minutos tienen actividad contra *Echinococcus granulosus*. El efecto escolicida se atribuyó a la interacción electrostática entre las NP-Ag cargadas positivamente y el parásito cargado negativamente, esto asociado a complejos orgánicos de la superficie.

7.2.2 Nanopartículas de dióxido de titanio (NP-TiO₂)

El dióxido de titanio (TiO₂) es un semiconductor tipo n y tiene tres estructuras cristalinas conocidas como anatasa, rutilo y brookita. Las nanopartículas de TiO₂ tiene propiedades tales como mayor estabilidad, durabilidad, seguridad, efecto biosida y actividad fotocatalítica. Esta última propiedad está relacionada con la estructura, microestructura y purificación de los polvos sintetizados (63)(64).

La estructura anatasa es tetragonal con $a = 0,3785$ nm, $c = 0,9514$ nm y con una brecha prohibida de 3.2 eV (65). Esta estructura es metaestable a bajas temperaturas siendo más aplicable en catálisis y fotocatalisis debido a su mayor área superficial por unidad de volumen. La estructura rutilo es tetragonal con $a = 0.4593$ nm, $c = 0.2959$ nm y con una brecha prohibida de 3.02eV. La forma anatasa tiene más actividad fotocatalítica que rutilo (66). La estructura brookita es ortorrómbica con $a = 0.9182$ nm, $b = 0,5456$ nm, $c = 0,5143$ nm y con una brecha prohibida de 2.96eV.

Cuando el dióxido de titanio es irradiado con luz conteniendo mayor o igual energía que la de la brecha prohibida genera en su estructura pares electrón-hueco ($e^- - h^+$) que inducen reacciones oxido reducción en la superficie. Por consiguiente, los electrones del TiO₂ saltan de la banda de valencia a la banda de conducción, y se forma la pareja del electrón (e^-) y el hueco eléctrico (h^+) en la superficie. Los electrones negativos creados se combinan con el oxígeno formando O₂⁻, mientras que el hueco eléctrico positivo se combina con el agua formando radicales de hidroxilo (OH - H⁺). En cualquiera de las 3 estructuras del TiO₂ es necesaria una excitación con una longitud de onda $\lambda < 385$ nm para producirlos. En última

instancia, varias especies de oxígeno altamente activos pueden oxidar compuestos orgánicos de la célula a dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O)(66)(67).

La propiedad antimicrobiana de las nanopartículas de TiO_2 se relaciona con su estructura cristalina (estructura cristalina anatasa), forma y tamaño (68)(69).

Se ha propuesto que mediante el proceso de fotocatalisis que se da tras la radiación con rayos ultravioleta B (UVB) y A (UVA), NP- TiO_2 genera ROS del tipo peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales de hidroxilo (OH^\cdot) que dañan las paredes y membranas celulares bacterianas, comprometiendo la semipermeabilidad e interfiriendo con la fosforilación oxidativa, causando la muerte celular, siendo este el mecanismo que explica el efecto antimicrobiano de estas nanopartículas (68)(69).

Carré *et al.* (70) consideraron que esta actividad antimicrobiana fotocatalítica estaba acompañada de peroxidación lipídica que aumenta el flujo a través de la membrana, alterando la integridad de la célula. Sin embargo, el uso de NP- TiO_2 bajo luz UV está restringido a materiales externos debido al daño genético que puede causar en las células y tejidos humanos (71); una opción para mejorar esta propiedad de las NP- TiO_2 es doparlas con otro ion metálico, esto produce un desplazamiento en el rango de absorción de luz al espectro visible, y por lo tanto no hay necesidad de irradiar con luz UVB (72).

Por su parte, Roy *et al.* (73) evaluaron el efecto de NP- TiO_2 funcionalizadas con diferentes antibióticos contra *S. aureus* MRSA. Ellos encontraron que las NP- TiO_2 mejoraron el efecto antimicrobiano de los antibióticos beta-lactámicos, cefalosporinas, aminoglucósidos, glicopéptidos, macrólidos, lincosamidas y tetraciclina contra MRSA. En otro experimento, se observó que la resistencia antimicrobiana de MRSA contra varios de los antibióticos decrecía con la presencia de NP- TiO_2 .

A pesar de los resultados de los estudios anteriores, en ausencia de radiación también se ha encontrado actividad antimicrobiana de las NP- TiO_2 lo que sugiere que estas NPs usan otro tipo de mecanismo antimicrobiano diferente a la fotocatalisis que aún no ha sido dilucidado.

Adicionalmente, las NP- TiO_2 han mostrado tener propiedades antivirales contra el virus de la Influenza aviar H9N2. Jiang *et al.* (74) y Cui *et al.* (75) observaron que las NP- TiO_2 en su

fase anatasa combinada con Cu^{+2} significativamente inactivan el virus bajo una radiación a 365 nm llegando a ser virucida hasta en un 100%.

Las NP-TiO₂ poseen un efecto antiparasitario. Allahverdiyev *et al.* (76) observaron en dos especies de *Leishmania* el efecto antiparasitario a partir de una combinación de NP-TiO₂ NP-Ag. Las NP-Ag tenían un diámetro promedio de 7nm, mientras que las NP-TiO₂ tuvieron un diámetro de 40 nm. Esta mezcla posee la capacidad de inhibir propiedades biológicas como viabilidad, actividad metabólica y supervivencia dentro de las células hospederas. Adicionalmente se encontró incrementado el efecto antiparasitario dos veces por encima cuando las nanopartículas fueron irradiadas con luz visible.

7.3 Caracterización físico-química de las nanopartículas con efecto antimicrobiano

Se han usado una gran variedad de técnicas para caracterizar y medir las propiedades de las nanopartículas. A continuación se describe brevemente las técnicas más comunes aplicadas a las nanopartículas (77)(78)(79):

7.3.1 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Este modo de operación microscópica se debe a los electrones secundarios emitidos por la superficie de la muestra después de la excitación por el haz de electrones. Aunque las imágenes SEM tienen una resolución menor que TEM, el SEM es mejor para obtener imágenes de muestras a granel y tiene una mayor profundidad de vista, dando lugar a mejores imágenes en 3D de la muestra.

7.3.2 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Los electrones pasan a través de la muestra, requiere que las nanopartículas estén dispersas en un sustrato transparente a electrones tal como una delgada rejilla revestida de carbono. Esta técnica tiene la ventaja de un alto contraste de los átomos metálicos y la pasivación de moléculas orgánicas o polímeros.

7.3.3 Espectroscopía de rayos X de dispersión de energía (EDX)

Es una técnica analítica utilizada para el análisis elemental o caracterización química de una muestra. Se usa generalmente junto con el SEM o TEM. Se basa en una interacción de una fuente de excitación de rayos X y una muestra. Un haz de electrones (10-20keV) golpea la superficie de una muestra conductora, provocando la emisión de rayos X, con energías que dependen del material en estudio. Los rayos X se generan en una región de aproximadamente 2 mm de profundidad. El haz de electrones se escanea a través de la muestra, permitiendo obtener una imagen de la distribución de cada elemento en la muestra. Sus capacidades de caracterización se deben en gran parte al principio fundamental de que cada elemento tiene una estructura atómica única que permita único conjunto de picos en el espectro de rayos X. EDX es una técnica de alta resolución que permite determinar espacialmente la composición química de nanopartículas individuales.

7.3.4 Espectroscopía ultravioleta visible (UV-vis)

La espectroscopía ultravioleta-visible es una espectroscopia de emisión de fotones y una espectrofotometría. Utiliza radiación electromagnética (luz) de las regiones visible, ultravioleta cercana (UV) e infrarroja cercana (NIR) del espectro electromagnético, es decir, una longitud de onda entre 380 nm y 780 nm. La radiación absorbida por las moléculas desde esta región del espectro provoca transiciones electrónicas que pueden ser cuantificadas. Se utiliza para identificar algunos grupos funcionales de moléculas y para determinar el contenido y fuerza de una sustancia. Además, se usa en la determinación cuantitativa de los componentes de soluciones de iones de metales de transición y compuestos orgánicos altamente conjugados. Los componentes de un equipo de espectroscopía de UV-Vis son: (1) fuente de radiación; (2) sistema óptico (monocromador, filtros o ventanas, espejos y dispersor o red de difracción); (3) compartimiento para las muestras y (4) detector. En general el material usado para la construcción de la celda, monocromador y las ventanas es el cuarzo, ya que su rango inferior de transmisión alcanza los 190 nm, lo cual es muy útil para el caso de analitos que absorben a longitudes de onda menores a 300 nm.

7.3.5 Espectroscopía de absorción atómica (AAS)

La espectroscopía de absorción atómica (AAS) es uno de los métodos espectrofotométricos más ampliamente usados para la determinación analítica de elementos. Es una técnica muy empleada en la determinación de metales como plata, oro, sodio, cadmio, calcio, cesio, cromo, cobalto, plomo, níquel, entre otros. Se emplea en el análisis de aguas y suelos, en toxicología, bioquímica, en las industrias farmacéutica, alimenticia y petroquímica.

La técnica de AAS consiste en la determinación de especies atómicas mediante la absorción a una longitud de onda particular. Las especies atómicas se obtienen mediante la atomización de la muestra, la cual se puede realizar a la llama o mediante horno de grafito. Un equipo de absorción atómica consta de tres partes: una fuente de radiación, un medio para la obtención de átomos libres (horno de grafito, en este caso) y un sistema para medir el grado de absorción de la radiación de la muestra mediante una lámpara de cátodo hueco construida del mismo elemento a cuantificar. Los valores de concentración de la especie se obtienen utilizando curvas de calibración construidas a partir de soluciones de concentraciones conocidas del metal y utilizando la ley de Lambert-Beer.

7.3.6 Dispersión dinámica de la luz (DLS)

La dispersión dinámica de luz (DDL o DLS, por sus siglas en inglés de "*Dynamic light Scattering*") es una técnica físico-química empleada para la determinación de la distribución de tamaños de partículas en suspensión o macromoléculas en solución tales como proteínas o polímeros. La luz láser al alcanzar las numerosas partículas que hay en una suspensión, se dispersa en todas las direcciones posibles. Si se separa una dirección, los haces de luz dispersados por distintas partículas interfieren entre sí y se obtiene una intensidad de dispersión determinada.

Como consecuencia del movimiento browniano las posiciones relativas de las partículas varían constantemente entre sí, cosa que también provoca cambios en las condiciones de interferencia y en la propia intensidad de dispersión. Si las partículas se mueven rápidamente (partículas pequeñas), también se acelera la variación de la intensidad de dispersión. Por el contrario, las partículas lentas (grandes) llevan a variaciones más lentas. Por norma general,

en la dispersión de luz dinámica la suspensión de la muestra permanece en reposo. El término "dinámica" no se refiere al movimiento de la muestra como un conjunto, sino a la "vibración" de las partículas que la componen.

7.3.7 Dispersión de Rayos X (DRX)

La dispersión de rayos X es generalmente utilizada para estudiar la superficie de las nanopartículas con lo cual se obtiene información sobre la estructura, cristalinidad, forma cristalina, tamaño de partícula y composición química.

7.4 Electrohilado

El proceso de "electrospinning" "hilatura electrostática" o "electrohilado" se deriva de dos técnicas conocidas, el electrospray y la hilatura o spinning. Actualmente es la única técnica capaz de producir fibras continuas ultradelgadas del tamaño de los submicrones a nanómetros. En la última década, el electrohilado ha ganado un enorme interés científico, no solo por ser una técnica versátil y estable, sino también por tener una gran variedad de aplicaciones, como por ejemplo, ingeniería de tejidos, liberación controlada de fármacos, filtración, electrónica, sensores entre otros (80)(81). Las ventajas más importantes de la técnica incluyen la formación de fibras con diámetros que varían desde micrómetros hasta nanómetros, altas porosidades y largas superficies de áreas, al igual que la capacidad de imitar la matriz extracelular de los tejidos tanto química como mecánicamente (82)(83).

El electrohilado se compone de tres elementos básicos: una fuente de alta tensión con una polaridad positiva y negativa que garantiza un campo eléctrico continuo, un capilar (que puede ser una aguja, que contiene la disolución de polímero) a través del cual el líquido es forzado a fluir, y un colector metálico (usualmente papel o placa de aluminio, tambor rotatorio) en el cual se recogen las fibras resultantes. Un electrodo de la fuente de alimentación de alta tensión está conectado al capilar o se encuentra dentro de la solución y el otro está conectado al colector, por lo general, conectado a tierra (84). El electrohilado se lleva a cabo controlando la temperatura y la humedad, con configuraciones tanto horizontales como verticales (85).

Para forzar el líquido a fluir, se utiliza una bomba mecánica, la fuerza gravitacional o gas presurizado; a medida que el líquido va fluyendo a través de un capilar de diámetro pequeño, y es aplicado un campo eléctrico constante, se comienza a formar una gota colgante en la punta (80). El incremento de la fuerza del campo eléctrico permite electrizar altamente la gota y las cargas inducidas se distribuyen de manera uniforme sobre la superficie de la solución de polímero. La gota experimenta dos tipos de fuerzas electrostáticas: la repulsión electrostática entre las cargas en la superficie y las fuerzas Coulomb en el campo exterior. Bajo la influencia de estas dos fuerzas, la gota se alarga distorsionándose en el denominado cono de Taylor y acelerándose hacia el colector conectado a tierra (86).

Durante el proceso de elongación del chorro, el solvente se evapora, dejando una fibra de polímero cargada. Como la humedad relativa aumenta, el proceso de solidificación se vuelve más lento, lo que permite continuar más tiempo el alargamiento del chorro cargado y, por lo tanto, formar fibras más delgadas. Las fibras de polímero sólidas se depositan en una placa colectora conectada a tierra.

En particular, la morfología y la estructura de las fibras depositadas dependen en gran medida del método de recogida. Una estera de fibras orientadas al azar se puede recoger con una placa estacionaria, otras configuraciones de colectores tales como un tambor giratorio, marco, baño de disolvente, campo eléctrico o magnético auxiliar, han sido utilizados para recoger matrices bien alineadas de fibra, estera de fibra en patrones, hilo de fibra o cuerda, construcción tubular, entre otros. (84).

Aunque el electrohilado es relativamente fácil de manejar, existen varios tipos de parámetros que pueden afectar directamente la formación y estructura de las fibras y la creación de defectos de gota. Estos parámetros están asociados con la solución, el procesamiento y el ambiente. La tabla 1 resume los parámetros que afectan el proceso de electrohilado.

Tabla 1. Efecto en la morfología de la fibra de los parámetros de procesamiento, solución y ambientales.

Parámetros	Efecto en la morfología de la fibra con el aumento de los parámetros
Procesamiento	
Voltaje aplicado	↓ diámetro de la fibra inicialmente, luego ↑ diámetro
Velocidad de flujo	↑ diámetro de la fibra, generación de gotas con velocidades muy altas
Distancia entre el inyector y el colector	↓ diámetro de la fibra, generación de gotas con distancias o muy pequeñas o muy grandes
Solución	
Concentración del polímero	↑ diámetro de la fibra
Peso molecular del polímero	↑ diámetro de la fibra
Viscosidad	↑ diámetro de la fibra, desaparición de gotas
Conductividad	↓ diámetro de la fibra
Tensión superficial	Sin determinar
Ambientales	
Humedad	Presencia de poros circulares en las fibras
Temperatura	↓ diámetro de las fibras

7.5 Textiles funcionales: innovación en propiedades a través de nanopartículas

Recientemente se han desarrollado nuevas fibras para textiles que han servido como barreras de protección con aplicaciones en el ambiente hospitalario, ropa deportiva, y servicios sanitarios (87)(88).

Entre los diferentes tipos de fibras, las naturales y las sintéticas son las más utilizadas para este tipo de textiles. Las fibras naturales pueden ser de origen vegetal, como es el caso de algodón, seda, lana entre otros. Las fibras sintéticas se obtienen a partir de polímeros sintéticos, como nylon, poliéster, acrílicos, polipropileno, entre otros (89). Estas fibras se pueden disponer en diferentes tipos de patrones permitiendo obtener tejidos, tejidos de punto o no tejidos. Los tipos de fibras generalmente usados para aplicaciones en el ambiente hospitalario son principalmente de algodón, rayón, nylon, poliéster, y mezclas de poliéster con algodón o rayón, dependiendo de la aplicación (90).

En los últimos textiles desarrollados se ha optado por incorporar nanopartículas que confieren características físicas y químicas a las fibras, tales como propiedades de aislamiento eléctrico, repelencia a los fluidos, resistencia al fuego, y propiedades antimicrobianas, las cuales los convierten en textiles funcionales (91). Adicionalmente, las nanopartículas usadas para reforzar las fibras en los textiles tienen la capacidad de otorgar un mayor tiempo de vida de uso relacionado con el cuidado y la limpieza (92)(93).

Las nanopartículas con efecto antimicrobiano no buscan reemplazar los métodos convencionales de lavado, sino proporcionar una nueva estrategia que permita disminuir la frecuencia con la cual es requerido el lavado de un textil del área de la salud, lo cual se traduce como un ahorro en el consumo de agua y energía, y menor necesidad de agentes químicos en el cuidado del textil (94)(95). También se debe tener en cuenta el potencial beneficio ambiental, puesto que la mayoría de los recursos consumidos usados en la vida y cuidado de un textil provienen del medio ambiente (96)(97).

Los textiles con características antimicrobianas pueden ser usados como estrategia de prevención de contaminación de diferentes microorganismos puesto que ayudan a disminuir la carga microbiana presente en el ambiente, en la ropa de los pacientes y el personal de salud. Estos textiles deben estar diseñados de forma tal que permitan una fácil limpieza y prevengan la presencia de polvo, por lo que al escoger los materiales se deben evitar materiales porosos o con texturas irregulares. La característica deseada se relaciona con la capacidad de alargar su vida útil, resistir el proceso de limpieza y desinfección necesaria en los centros médicos o contar con un proceso de desinfección propio a través de las nanopartículas (98).

En este sentido, diferentes grupos científicos han concentrado sus esfuerzos en la evaluación de las fibras y sus propiedades antimicrobianas. Pollini *et al.* (99) incorporaron nanopartículas de plata a hilos en cono de algodón y poliéster (Polietilentereftalato, PET) confirmando su actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli*. Se concluyó que las nanopartículas tenían estabilidad apropiada en las fibras tratadas, incluso después de realizar lavados industriales a las mismas.

Por otro lado, Barani *et al.* (100) produjeron hilos en cono híbridos de nanofibras de poli vinil alcohol (PVA) y ácido poli-L-láctico (PLLA) conteniendo diferentes concentraciones de nanopartículas de plata (0, 5, 10 y 20 %). La síntesis de las nanopartículas se realizó *in situ* y se usó la técnica de electrohilado para producir las fibras. Se confirmó la síntesis uniforme de NP-Ag sobre las nanofibras de PVA. La evaluación antimicrobiana se realizó contra *S. aureus* y *E. coli* siguiendo el método modificado AATCC 100-2004. Se observó una reducción de al menos 4 logaritmos comparado con el número inicial de bacterias inoculadas. El incremento del contenido de plata en la solución de polímero conlleva a la formación de agregados de NP-Ag en la superficie de las fibras, lo que conlleva a la disminución de las propiedades antimicrobianas.

Perera *et al.* (101) y Balakumaran *et al.* (102), incorporaron NP-Ag a fibras de algodón con diferentes métodos de síntesis evaluando sus propiedades antimicrobianas. Se encontró que la síntesis *in situ* permitía la formación de NP-Ag distribuidas uniformemente en las fibras con actividad microbicida contra *S. aureus* y *E. coli*. Adicionalmente, después del lavado, la síntesis *in situ* todavía conservada adecuadas propiedades físicas y antimicrobianas comparadas con la síntesis *ex situ*, en la cual dichas propiedades disminuyeron.

Bearman *et al.* (103) identificaron una reducción de 6 logaritmos de MRSA en ropa tratada con tecnología *Vestex* (producto patentado con propiedades de antilíquidos, transpirable y antimicrobiana) en comparación con ropa no tratada, tanto al inicio como al final del turno de trabajo de enfermería. Aunque para VRE y bacilos Gram negativos no se obtuvo la misma reducción.

Zhao *et al.* (104) realizaron nanofibras a partir del electrohilado de nanopartículas Ag/poli vinil alcohol/carboximetil quitosano. El diámetro de las fibras osciló entre 4-14nm, y tuvieron actividad antimicrobiana contra *E. coli*.

Dastjerdi *et al.* (105) produjeron fibras de polipropileno junto con NP-Ag y NP-TiO₂ con Ag. Se calcularon propiedades físicas de los filamentos de *yarn* y la actividad antibacteriana después de un tiempo de contacto específico calculado por el porcentaje de reducción de *S. aureus* (ATCC 25923). Se observó una disminución de 99,24% en la eficiencia bioestática

con un porcentaje de nanopartículas al 0.2%, mientras que se obtuvo un 99,95% de eficiencia bioestática para un porcentaje de 0.5% de nanopartículas.

Por otro lado, Schweizer *et al.* (106) y Kotsanas *et al.* (107) desarrollaron estudios clínicos en ciertas áreas hospitalarias para evaluar cortinas con NP-Ag propiedades antimicrobianas. Se encontró que el textil con partículas de plata duraba 7 días más antes de tener la primera contaminación bacteriana comparado con la cortina estándar, lo cual hace posible disminuir la transmisión de patógenos (106). Adicionalmente, se encontró que las cortinas con NP-Ag tuvieron actividad antimicrobiana contra 14 patógenos bacterianos, que incluían *C. difficile*. Adicionalmente, se hizo una evaluación costo-efectiva que demostró el uso benéfico de estas cortinas en la unidad de cuidado intensivos (UCI)(107).

CONFIDENCIAL

8. METODOLOGÍA

Se presenta la metodología acorde a cada objetivo específico del estudio.

8.1 Desarrollo de una metodología de síntesis química de nanopartículas metálicas y/o óxido metálicas y caracterización

8.1.1 Nanopartículas de plata (NP-Ag)

El desarrollo de la síntesis de NP-Ag fue basado en el método de reducción química, utilizando agua Milli Q® como solvente, publicado por Brown *et al.* (1). Este método inicia con la reducción de una sal precursora, AgNO_3 (nitrato de plata, PANREAC CAS 7761-88-8), por medio del reductor NaBH_4 (Borohidruro de sodio, Sigma-Aldrich CAS 16940-66-2) y un estabilizador $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$ (citrato de sodio, Sigma-Aldrich CAS 6132-04-3). Se mezcla 185 ml de agua Milli Q® con 5 ml al 0,01 M de $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$ y 5 ml al 0,01 M de AgNO_3 la cual es agitada a 3000 r.p.m. por tres minutos a 10°C . Luego, se agrega gota a gota 5 ml al 0,01 M de NaBH_4 para reducir la solución.

Una vez sintetizadas las nanopartículas se almacenaron a 4°C en frascos ámbar para proteger de la luz. La figura 1 representa el proceso de síntesis química de las nanopartículas de plata.

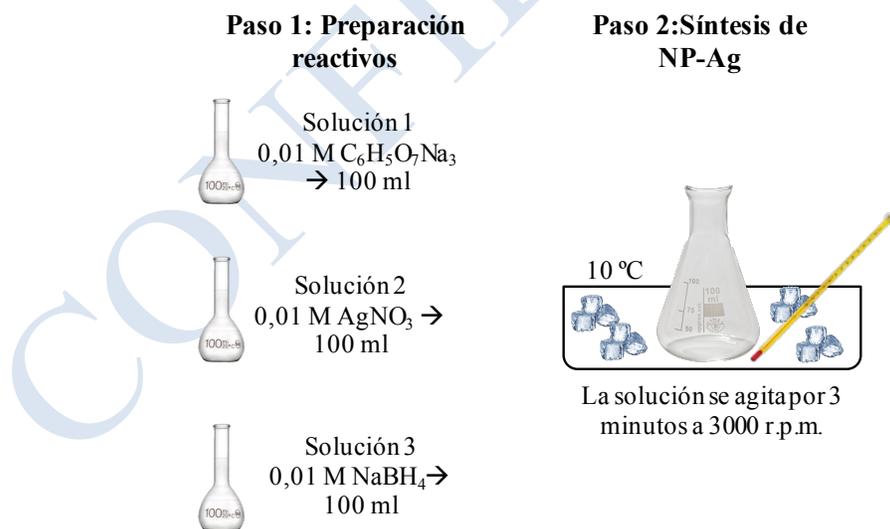


Figura 1. Proceso de síntesis química de las nanopartículas de plata según Brown *et al.* (1).

Se realizaron caracterizaciones físico-químicas de tamaño, morfología y concentración. A partir de espectroscopia UV-visible (Uv probe 1601pc Shimadzu, Japón) con una celda de cuarzo de 1 cm para obtener la resonancia plasmónica. Se analizó la concentración del coloide a partir de espectroscopia de absorción atómica, técnica que permite determinar la cantidad de especies atómicas de plata (Thermo Scientific ICE 3000, USA). Se obtuvo el tamaño promedio \bar{z} y los datos de polidispersidad basado en mediciones consecutivas de subgrupos de partículas a partir de dispersión dinámica de la luz (Zetasizer Nano Series Malvern Instruments, USA); se utilizó el microscopio electrónico de transmisión (Tecnai F20 Super Twin TMP) para estudiar la morfología de las nanopartículas a un voltaje de aceleración de 200kV.

8.1.2 *Nanopartículas de dióxido de titanio (NP-TiO₂)*

Las NP-TiO₂ se sintetizaron a través de la técnica de sol-gel. Se usaron diferentes metodologías para lograr obtener las NPs de menor tamaño. Las cinco rutas realizadas fueron:

1. Una mezcla de 20,95 ml Ti(OCH₂CH₂CH₂CH₃)₄ (butóxido de titanio – Sigma-Aldrich CAS 5593-70-4) con 24,1 ml de CH₃CH₂OH (etanol – Sigma-Aldrich CAS 64-17-5). A la mezcla resultante se le agregó 4,97 ml de H₂O para finalmente adicionar 1 ml de HNO₃ al 5 % (ácido nítrico Sigma-Aldrich CAS 7697-37-2).
2. Una mezcla de 20,95 ml Ti(OCH₂CH₂CH₂CH₃)₄ con 24,1 ml de CH₃CH₂OH. A la mezcla resultante se le agregó 4,97 ml de H₂O, se adicionó 1 ml de HNO₃ al 5 % y se ajustó el pH 12 con NaOH.
3. Una mezcla de 38,17 ml Ti(OCH₂CH₂CH₂CH₃)₄ con 10,98 ml de CH₃(CH₂)₃OH (Butanol – Sigma-Aldrich CAS 71-36-3). La mezcla resultante se agitó por 20 minutos para luego adicionar 0,85 ml de H₂O. Se agitó otros 20 minutos.
4. Una mezcla de 5 ml Ti(OCH₂CH₂CH₂CH₃)₄ con 25 ml de CH₃CH₂OH. A la mezcla resultante se le agregó 2,5 ml de CH₃COOH (ácido acético – Sigma-Aldrich CAS 64-19-7) y 3,12 ml de H₂O.

5. Se obtuvo una mezcla de 12,57 ml de $\text{Ti}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)$ con 14,46 ml de $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$. A la mezcla resultante se le agregó gota a gota 2,9 ml de agua destilada, lo cual permitió la formación por hidrólisis de una suspensión blanca. Finalmente, se agregó 1 ml de HNO_3 al 5 %. La solución fue agitada vigorosamente por 1 h para obtener un sol blanco.

Los productos de todas las rutas de síntesis fueron secados a 80°C por 24 horas para generar el gel, y luego se calcinó el material en la mufla (Isotemp®, Fisher Scientific, USA) a 450°C por 1 hora para generar los óxidos.

Las NP- TiO_2 finales obtenidas se escogieron de acuerdo al diámetro y fueron caracterizados según la morfología, composición química y estructura cristalina a través de SEM (JEOL JSM 6490 LV). Las muestras se fijaron en una cinta de grafito, se les realizó un recubrimiento delgado en oro (Au) (DENTON VACUUM Desk IV) y se analizaron en alto vacío con el fin de obtener imágenes en alta resolución. Se empleó el detector de electrones secundarios para evaluar la morfología y topografía de las muestras. El análisis elemental se realizó mediante una Microsonda de rayos X-EDX (INCA PentaFETx3 Oxford Instruments). Adicionalmente, la estructura cristalina de las NP- TiO_2 fue caracterizada a partir de difracción de rayos X con (XPert PANalytical Empyrean Series II) usando radiación $\text{Cu K}\alpha$ y con detector PIXcel 3D para identificar en en qué fase cristalina se encontraban: anatasa, rutilo o brookita.

Se estimó el promedio del tamaño cristalino (diámetro) L mediante la fórmula de Debye – Scherrer:

$$L = \frac{K\lambda}{\beta \cos \theta}$$

Donde K es la constante de Scherrer, cuyo valor es de 0,94, λ corresponde a la longitud de onda de la radiación de rayos X ($1,54044 \text{ \AA}$ para $\text{Cu K}\alpha$), β es el ancho de la línea a la altura media máxima de la ampliación principal y θ es la posición de difracción del pico. Su estimación se presenta en nanómetros.

8.2 Evaluación del efecto antimicrobiano de las nanopartículas

8.2.1 Evaluación antimicrobiana de NP-Ag

Se escogieron los lotes con mejores propiedades morfológicas, diámetro (<20 nm), y menor aglomeración para evaluar la actividad antimicrobiana. Estas propiedades están relacionadas potencialmente con el efecto antimicrobiano (efecto antimicrobiano, antibacteriano y antifúngico)(44).

La actividad antibacteriana de las NP-Ag se evaluó a través del método de macrodilución en las bacterias Gram negativas *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* con resistencia AmpC (aislamiento clínico criopreservado a -80°C) y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27823, y en bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Previo a los ensayos, cada bacteria fue cultivada en agar Müeller-Hinton (BD, REF 211438) por siembra extendida durante 24 horas a 37°C en un ambiente de aerobiosis. Pasadas 24 horas se subcultivó en medio de cultivo líquido *Brain Heart Infusion* (BHI, BD REF 211065) por un tiempo no mayor de 18 horas a 37°C. Luego se ajustó la concentración del cultivo a un McFarland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ unidades formadores de colonias (UFC/ml)) utilizando un espectrofotómetro (Genesys 20, Thermo Scientific USA) a una longitud de onda de 600 nm con una absorción entre 0,08 – 0,1.

Posteriormente, se realizó una dilución que permitió tener una concentración de bacterias de 5×10^4 UFC/ml en 15 ml de medio BHI. De manera independiente, usando una solución madre de NP-Ag y soluciones diluentes específicas (NH_3 , HNO_3 , NaOH) se obtuvieron diferentes concentraciones a 65, 40, 20, 10 y 5 ug/ml. A cada dilución se le adicionó 150 ul de citrato de sodio al 0,02 M para evitar la aglomeración de las nanopartículas. Consecutivamente, se mezcló 1 ml de la dilución de NP-Ag con 1 ml del cultivo de bacterias para obtener una concentración final de $2,5 \times 10^4$ UFC/ml. Todos los tubos se incubaron por 24 horas a 37°C y 60 r.p.m. protegidos de la luz en un incubador-agitador (Rosy 1000, Thermolyne USA).

Los efectos inhibitorio y bactericida de las NP-Ag fueron determinados con la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) a las 2, 4, 6, 8, y

24 horas de incubación de las bacterias con las diferentes concentraciones de nanopartículas; se tomó 24 horas como tiempo para definir CMI y CMB. Para esto, de cada dilución con las bacterias se tomaron 10 μ l y se transfirieron a cajas de agar Müller-Hinton distribuyéndolo en toda la superficie de la misma. Se incubó por 24 horas a 37°C y se determinaron las UFC/ml. El límite superior tomado para este estudio fue de 300 UFC/ml. En cada ensayo se realizó un control de esterilidad a las soluciones de NP-Ag, diluyente y citrato de sodio al 0,02 M. El control de viabilidad se estableció con la solución diluyente sin NP-Ag y la dilución del cultivo de bacterias a $2,5 \times 10^4$ UFC/ml.

La figura 2 representa el proceso de evaluación del efecto antibacteriano de las NP-Ag.

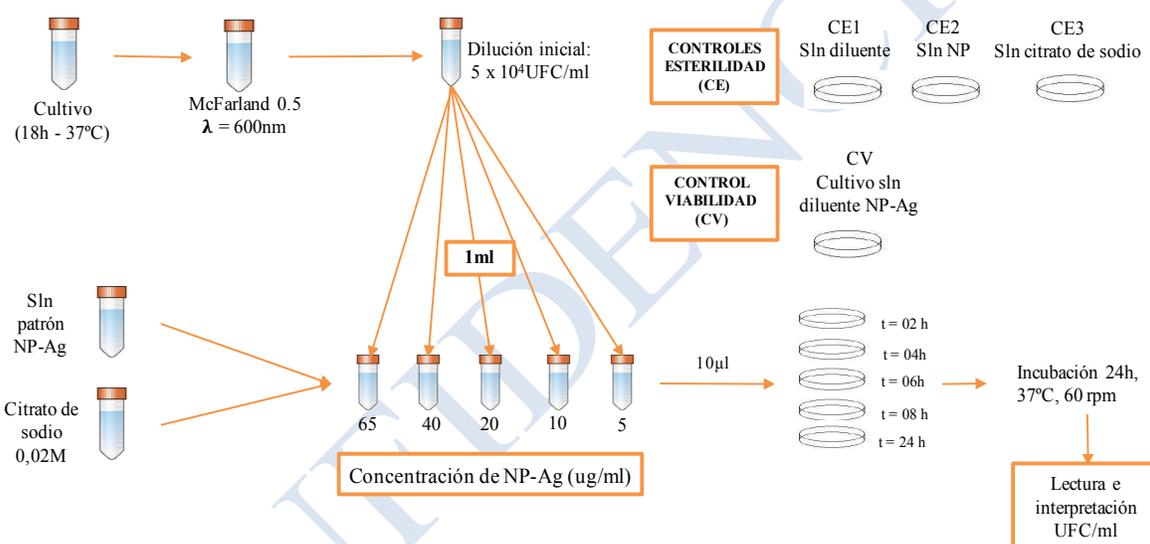


Figura 2. Evaluación del efecto antibacteriano de los lotes de NP-Ag.

El efecto antifúngico de NP-Ag sobre *Candida albicans* ATCC 14053 se evaluó con el método de la microdilución. Previo a los ensayos, el microorganismo fue cultivado en agar Sabouraud (BD, REF 210950) por siembra extendida durante 48 horas a 37°C en un ambiente de aerobiosis. Pasadas 48 horas se subcultivó en medio BHI por un tiempo no mayor de 48 horas a 37°C. A partir de una solución madre de NP-Ag y soluciones diluentes específicas (NH_3 , HNO_3 , NaOH) se obtuvieron diferentes concentraciones de nanopartículas a 100, 50, 25, 12,5, 6,25 y 3,125 $\mu\text{g/ml}$ en 500 μl . Luego se ajustó la concentración del cultivo a un McFarland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ células/ml) utilizando un espectrofotómetro (Multiskan Go, Thermo

Fisher Scientific Finlandia) con una longitud de onda de 625 nm con una absorción entre 0,08 – 0,1; posteriormente, se realizó una dilución que permitió tener una concentración de *C. albicans* de $2,5 \times 10^3$ células/ml en 5 ml de medio BHI. Consecutivamente, se obtuvo una mezcla final de 250 ul así: 20 ul de las diferentes diluciones de NP-Ag, 10 ul del cultivo diluido para *C. albicans* y 220 ul de medio BHI ajustado, con ello se obtuvo una concentración final de $2,5 \times 10^3$ células/ml. La mezcla final se depositó en una microplaca de 96 pozos (Costar REF 3599) y fue incubada en un incubador-agitador (Rosy 1000, Thermolyne USA) por 24 horas a 37°C y 60 r.p.m., protegida de la luz.

A las 24 horas de incubación se determinó mediante espectrofotometría, la absorbancia de cada pozo, con una longitud de onda 530 nm. Se tomó de cada pozo 10 ul que fueron transferidos a cajas de agar Sabouraud para su incubación durante 48 horas a 37°C y determinación de la presencia de crecimiento del microorganismo. Los efectos inhibitorio y fungicida de las diferentes concentraciones de NP-Ag fueron determinados con la Concentración Letal al 50% (LC₅₀), que representa la concentración que mata al 50% de una población evaluada, y la Concentración Mínima Fungicida (CMB) a las 24 horas de incubación de *C. albicans*.

En cada ensayo se realizó un control de esterilidad a las soluciones de dilución de nanopartículas más medio de cultivo, medio de cultivo solo y medio de cultivo más solución diluyente. El control de efecto antimicrobiano se realizó con fluconazol 99% (Pfizer, lote 04821) a 10 y 5 ug/ml. El control de viabilidad se estableció con el diluyente sin nanopartículas más las dos soluciones del microorganismo: a) dilución del cultivo de *C. albicans* a $2,5 \times 10^3$ células/ml b) McFarland 0,5. La figura 3 representa el proceso de evaluación del efecto antifúngico de las NP-Ag.

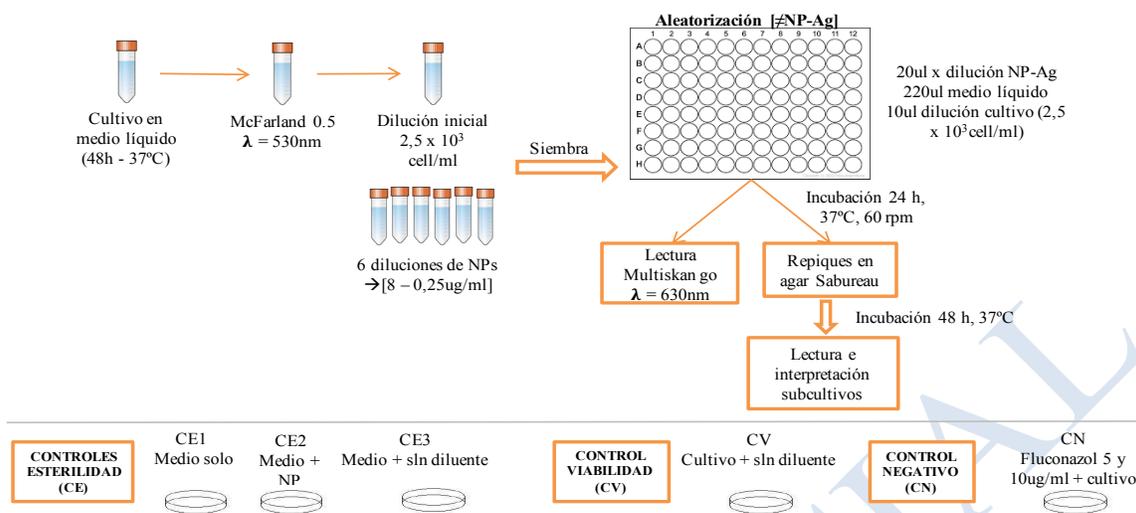


Figura 3. Evaluación del efecto antifúngico de los lotes de NP-Ag.

8.2.2 Evaluación antimicrobiana de NP-TiO₂

Debido a las características hidrófobas de NP-TiO₂ fue necesario ejecutar varias estrategias de funcionalización para lograr que se dispersaran de manera homogénea en el medio de cultivo. Las técnicas se listan en la tabla 2.

Tabla 2. Metodologías usadas para dispersar las NP-TiO₂.

Reactivos	Cantidad (ml)	Energía dispersante	Tiempo de dispersión homogénea (minutos)	Temperatura (°C)
Agua	20	agitación	2000	60
Ácido hexanóico	2			
Agua	20	agitación	30	ambiente
Acetaldehído	2			
Agua	20	ultrasonicación	30	ambiente
Tween 20	0,2			
Agua	20	agitación	30	ambiente
DMSO*	9			
Tween 20	0,2			
BHI	15	ultrasonicación	15	ambiente
DMSO	0,3			
Agua	13	ultrasonicación	30	60
DMSO	1			
HNO ₃	1			
HCl	9	ultrasonicación	30	40
HNO ₃	1			
Tween 20	0,3			

*DMSO: dimetil sulfóxido

La funcionalización con carbono fue la seleccionada con el fin de otorgarles la capacidad de dispersión en medios líquidos como el BHI. La funcionalización se obtuvo a partir de una mezcla de tres partes de HCl >99% (ácido clorhídrico, Sigma-Aldrich, CAS: 7647-01-0), una de HNO₃ > 99%, cuatro gotas de *Tween* 20 (Sigma-Aldrich CAS 9005-64-5) en 3,5 mg de NP-TiO₂. La mezcla resultante fue llevada a baño ultrasónico (Elmasonic E 30 H, Alemania) por 30 minutos a 40°C; se realizaron dos lavados con agua destilada y centrifugación a 5000 r.p.m. Luego se adicionó 15 ml de medio BHI y se aplicó ultrasonido a 40 Hz durante cinco minutos. Finalmente, el medio de cultivo con las NP-TiO₂ se almacenó en una cava térmica a 4°C.

Debido a que las NP-TiO₂ poseen la propiedad de fotocatalisis, fue necesaria su activación con luz UVB y con luz blanca. La activación consistió en la exposición de la solución dispersada de NP-TiO₂ a una lámpara de UV (Cole-Parmer Scientific experts, USA) con una longitud de onda de 254 nm por un periodo de activación de 20 minutos, bajo agitación constante. La intensidad fue de 0,2 J con una dosis final de 4 J/cm² la cual fue verificada con el luminómetro (Solarmeter, USA).

Para la evaluación de la actividad antibacteriana de las NP-TiO₂ se usó el método de la macrodilución en la bacteria Gram negativa *Escherichia coli* ATCC 25922. Previo a los ensayos, la bacteria fue cultivada en agar Müeller-Hinton por siembra extendida durante 24 horas a 37°C en un ambiente de aerobiosis. Una vez transcurrido este tiempo, se subcultivó en medio BHI por un tiempo no mayor de 18 horas a 37°C. Se ajustó la concentración del cultivo a un McFarland 0,5 (1,5 x 10⁸ UFC/ml) utilizando un espectrofotómetro (Genesys 20, Thermo Scientific USA) a una longitud de onda de 600 nm con una absorción entre 0,08 – 0,1; posteriormente, se realizó una dilución que permitió obtener dos concentraciones de bacteria: 5 x 10⁴ UFC/ml y 5 x 10³ UFC/ml cada una en 15 ml de medio BHI. Se estableció un límite superior de 300 UFC/ml.

De manera independiente, usando la solución activada de NP-TiO₂ y teniendo en cuenta que la solución diluyente fue el medio BHI, se obtuvieron concentraciones a 115, 58, 29 y 14,5 ug/ml. Consecutivamente, se mezcló 1 ml de la dilución de NP-TiO₂ con 1 ml del cultivo de

bacterias para obtener una concentración final de $2,5 \times 10^4$ UFC/ml y $2,5 \times 10^3$ UFC/ml tanto con las NP-TiO₂ activadas por UVB como con las activadas con luz blanca. Los cultivos se incubaron por 24 horas a 37°C y 60 r.p.m. protegidos de la luz en un incubador-agitador (Rosy 1000, Thermolyne USA).

Los CMI y CMB de las NP-TiO₂ fueron determinados a las 24 horas de incubación de la bacteria con las diferentes concentraciones de nanopartículas. Para esto, de cada dilución de NP-TiO₂ con la bacteria se tomó 10 ul y se transfirió a cajas de agar Müeller-Hinton distribuyéndolo en toda la superficie de la misma. Se incubó por 24 horas a 37°C y se determinó el número UFC/ml. En cada ensayo se realizó un control de esterilidad a las soluciones de NP-TiO₂ y diluyente. El control de viabilidad se estableció con la solución diluyente sin NP-TiO₂ y la dilución del cultivo de bacterias a $2,5 \times 10^4$ y $2,5 \times 10^3$ UFC/ml. La figura 4 representa el proceso de evaluación del efecto antibacteriano de las NP-TiO₂.

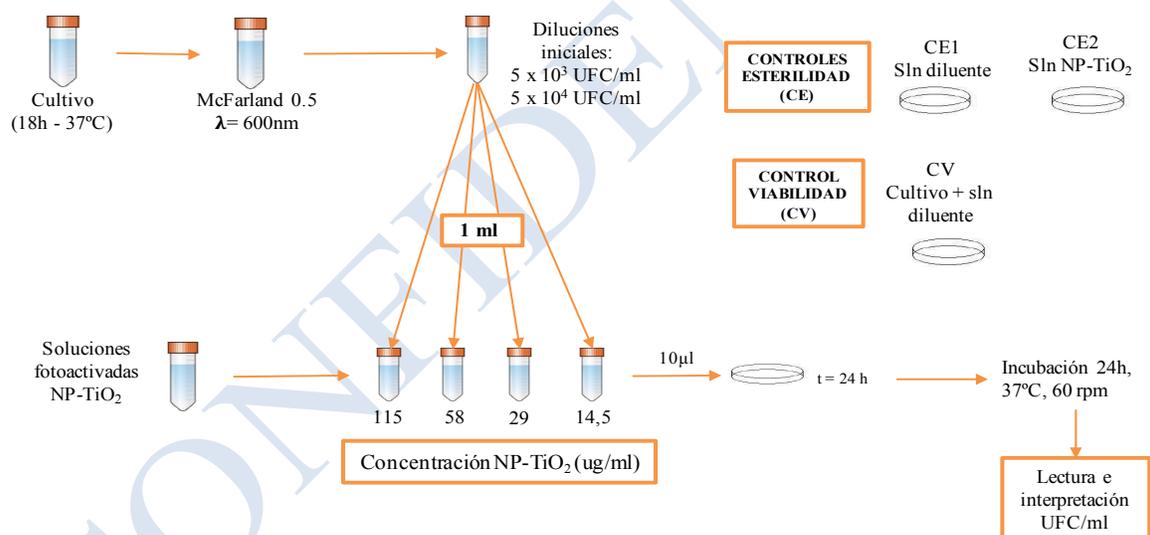


Figura 4. Evaluación del efecto antibacteriano de los lotes de NP-TiO₂.

Análisis estadístico

La actividad antibacteriana de las NP-Ag fue evaluada en tres experimentos independientes con los diferentes lotes de nanopartículas seleccionados y se obtuvo la mediana de UFC/ml para definir la CMI y la CMB. Se presentan gráficamente en figuras las UFC/ml obtenidas para cada concentración de nanopartículas y su evolución en 24 horas.

El análisis antifúngico de las NP-Ag se realizó para tres experimentos independientes a partir de la regresión Probit; este análisis permitió determinar la probabilidad de muerte de las células al ser expuestas a diferentes concentraciones, por lo cual se determinó los valores de LC_{50} y CMF como referente para definir las concentraciones letales y subletales de las NP-Ag sobre los cultivos de *C. albicans*.

Con el fin de verificar la reproducibilidad de los resultados, cada ensayo se realizó en tres momentos independientes por triplicado, con sus respectivos controles positivos y negativos. El análisis estadístico se realizó en el software IBM SPSS StatisticS 24.0.

8.3 Desarrollo de un tejido por la técnica de electrohilado

Se escogió el nylon-6 (Sigma-Aldrich, CAS 25038-54-4) como el material polimérico base para electrohilar un no tejido. Los solventes usados fueron ácido acético $\geq 99,7\%$ (Sigma-Aldrich, CAS 64-19-7) y ácido fórmico $\geq 95\%$ (Sigma-Aldrich, CAS 64-18-6). Se utilizaron diferentes relaciones ácido acético/fórmico para observar cuales afectan la morfología de las fibras nanométrica.

Debido a que las propiedades químicas de las soluciones de electrohilado afectan el desempeño del equipo y en consecuencia la morfología del no tejido, se caracterizaron las soluciones para establecer la conductividad (WTW Cond 3110, Alemania) y tensión superficial (Surface Tensiomat 21 Fisher Scientific, USA). Según los resultados obtenidos, se modificaron las variables del equipo para obtener fibras nanométricas con morfología definida establecida por SEM (JEOL JSM 6490 LV).

Las variables del equipo modificadas fueron el voltaje (kV), la distancia aguja-colector (cm), y el caudal (ml/h). La temperatura ($^{\circ}C$) y humedad (%) correspondieron a las condiciones ambientales al momento de la obtención de la muestra y no fueron manipuladas.

Las muestras de no tejido fueron caracterizadas por SEM (JEOL JSM 6490 LV) en alto vacío con el fin de obtener imágenes en alta resolución. Las muestras se fijaron en una cinta de grafito y se les realizó un recubrimiento delgado en oro (Au) (DENTON VACUUM Desk IV). Se empleó el detector de electrones secundarios para evaluar la morfología y topografía de las muestras; el diámetro de las fibras se analizó a partir del software ImageJ.

8.4 Evaluación antimicrobiana del no tejido

Previo a la evaluación antimicrobiana, el no tejido fue cortado en porciones 5x5 mm aproximadamente. Consecutivamente, las porciones fueron impregnadas con 10 μ l de diferentes soluciones NP-Ag (solución patrón de los lotes NP13, NP22 (replica NP13), NP19 y NP23 (replica NP19) y se dejaron secar por 20 minutos.

Las propiedades antimicrobianas del no tejido obtenido fueron evaluadas a partir de la técnica Kirby-Bauer con la bacteria Gram negativa *Escherichia coli* ATCC 25922.

La bacteria fue cultivada según lo descrito previamente en el apartado 7.2.1 en el que se describe la metodología de evaluación antimicrobiana de las NP-Ag. Luego, con un hisopo estéril (Citotest, REF 2122-0002) se realizó una siembra homogénea sobre la superficie del medio de cultivo Müller-Hinton en cajas de Petri y con la ayuda de pinzas estériles, se colocaron cuatro porciones del no tejido impregnado sobre el medio de cultivo, procurando su distribución equidistante. Se llevó a incubar las cajas a 37°C y se retiraron las porciones a las 2, 4, 8, 24 y hasta las 48 horas para así determinar la propiedad antimicrobiana al contacto por la inhibición en la formación de UFC/ml. Para la interpretación, el hallazgo de solo una UFC indicó crecimiento bacteriano, por lo tanto, no actividad antimicrobiana.

Se usaron tres controles en la evaluación de la actividad antibacteriana de las NPs. Un control positivo para verificar la sensibilidad de la bacteria a un antibiótico estándar a través de un sensidisco de ciprofloxacina (BD, REF 231657), el halo de inhibición se comparó con la norma CLSI M100 (108) la cual estipula que un halo ≥ 21 mm representa sensibilidad antimicrobiana, entre 16-20 mm indica sensibilidad intermedia y ≤ 15 mm indica resistencia antimicrobiana. Un segundo control representado en una muestra de no tejido sin adiciones de NPs para descartar que la composición química del no tejido tuviera un efecto antimicrobiano. Y un tercer control de crecimiento de la bacteria en el cultivo McFarland 0,5 para verificar la viabilidad de la bacteria. Finalmente, con el fin de verificar la reproducibilidad de los resultados, cada ensayo se realizó en tres momentos independientes.

9. RESULTADOS

Se presentan los resultados acordes a cada objetivo específico propuesto.

9.1 Desarrollo de una metodología de síntesis química de nanopartículas metálicas y/o óxido metálicas y su caracterización.

9.1.1 Nanopartículas de plata (NP-Ag)

El proceso de síntesis de NP-Ag inicialmente se basó en la metodología de reducción química con agua Milli Q® como solvente con el método de Brown *et al.* (1).

La síntesis del lote NP02 se hizo siguiendo esta metodología y se obtuvo un diámetro promedio de 132,1 nm, una concentración de 14,67 µg/ml y un color de solución dorado claro indicando la presencia de NP-Ag. En contraste, lo reportado por el autor en su estudio las NPs tuvieron un diámetro promedio 5 nm y una concentración de 20 µg/ml (1). Tabla 3. Figura 5.

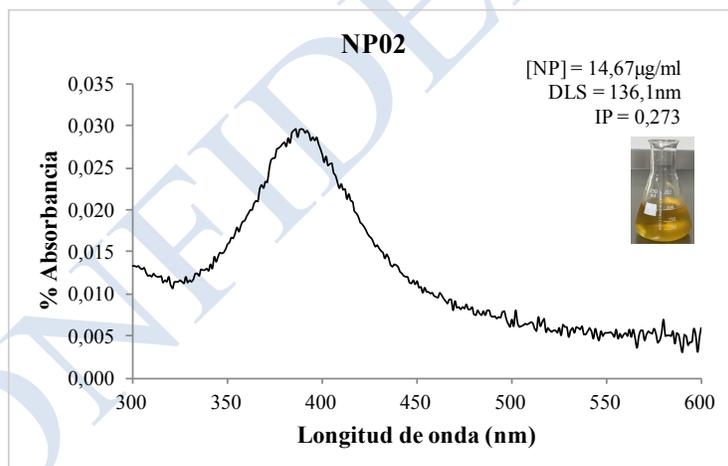


Figura 5. Espectro UV del lote NP02 de NP-Ag y propiedades químicas reproduciendo la metodología de síntesis de Brown *et al.* (1).

La inconsistencia observada con la aplicación del método de Brown *et al.* (1) condujo a modificar la ruta de síntesis para aumentar la concentración y disminuir el tamaño de las NP-Ag. Se introdujo en el proceso un aumento de la concentración inicial de todos los reactivos desde 0,01 M a 0,05 M y un ajuste del pH antes o después de la síntesis de la NP-Ag:

- pH 3 con una solución de HNO₃ al 5% (ácido nítrico – Sigma-Aldrich CAS 7697-37-2) después de la síntesis.
- pH 10 con una solución de NH₃ al 5% (amoníaco – Sigma-Aldrich CAS 7664-41-7) después de la síntesis.
- pH 11 con una solución de 1,25 M de NaOH (hidróxido de sodio, PANREAC CAS 1310-73-2), antes o después de la síntesis (109).

Se sintetizaron adicionalmente 22 lotes de NP-Ag con las modificaciones en la síntesis química, para un total de 23 lotes. Se seleccionaron 11 para las caracterizaciones físico-químicas de tamaño, morfología y concentración debido a que no tuvieron alteraciones en su aspecto al tener cambios de color de la solución, cristalización, sedimentación o congelamiento. Tabla 3.

Tabla 3. Características físico-químicas de NP-Ag sintetizadas con el método de reducción química.

Descripción	Lote	Concentración (M) *	pH inicial	pH final	Temperatura (°C)	Lectura UV			DLS	
						λ	% absorbancia	AAS (μg/ml)	Diámetro (nm)	IP
Protocolo Brown et al. (1) Protocolo modificado Aumento de concentración de reactivos y ajuste de pH con NaOH después de la síntesis	NP02	0,01	8,5	8,5	10,5	386	0,0297	14,67	132,1	0,273
No	NP04a	0,05	7,26	7,26	9,6	395	0,367	141,7	32,41	0,537
Si	NP04b	0,05	7,35	11,16	10,7	388	0,31	130,2	18,88	0,652
pH ajustado con NaOH respecto a la síntesis										
Después	NP11	0,05	6,35	11,02	10,8	387,5	0,175	85,11	15,6	0,578
Antes	NP12	0,05	ND	9,54	10,7	386,5	0,174	82,07	63,74	0,344
Después	NP13	0,05	6,52	11,09	10,1	390	0,212	112,59	15,49	0,58
Antes	NP14	0,05	11,05	8,39	10,3	387	0,208	108,9	27,07	0,506
Compuestos químicos de ajuste después de la síntesis										
NH ₃	NP19	0,05	6,55	10,34	10	386	0,202	125,9	19,75	0,588
NH ₃ réplica de NP19	NP23	0,05	6,7	10,1	10,9	392	0,121	125,9	30,14	0,106
HNO ₃	NP20	0,05	6,03	3,03	10,5	391	0,206	129,3	43,07	0,504
NaOH réplica de NP13	NP22	0,05	6,73	11,08	10,6	392	0,175	131,6	16,01	0,567

*Concentraciones corresponden a los reactivos usados para la síntesis de NP-Ag: AgNO_3 , $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$, NaBH_4 todos a la misma molaridad. ND: no disponible.

Los lotes NP04a y NP04b se sintetizaron aplicando las modificaciones al método de Brown *et al.* (1) aumentando la concentración y modificando el pH. Se obtuvo un menor diámetro promedio de las NP-Ag cuando se ajustó el pH 11 con NaOH 1,25 M respecto a la no modificación del pH, 18,88 y 32,41 nm respectivamente. Se observó una mayor concentración de NP-Ag cuando se aumentó la concentración de los reactivos tal como se evidenció en el cambio de color de la solución. Tabla 3, Figura 6. Adicionalmente, la morfología de las NP-Ag de ambos lotes tuvo una forma esférica según lo analizado a partir de TEM. Figura 7.

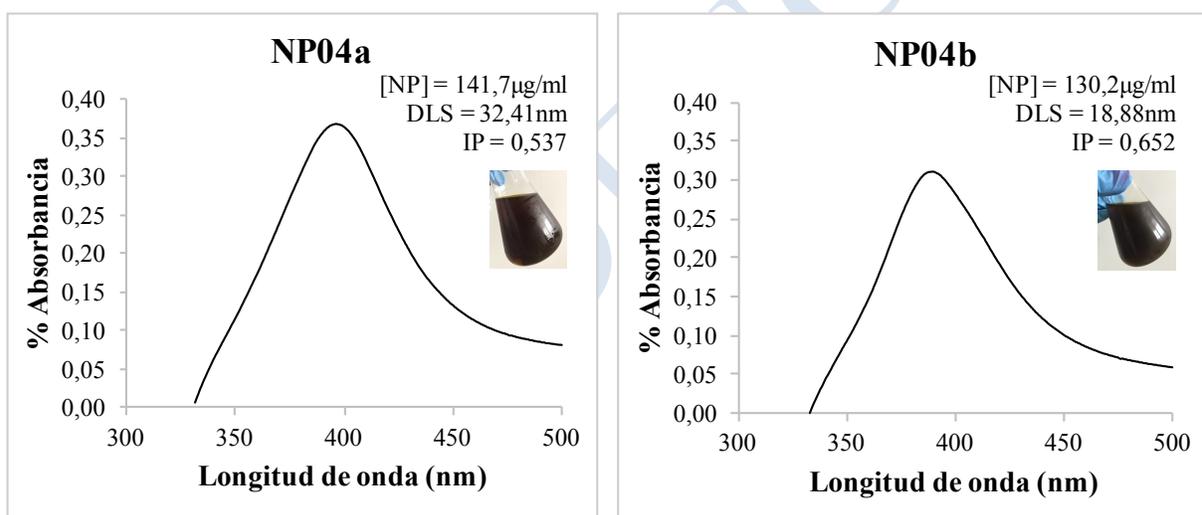


Figura 6. Espectro UV y propiedades fisico-químicas de los lotes NP04a y NP04b de NP-Ag sintetizados con el método de Brown *et al.* (1) modificado.

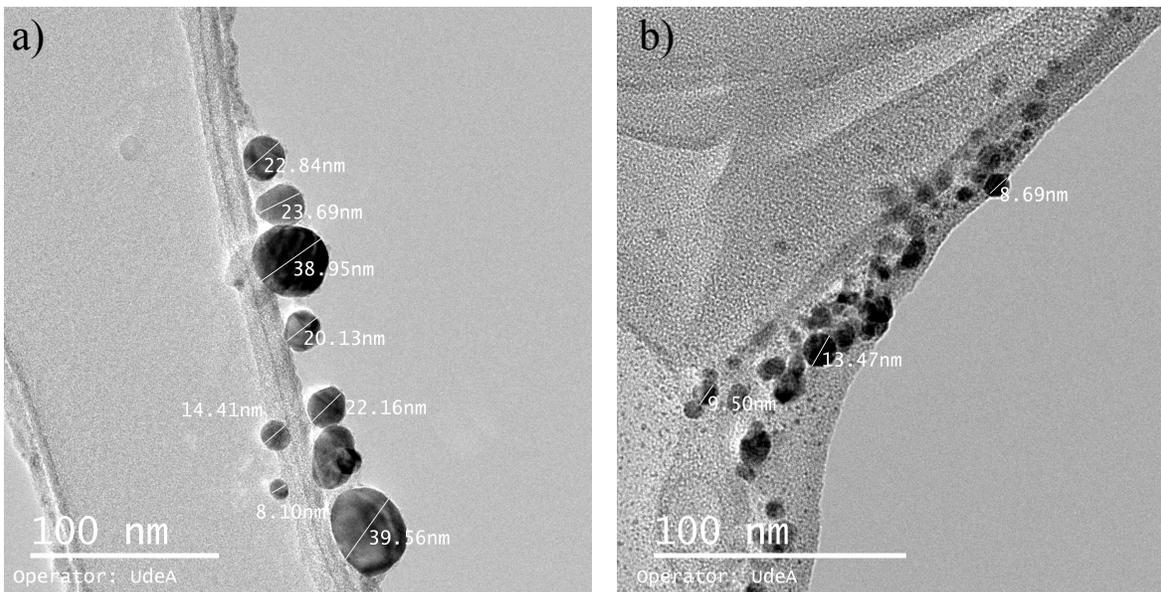


Figura 7. Análisis morfológico de las NP-Ag sintetizadas con el método de Brown *et al.* (1) modificado. a) NP04a sin ajuste del pH y b) NP04b con ajuste a pH 11 usando NaOH 1.25 M. Microscopía Electrónica de Transmisión.

Se comparó el tamaño promedio acorde al momento del ajuste del pH 11 con NaOH 1,25 M, antes o después de la síntesis de las NPs. Los lotes obtenidos con pH ajustado después de la síntesis, NP11 y NP13, tuvieron menor tamaño promedio de las NPs, mayor concentración y un color de solución más oscuro que aquellos lotes sintetizados con pH ajustado en la solución diluyente antes de la síntesis, NP12 y NP14. Con la finalidad de reproducir el proceso de síntesis del lote de NP-Ag que expresó las mejores características físico-químicas con el método de Brown *et al.* (1) modificado, correspondiente a NP13, se sintetizó NP22 (replica NP13). Tabla 3, Figura 8.

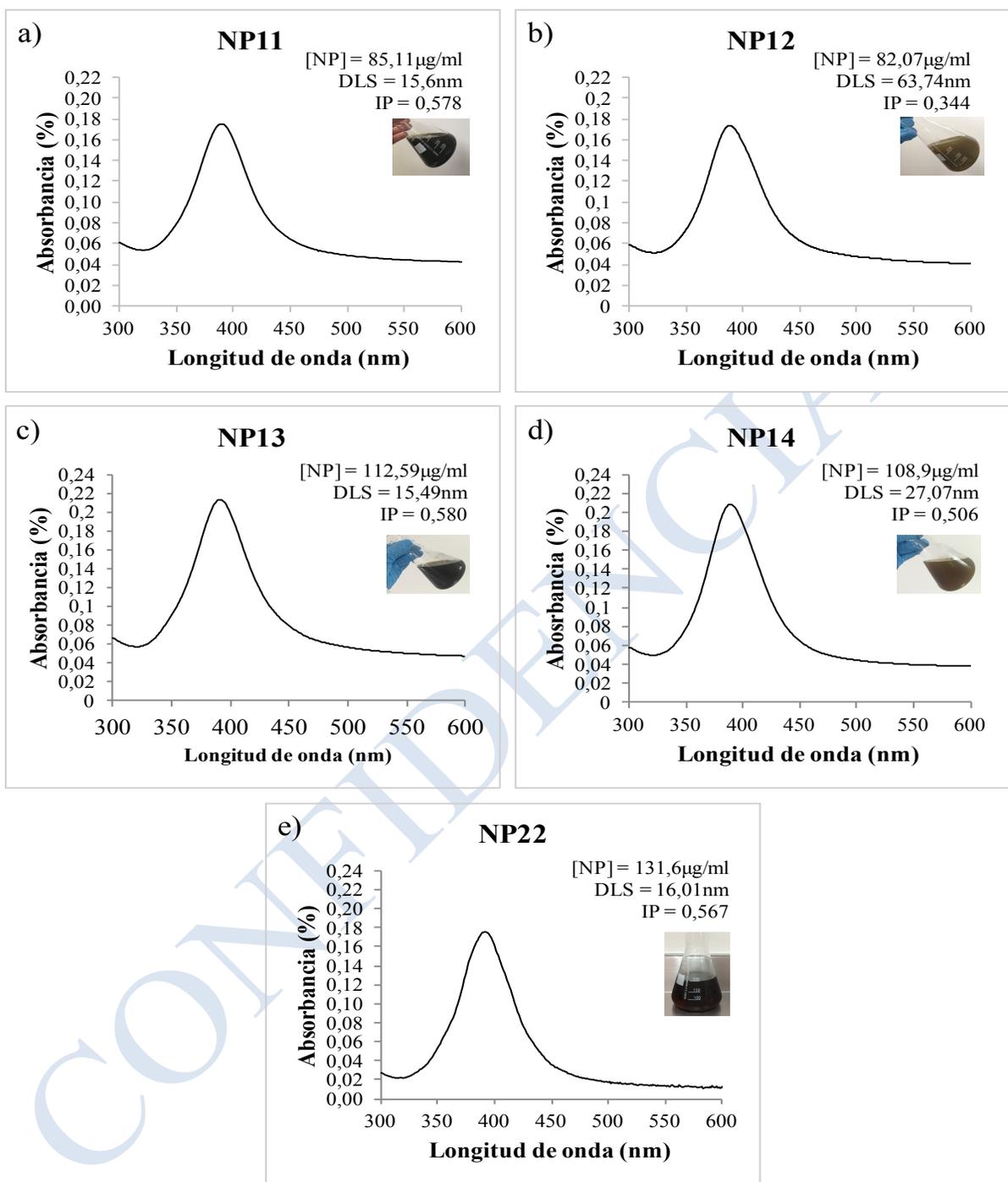


Figura 8. Espectro UV-vis y propiedades físico-químicas de NP-Ag sintetizados con el método de Brown *et al.* (1) modificado, lotes: a) NP11; b) NP12; c) NP13; d) NP14; e) NP22.

Debido a que las propiedades antimicrobianas de las NP-Ag se relacionan con el diámetro, se exploraron otros ajustes de pH después de la síntesis de NP-Ag para evaluar si se lograba una mayor reducción del tamaño promedio.

La síntesis del lote NP19 se realizó con pH 10 ajustado con NH_3 después de la síntesis y se observó un diámetro promedio mayor que el mejor obtenido en los lotes evaluados, NP13. Se reprodujo la síntesis con las mismas características de ajuste anteriores y se observó una diferencia aún mayor en el diámetro promedio, NP23 (replica NP19), sin modificación del color de la solución. Tabla 3, Figura 9.

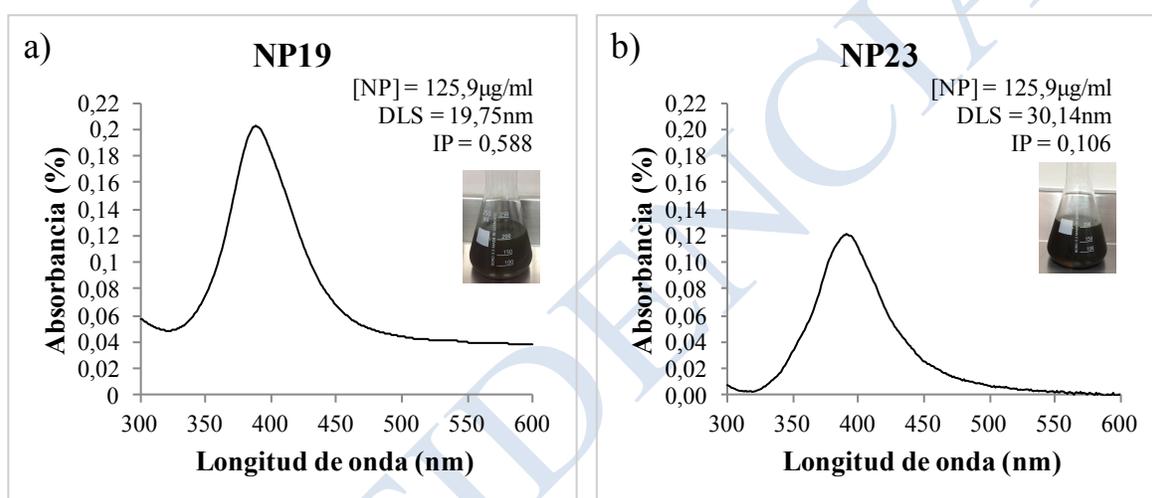


Figura 9. Espectro UV-vis y propiedades físico-químicas de NP-Ag sintetizados con el método de Brown *et al.* (1) modificado, lotes: a) NP19; b) NP23 (*replica NP19*).

Otra síntesis adicional para evaluar el efecto del pH en el tamaño, se aplicó con pH 3 ajustado con HNO_3 correspondiente a NP20 y se evidenció un mayor diámetro promedio de las NP-Ag. Tabla 3, Figura 10.

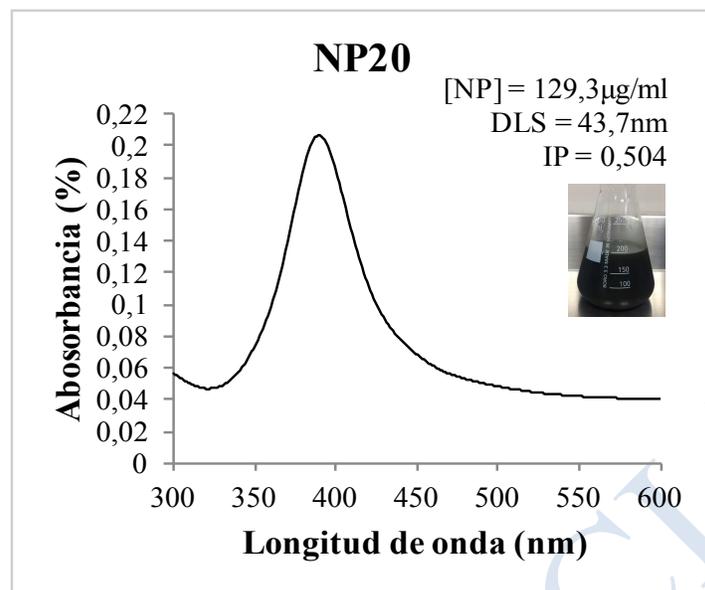


Figura 10. Espectro UV-vis y propiedades físico-químicas de NP-Ag sintetizados con el método de Brown *et al.* (1) modificado, lote NP20.

Según los espectros de absorción UV-vis obtenidos para todos los lotes sintetizados en este trabajo (Figuras 6,7,9-11) se encontró una resonancia de plasmón de superficie (RPS) en el rango de 380-400 nm, lo cual indicó la presencia de NP-Ag esféricas y cuasi-esféricas, las imágenes de TEM confirmaron estos hallazgos.

Los resultados obtenidos permitieron desarrollar una nueva ruta de metodología de síntesis química de NP-Ag a partir de la modificación del método de Brown *et al.* (1) que incluye una mayor concentración de los reactivos a 0,05 M y el ajuste del pH 11 con NaOH después de la síntesis. Figura 11.

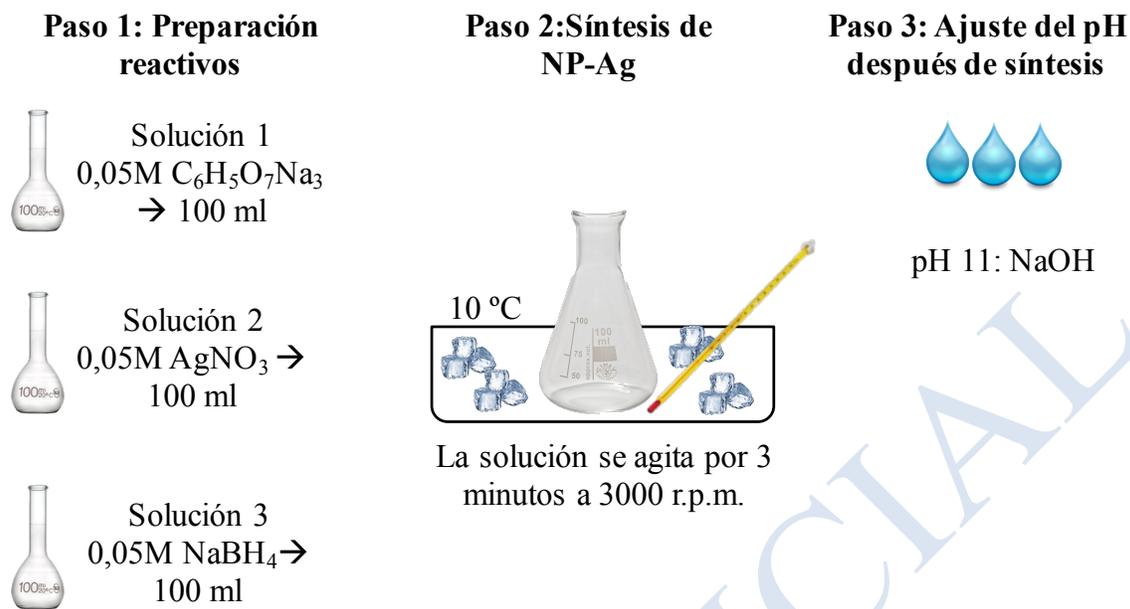


Figura 11. Desarrollo de una metodología de síntesis química de las nanopartículas de plata según el método de Brown *et al.* (1) modificado.

9.1.2 Nanopartículas de dióxido de titanio (NP-TiO₂)

Se sintetizaron 14 lotes de NP-TiO₂ a partir de diferentes rutas del método sol-gel. Las cinco rutas finales que obtuvieron diámetros nanométricos se listan en la tabla 4.

Tabla 4. Rutas de síntesis de NP-TiO₂ con sus respectivos diámetros.

Ruta	Diámetro (nm)
1	120
2	90
3	100
4	50
5	20

Según estos resultados, la ruta de síntesis con mejores diámetros fue la número cinco. La figura 12 ilustra el proceso de síntesis final para las NP-TiO₂.

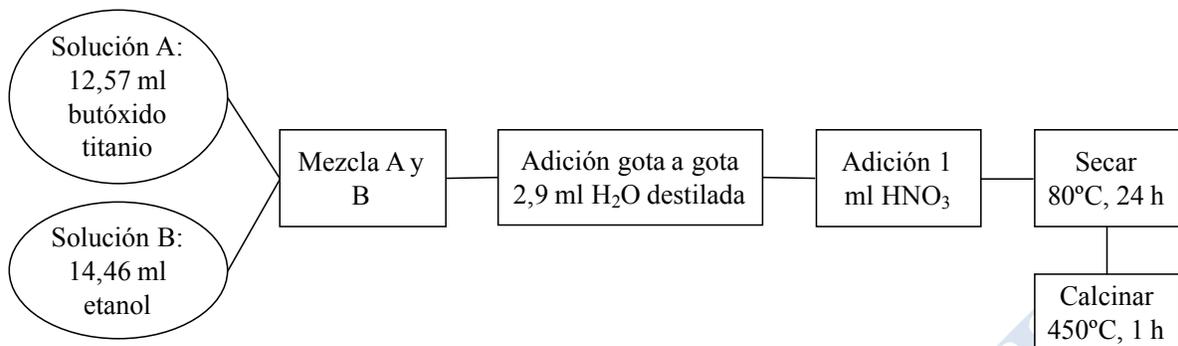


Figura 12. Esquema de síntesis de NP-TiO₂ por el método de sol-gel.

Con esta ruta se observó una morfología esférica y cuasi-esférica en ambos lotes y no se observaron impurezas como se evidencia en el componente de oxígeno y titanio en EDX. Figura 13. Según el patrón observado en DRX, las NP-TiO₂ con picos a $2\theta = 25,25$ y 48° en el espectro se encuentran en fase cristalina anatasa, sin embargo, también se observa la presencia de la fase cristalina rutilo. Figura 14.

La estimación promedio del tamaño cristalino (diámetro) L fue 20 nm.

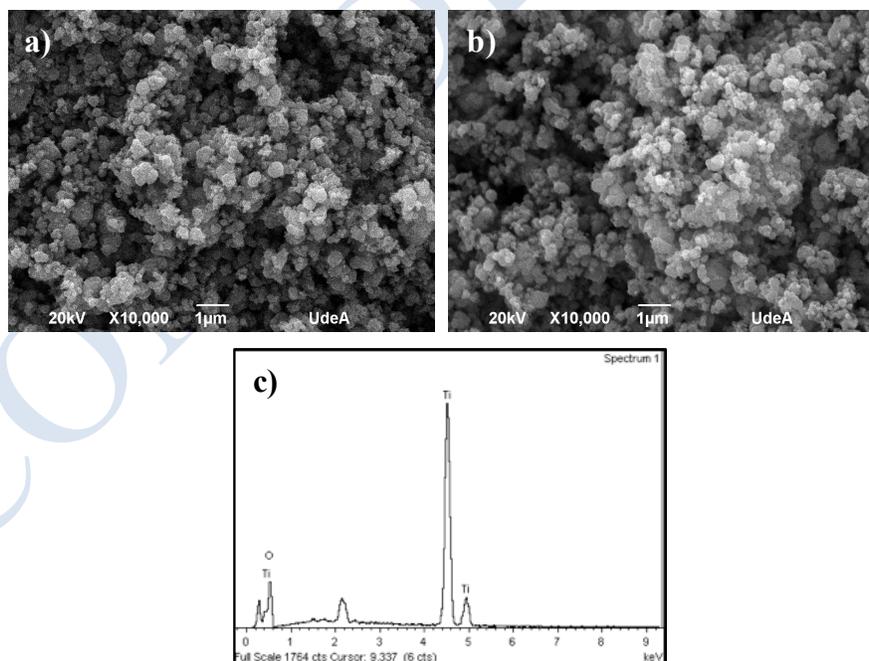


Figura 13. Morfología y composición química obtenida para las NP-TiO₂ sintetizadas con métodos químicos evaluadas en SEM y EDX.

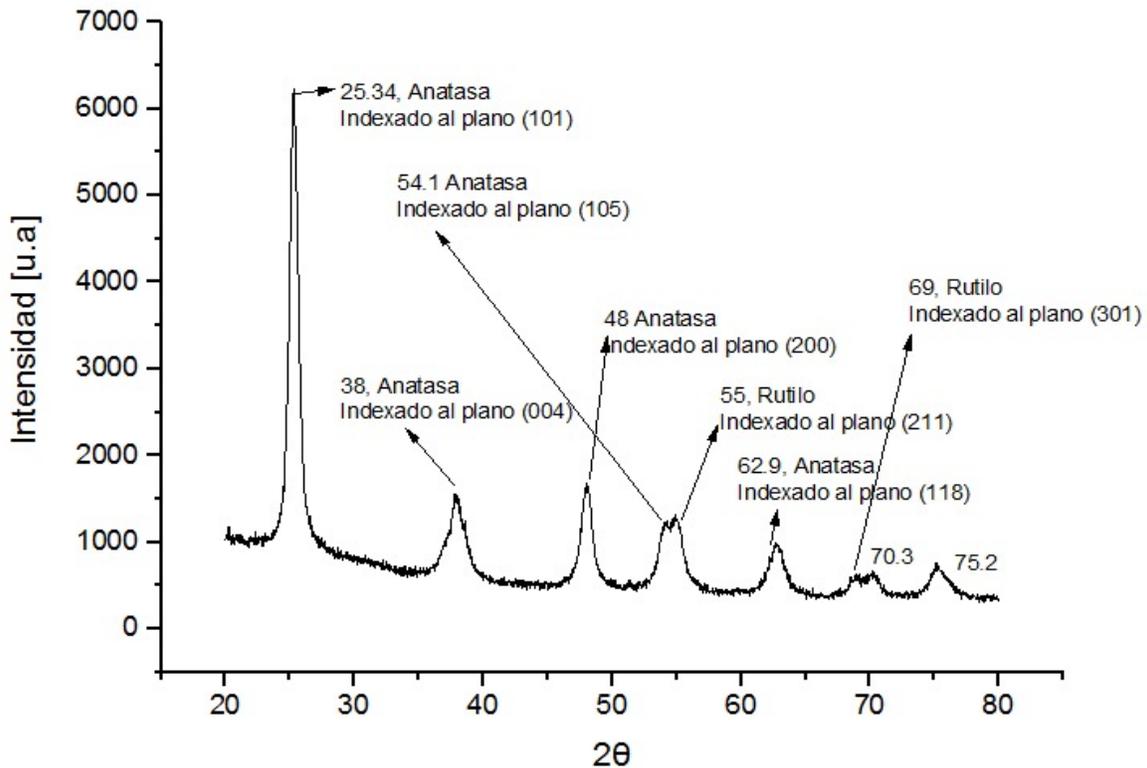


Figura 14. Patrones observados en NP-TiO₂ sintetizadas con el método de sol-gel y evaluadas en DRX.

9.2 Evaluación del efecto antimicrobiano de las nanopartículas

9.2.1 Nanopartículas de plata

Se realizaron 40 experimentos para evaluación del efecto antimicrobiano, antibacteriano y antifúngico, en los cinco lotes de NP-Ag con las mejores propiedades morfológicas, diámetro (<20 nm) y sin aglomeración, NP13, NP22 (*réplica de NP13*), NP19, NP23 (*réplica de NP19*) y NP20.

Se observó en todas las bacterias evaluadas la misma CMI y CMB a las 24 horas de incubación en los lotes NP13 y su réplica NP22. Sin embargo, para NP19 y su réplica NP23 la CMI y CMB varió según la bacteria evaluada; para *E. coli* AmpC y *P. aeruginosa* ATCC 27823 NP23 (*réplica de NP19*) se observó un mayor efecto antibacteriano. Finalmente, NP20 reflejó un efecto antibacteriano menor. En ningún lote de NP-Ag se observó un efecto

bactericida o bacteriostático contra *S. aureus* ATCC 25923; la viabilidad se mantuvo siempre por encima del límite establecido en todas las concentraciones evaluadas, demostrando ningún efecto antimicrobiano de la NP frente a este microorganismo. Tabla 5

Tabla 5. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) de la actividad antibacteriana a las 24 horas de incubación de NP-Ag.

Lote	Tamaño (nm)	Morfología	pH	Bacteria	CMI (ug/ml)	CMB (ug/ml)
NP13	15	Esférica	NaOH - 11	<i>E. coli</i> ATCC 25922	5	10
				<i>E. coli AmpC</i>	< 5	5
				<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27823	10	20
				<i>S. aureus</i> ATCC 25923	> 65	> 65
NP22 réplica de NP13	16	ND	NaOH - 11	<i>E. coli</i> ATCC 25922	5	10
				<i>E. coli AmpC</i>	< 5	5
				<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27823	10	20
				<i>S. aureus</i> ATCC 25923	> 65	> 65
NP19	19	ND	NH ₃ - 10	<i>E. coli</i> ATCC 25922	10	20
				<i>E. coli AmpC</i>	10	20
				<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27823	20	40
				<i>S. aureus</i> ATCC 25923	> 65	> 65
NP23 réplica de NP19	20	ND	NH ₃ - 10	<i>E. coli</i> ATCC 25922	10	20
				<i>E. coli AmpC</i>	< 5	5
				<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27823	10	20
				<i>S. aureus</i> ATCC 25923	> 65	> 65
NP20	43	ND	HNO ₃ - 3	<i>E. coli</i> ATCC 25922	40	65
				<i>E. coli AmpC</i>	40	65
				<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27823	40	65
				<i>S. aureus</i> ATCC 25923	> 65	> 65

*ND: No disponible.

En la Figura 15 se observa que el comportamiento del efecto contra tres tipos de bacterias Gram negativas contra *E. coli* ATCC 25922, *E. coli AmpC* y *P. aeruginosa* ATCC 27823 durante 24 horas es similar entre los lotes NP13 y su réplica NP22.

Por el contrario, el análisis gráfico del comportamiento antibacteriano de lotes de NP19 y su réplica NP23 contra *E. coli AmpC* y *P. aeruginosa* ATCC 27823 no es similar desde las ocho horas de incubación. Para ambas bacterias la réplica NP23 tuvo mayor efecto antibacteriano. Figura 16.

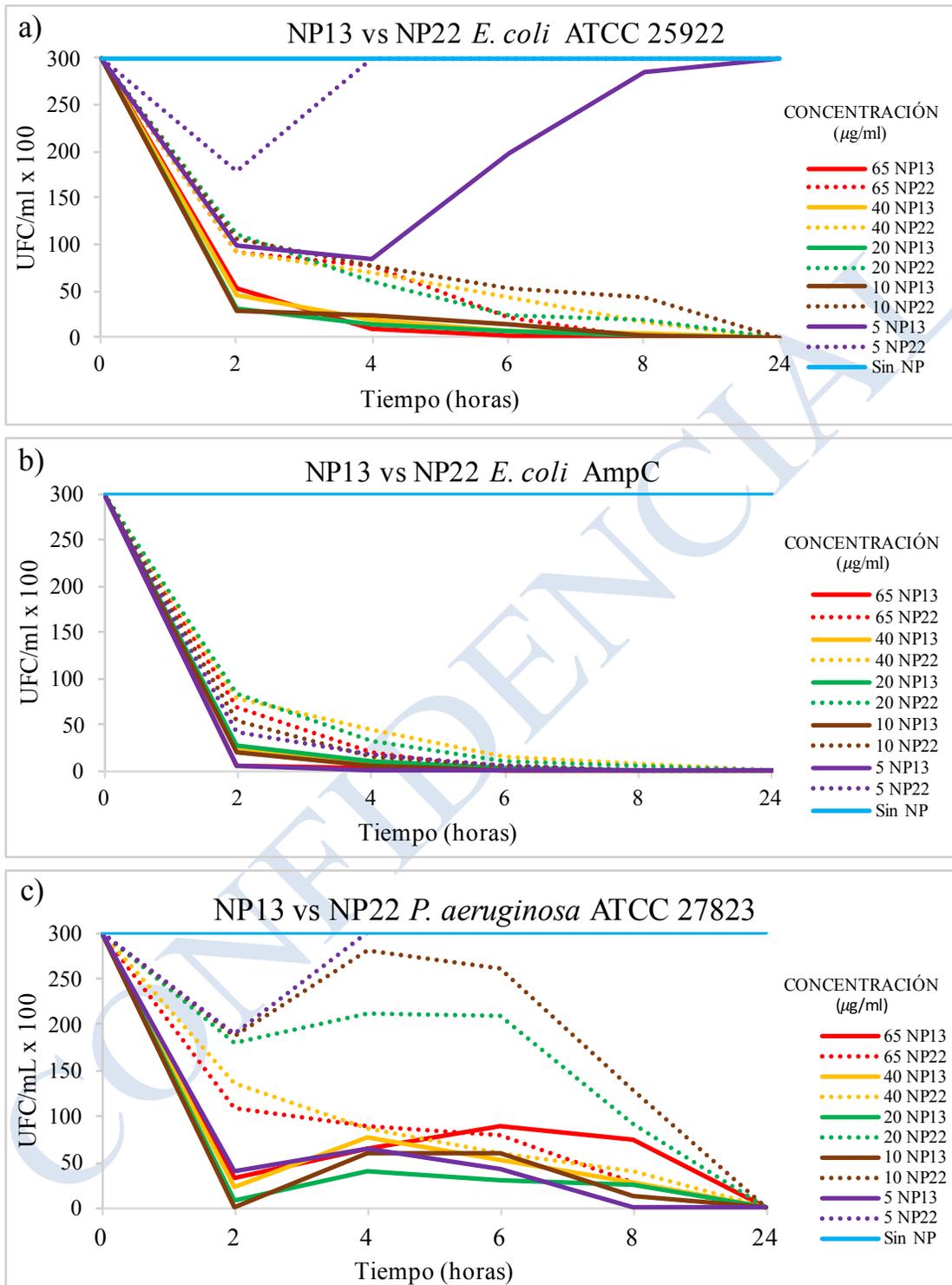


Figura 15. Evaluación antibacteriana a través del tiempo de los lotes NP13 y NP22 (réplica NP13) contra *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* AmpC y *P. aeruginosa*.

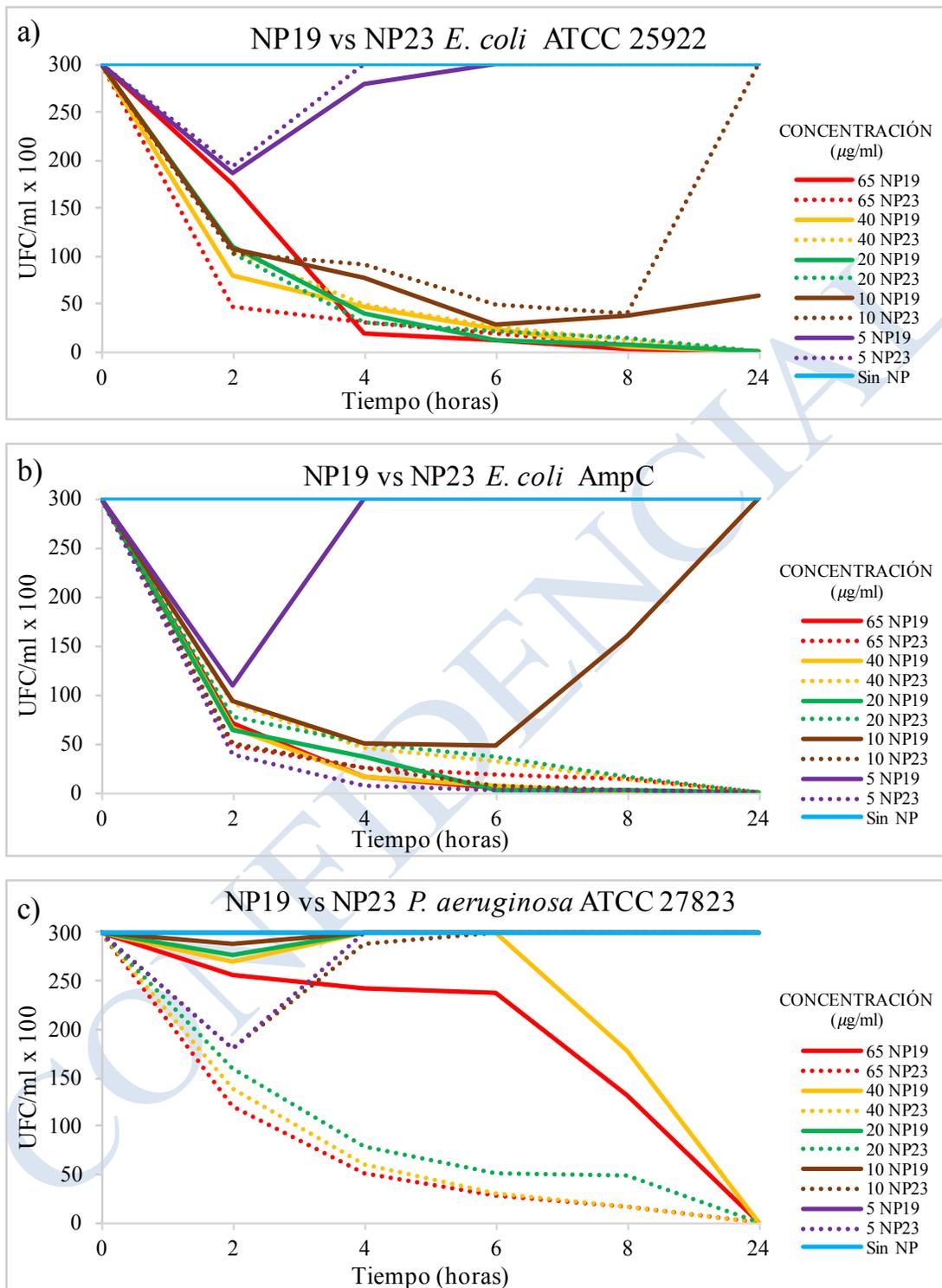


Figura 16. Evaluación antibacteriana a través del tiempo de los lotes NP19 y NP23 (réplica NP19) contra *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* AmpC y *P. aeruginosa*.

Se evaluó la actividad antifúngica de los lotes de NP-Ag con propiedades antibacterianas correspondiente a NP13, NP19 y sus respectivas réplicas.

Se observó que NP13 y su réplica obtuvieron idéntico efecto antifúngico. El efecto fungistático de 0,13 ug/ml y fungicida de 2,4 ug/ml para los lotes NP13 y su réplica, NP22 usando concentraciones de NP desde 8 – 0,25 ug/ml fue menor al comparar con el control de fluconazol, el cual constaba de una concentración a 10 ug/ml.

Las concentraciones de NP23 para las que se obtuvo el LC₅₀ y CMF indican que tienen un efecto antifúngico menor que se evidencia con la necesidad de mayor concentración de NP-Ag para lograr un efecto antifúngico (Tabla 6).

Tabla 6. Evaluación del efecto antifúngico de NP-Ag.

Lote NP-Ag	LC ₅₀ (ug/ml)	CMF (ug/ml)
NP13	0,13	2,4
NP22 (<i>réplica NP13</i>)	0,13	2,4
NP19	No se pudo obtener	No se pudo obtener
NP23 (<i>réplica NP19</i>)	0,49	3,1

LC₅₀: concentración letal al 50%. CMF: concentración mínima fungicida.

9.2.2 Nanopartículas de dióxido de titanio

Las NP-TiO₂ fueron dispersadas usando la técnica descrita en el apartado 8.2.2. Inicialmente, la cantidad de NP-TiO₂ fue de 7,5 mg, sin embargo, la cantidad fue disminuida a 3,8 mg. La evaluación antibacteriana se realizó contra *E. coli* ATCC 25922 a las 24 horas de exposición a la NP. En tres evaluaciones realizadas se observó crecimiento de la bacteria por encima de los límites superiores (300 UFC/mL) mostrando que no hubo ningún efecto bacteriostático ni bactericida para *E. coli* ATCC 25992. No se evaluó el efecto antifúngico de los lotes de NP-TiO₂.

9.3 Desarrollo de un no tejido por la técnica de electrohilado

Se prepararon cuatro soluciones con diferente relación ácido acético/fórmico a partir de las cuales se modificaron las variables del equipo y se obtuvieron cuatro muestras iniciales de Nylon-6 no tejido. Tabla 7.

Tabla 7. Propiedades físico-químicas de las soluciones preparadas para electrohilar Nylon-6 no tejido.

Solución	Relación ácido acético/fórmico	Conductividad uS/cm	Temperatura (°C)	Tensión superficial (dinas/cm)
1	1:4	2070,0	21,8	38,9
2	2:3	989,0	22,4	36,6
3	3:2	319,7	22,4	35,5
4	1:1	570,7	22,0	36,2

El análisis morfológico de las cuatro muestras iniciales en el SEM evidenció que la morfología es distinta según los parámetros utilizados para electrohilar. En la muestra 1 se obtuvo formación de gotas y rompimiento de las fibras; la muestra 2 presentó fibras contorneadas, sin gotas, y mojadas; la muestra 3 adquirió fibras contorneadas, sin embargo, también se obtuvieron gotas y redes tipo araña; finalmente, la muestra 4 tuvo una atracción de las fibras entre sí, además de rompimiento de las mismas y diámetros relativamente uniformes. Tabla 8. Figura 17.

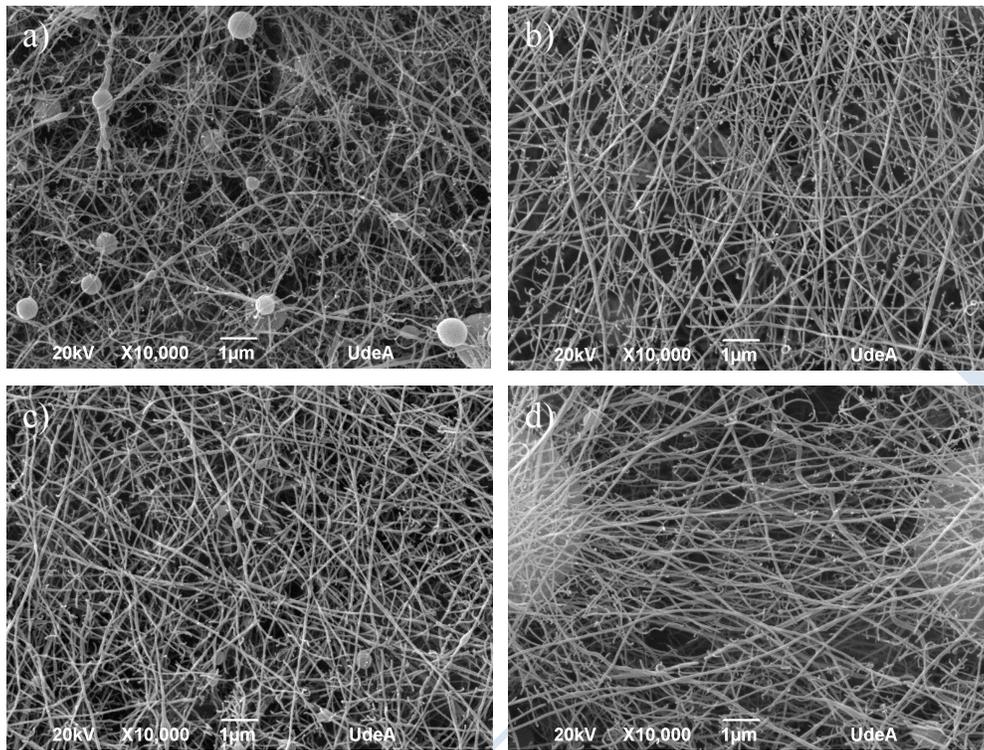


Figura 17. Imágenes de SEM obtenidas a partir de muestras de electrohilado de Nylon-6 no tejido. a) Muestra 1; b) Muestra 2; c) Muestra 3; d) Muestra 4.

Entre las muestras iniciales, la número 2 obtuvo las mejores propiedades morfológicas, fibras contorneadas, sin gotas, y mojadas, sin embargo, a la observación macroscópica, el no tejido tuvo bajo espesor. Para lograr incrementarlo se modificaron algunas variables del equipo y se obtuvieron dos muestras adicionales a partir de las características de la muestra 2: aumento del voltaje y extensión del tiempo de electrohilado (muestra 5), aumento del voltaje y con capas superpuestas (muestra 6). Tabla 8.

Tabla 8. Condiciones de electrohilado para obtención de Nylon-6 no tejido.

Variables del equipo	Muestra de Nylon-6 no tejido					
	1	2	3	4	5	6
Relación ácido acético/fórmico	1:4	2:3	3:2	1:1	2:3	2:3
Nylon-6 (%)	10	10	10	10	10	10
Voltaje equipo (kV)	16	16	18	17	18	18
Distancia aguja-colector (cm)	12	12	12	12	10	10
Caudal (ml/h)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Temperatura ambiente (°C)	21,2	24,9	23	22,4	25	26,2
Humedad ambiente (%)	77,9	60,6	68,3	67,1	60	57
Tiempo de electrohilado (horas)	4	4	4	4	12	4
Número de capas	1	1	1	1	1	2

La muestra 5 cuyo tiempo de electrohilado fue de 12 horas formó macroscópicamente una esponja, mientras que la muestra 6 formó una red con un espesor mayor. Figura 18.

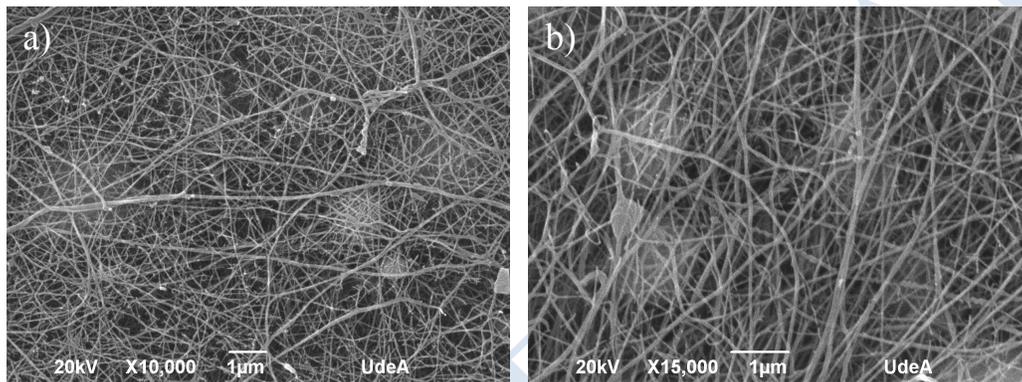


Figura 18. Imágenes de SEM obtenidas a partir de muestras de electrohilado. a) Muestra 5; b) Muestra 6.

El análisis del diámetro promedio de fibras a partir del software *ImageJ* arrojó un diámetro de 350 nm.

9.4 Evaluación antimicrobiana del no tejido nanoreforzado sintetizado

Las porciones de 5x5 mm del no tejido impregnados con las NP-Ag mostraron propiedades antibacterianas durante las 24 horas. A las 24 horas no hubo crecimiento del microorganismo en NP13 y NP23 y su réplica.

El control del no tejido sin NPs y el de crecimiento bacteriano evidenció que el no tejido carecen de propiedades antimicrobianas por sí solo, mientras que el control con sensidisco de antibiótico de ciprofloxacina, se obtuvo un halo de inhibición superior a 37 mm en todos los ensayos, indicando sensibilidad adecuada de la bacteria. Tabla 9.

Tabla 9. Crecimiento bacteriano de *E. coli* ATCC 25922 en el no tejido impregnado con NP-Ag hasta las 24 horas.

Lote NP-Ag	Tiempo (Horas)			
	2	4	8	24
NP13	Si	Si	Si	No
NP22 (<i>réplica NP13</i>)	Si	Si	Si	No
NP19	Si	Si	Si	No
NP23 (<i>réplica NP19</i>)	Si	Si	Si	No
Control del no tejido	Si	Si	Si	Si
Control con sensidisco de ciprofloxacina	No	No	No	No
Control de crecimiento bacteriano	Si	Si	Si	Si

CONFIDENCIAL

10. DISCUSIÓN

Después de realizar la revisión bibliográfica se encontró que los mejores resultados antimicrobianos se obtenían a partir de la metodología de Brown *et al.* (1), sin embargo, al reproducir la metodología descrita para la síntesis de NP-Ag no se lograron obtener los mismos resultados publicados por el autor, por esta razón se modificó la ruta de síntesis para las NP-Ag y así encontrar las propiedades físico-químicas adecuadas para alcanzar las propiedades antimicrobianas.

El espectro de absorción óptico de las nanopartículas metálicas está dominado por las RPS, las cuales con una longitud de onda más larga indican un incremento del diámetro de partícula (110). La posición y el tamaño de los clústeres de NP-Ag dependen del tamaño de partícula, medio dieléctrico y especies de superficie absorbidas (111)(112). El espectro de absorción de las nanopartículas metálicas está definido por una sola banda de RPS mientras que las NPs anisotrópicas pueden llegar inclusive hasta las tres bandas (113). Los lotes sintetizados en este trabajo, tuvieron una sola banda RPS en un rango de 380 – 410 nm indicando la presencia de NP-Ag esféricas.

El citrato de sodio se usó como estabilizador del crecimiento de los clústeres de las NP-Ag para evitar la aglomeración, la cual se debe a una alta superficie de energía e inestabilidad termodinámica en la superficie de las partículas. Este estabilizador ayuda a evitar reacciones excesivas entre los químicos, así como disminuir la tensión superficial en la suspensión, lo cual hace más fácil dispersar las partículas en el medio de cultivo, favoreciendo así el efecto antimicrobiano que se establece en ellas (109). El citrato de sodio por si, no tiene efecto antimicrobiano en las condiciones analizadas, como tampoco exalta el crecimiento de las bacterias; esto se comprobó mediante los controles realizados, pero si permitió estabilizar el efecto antimicrobiano de las NP-Ag.

La formación de la solución y la estabilidad de la distribución de los clústeres de NP-Ag incrementan con un rango alcalino de pH. Esto se debe a la carga de los clústeres, la cual maximiza las interacciones repulsivas electroestáticas/electroestéricas. A un pH elevado, se forman NPs esféricas y monodispersas, así como también se incrementa la cantidad de NP-

Ag (109). Esto concuerda con los resultados obtenidos en este estudio, en el cual a un pH alcalino se obtuvieron menores diámetros de NP-Ag y mayores concentraciones en la solución, lo que favorece la eficiencia en el método de síntesis. Tabla 2.

Ajitha *et al.* (109) y Qin *et al.* (114) sintetizaron NP-Ag por distintas rutas químicas con análisis de pH y llegaron a la conclusión de que a un pH mayor, el diámetro promedio de partícula disminuía, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo. En nuestro caso, el pH 11 fue apropiado para las soluciones que demostraron las mejores características físico-químicas.

El tamaño, la morfología y el contexto en el cual se sintetizan nanopartículas influyen directamente en la capacidad que poseen de inhibir y eliminar microorganismos. El tamaño de las nanopartículas metálicas asegura que una superficie significativamente mayor de las partículas este en contacto con un efluente microbiano. Considerando el caso de partículas esféricas con un tamaño uniforme, una reducción en tamaño de estas partículas de $\approx 10 \mu\text{m}$ a 10 nm incrementaría el área de superficie de contacto por 10^9 . Este incremento de la superficie de área de contacto incrementa la posibilidad de muerte microbiana.

La capacidad antimicrobiana de determinado agente se mide con los parámetros de CMI y CMB. Se han reportado una variedad de dichos valores, dependiendo de diámetro, morfología e inclusive recubrimientos de las NPs. Los valores de CMB obtenidos en este trabajo para las bacterias Gram negativas fueron menores a los encontrados en la bibliografía, lo cual indica que las NP-Ag sintetizadas bajo este método tienen un importante efecto antimicrobiano. La dispersión en los valores de CMB hallados en la literatura pone en evidencia el hecho de que no solo el tamaño de las NPs influye en su capacidad microbicida, sino que otros factores, tales como su forma y recubrimiento, interfieren en el efecto contra los microorganismos. La tabla 10 resume los valores de CMB y características principales de NP-Ag utilizadas en este estudio y por otros autores.

Tabla 10. Valores de CMB obtenidos por otros autores para NP-Ag.

Autores	Tamaño (nm)	Método de síntesis	Cepa bacteriana	Inóculo (UFC/ml)	CMB (ug/ml)
Este estudio	15	Reducción química	<i>E. coli</i>	$2,5 \times 10^5$	10
			<i>E. coli AmpC</i>		5
			<i>P. aeruginosa</i>		20
			<i>S. aureus</i>		ND
Brown <i>et al.</i> (1)	5	Reducción química	<i>E. coli</i> K-12 (pAMP)	5×10^9	4
			<i>E. coli</i> K-12		4
			<i>E. coli</i> O157:H7		4
			<i>E. coli</i> O91:H21		4
			<i>P. aeruginosa</i>		4
			<i>Enterobacter aerogenes</i>		4
			<i>S. aureus</i> MRSA		4
Lara <i>et al.</i> (115)	100	Comerciales – Sigma Aldrich	<i>S. pyogenes</i> RE*	$2,5 \times 10^5$	$7,2 \times 10^3$
			<i>E. coli</i> O 157:H7 RA		$8,9 \times 10^3$
			<i>P. aeruginosa</i> MR		$1,1 \times 10^3$
			<i>Streptococcus sp</i>		$3,15 \times 10^3$
			<i>E. coli</i>		$8,98 \times 10^3$
			<i>P. aeruginosa</i>		$8,98 \times 10^3$
Panacék <i>et al.</i> (116)	20 – 60 Depende del azúcar	Azúcares (glucosa, galactosa, maltosa, lactosa)	<i>Enterococcus faecalis</i>	$10^5 - 10^6$	13,5
			<i>S. aureus</i>		6,75
			<i>E. coli</i>		3,38
			<i>P. aeruginosa</i>		6,75
			<i>S. epidermidis</i>		1,69
			<i>S. aureus</i> MRSA		6,75
Jain <i>et al.</i> (117)	7 – 20	Bioestabilización Patenta USA	<i>P. aeruginosa</i>		12,5
			<i>Salmonella abony</i>		12,5
			<i>Salmonella typhimurium</i>		12,5
			<i>Enterobacter aerogenes</i>		12,5
			<i>Proteus vulgaris</i>		12,5
			<i>Bacillus subtilis</i>		12,5
			<i>S. aureus</i>		ND
			<i>S. epidermidis</i>		12,5
			<i>E. coli</i>		12,5

*RE: resistente eritromicina; RA: resistente ampicilina; MR: Multi-resistente; ND: No determinado;

Aunque los valores de CMB reportados por Brown *et al.* (1) demuestran concentraciones muy bajas de NP-Ag con efecto antimicrobiano, éstas condiciones de síntesis no fueron reproducibles siguiendo la metodología descrita por el autor.

El mecanismo de acción bactericida de las NP-Ag no ha sido del todo dilucidado. Actualmente se han planteado diversos mecanismos que involucran pérdida de la integridad de la pared bacteriana, liberación de iones Ag, generación de ROS. En la membrana y pared celular, las NPs se unen a las moléculas cargadas negativamente de los grupos de proteínas que contienen disulfuro y fósforo, creando orificios en la membrana por los que fluye el contenido citoplasmático de las células, disipando el gradiente H^+ a través de la misma, y algunas veces causando la muerte celular bacteriana (40,41). Estas interacciones permiten a los iones Ag^+ pasar a través de la membrana y ejercer efectos antimicrobianos adicionales intracitoplasmáticas como inhibir los citocromos de la cadena transportadora de electrones; unirse al ADN y ARN ocasionándole daño; inhibir la replicación del ADN y por lo tanto la replicación celular; denaturar la subunidad ribosomal 30S; activar la producción de ROS e inhibir la síntesis de pared celular en las bacterias Gram positivas (38)(42,43). Liu *et al.* encontraron que la liberación iones es consecuencia de un proceso de oxidación en el cual interfieren temperatura, pH, concentración de O_2 y presencia de materia orgánica (118). Adicionalmente, las NP-Ag con menores diámetros liberan mayor cantidad de iones Ag (119). Estos antecedentes justifican los valores de CMB encontrados para este trabajo, los cuales pueden atribuirse al tamaño de las mismas (15 nm), al recubrimiento de citrato, o a la combinación de ambas características. En definitiva, se ha logrado una concentración de iones Ag(I) liberados que resulta suficiente como para alcanzar el 99,9 % de mortalidad con la ventaja de dosis de NP-Ag relativamente bajas.

Por otro lado, el hecho de que se hayan podido establecer CMB para las bacterias Gram negativas y no para las Gram positivas puede tener su explicación en la forma que interactúan las NP-Ag con la pared celular. Taglietti *et al.* (120) demostraron que las bacterias Gram negativas como *E. coli* son más susceptibles que las Gram positivas como *S. aureus* frente a NP-Ag en suspensión recubiertas con glutatión. Sus observaciones de TEM mostraron que las NPs fueron capaces de ingresar en las células de *E. coli*, pero no en las de *S. aureus*, lo cual puede atribuirse a las diferencias en la estructura de la pared celular. Estos resultados se pueden interpretar teniendo en cuenta que las bacterias Gram negativas poseen una pared celular que está formada por una membrana celular, una delgada capa de peptidoglicano y

por fuera de ella una capa de liposacáridos, mientras que la pared celular de las células Gram positivas está formada por una membrana celular y una gruesa capa de peptidoglicano compuesta por ácidos teicoico y lipoteicoico (121), la cual podría generar una mayor resistencia al ingreso de las NPs. Así, una capa de peptidoglicano más gruesa podría actuar como una barrera física difícil de atravesar por las NP-Ag, independientemente del mecanismo de acción involucrado.

Las NP-Ag mostraron un efecto fungistático de 0,13 ug/ml y un efecto fungicida de 2,4 ug/ml para los lotes NP13 y su réplica NP22 usando concentraciones de NP desde 8 – 0,25 ug/ml. Al comparar con el control de fluconazol, el cual estuvo a una concentración de 10 ug/ml, las NP-Ag sintetizadas en este estudio tuvieron un mejor efecto fungicida. La actividad antifúngica puede ser explicada en términos de acción simultánea de las NP-Ag mientras que el fluconazol actúa sobre un solo blanco, reduciendo la concentración de ergosterol para así afectar la integridad de la membrana celular de los hongos (52).

Al comparar estos valores con lo reportado en la literatura para *C. albicans*, se encontró que Monteiro *et al.* (55) obtuvieron un valor de CMI que varió entre 0,4 – 3,3 ug/ml; Panáček *et al.* (50) obtuvieron valores de MIC entre 0,052 – 0,1 ug/ml, mientras que Kim *et al.* (51) reportaron valores de MIC entre 2 – 4 ug/ml. Estas diferencias en los valores de MIC se puede explicar por los diferentes métodos de síntesis de las NP-Ag usados por los autores y el tipo de cepa de *C. albicans* utilizada. Por ejemplo, Monteiro *et al.* (55) sintetizaron NP-Ag a partir de reducción química de AgNO₃ con citrato de sodio y estabilización con NH₃ obteniendo NP-Ag de 5 nm; Panáček *et al.* (116) usaron el método de Tollens modificado, en el cual iones de Ag⁺ son reducidos por sacáridos en presencia de amoníaco y su estabilización con dodecilsulfato sódico; Kim *et al.* (53) disolvieron plata sólida en ácido nítrico y los iones de Ag⁺ fueron disueltos con cloruro de sodio. Tabla 11.

Tabla 11. Valores de CMI obtenidos en este estudio y por otros autores para NP-Ag contra *C. albicans*.

Autores	Tamaño (nm)	Método de síntesis	Especie de <i>Candida</i>	CMI ₅₀ (ug/ml)
Este estudio	15	Reducción química	<i>C. albicans</i> ATCC 14053	0,13
Monteiro <i>et al.</i> (55)	5	Reducción química, estabilización con NH ₃	<i>C. albicans</i> ATCC 10231 <i>C. albicans</i> 324LA/94 <i>C. glabrata</i> ATCC 90030	0,8 – 1,6 0,4 – 3,3 0,4 – 3,3
Panáček <i>et al.</i> (50)	20 – 60 Depende del azúcar	Azúcares (glucosa, galactosa, maltosa, lactosa)	<i>C. albicans</i>	0,05 – 0,1
Kim <i>et al.</i> (51)	13,5	Reducción química	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	2 – 4
Nasrollahi <i>et al.</i> (122)	ND	Reducción química, estabilizados PVP	<i>C. albicans</i> ATCC 5027	0,5
Rodriguez <i>et al.</i> (123)	35	Biosíntesis	<i>Candida</i> spp ND	0,1 – 1,7

ND: no disponible

El efecto antifúngico de las NP-Ag se cree que comienza con la alteración de la membrana celular, deteriorando la transferencia de electrones transmembranales, lo cual causa lisis celular, según lo reportado por (122). El efecto es similar al propuesto en el apartado 6.2.2.

Las NP-TiO₂ se sintetizaron siguiendo el método de sol-gel. El diámetro promedio de partícula fue de 20 nm y su estructura cristalina predominante fue anatasa. Según diversos autores (70)(124), estas dos características permiten que NP-TiO₂ posean propiedades antimicrobianas, sin embargo, no se observaron en este estudio. Esto puede explicarse por la dispersión de las NPs al momento de los ensayos antimicrobianos. En la tabla 2 se expuso la metodología usada para lograr la suspensión de las NP-TiO₂ en el medio de cultivo y aunque se logró que la suspensión se estabilizará por 24 horas antes del ensayo, el cual era el tiempo del ensayo antimicrobiano, al momento de usarlo con las bacterias presentes ocurría un fenómeno de sedimentación a 12 horas aproximadamente, por lo que no fue posible evaluar el efecto antimicrobiano después de 24 horas.

Se debe tener presente que durante la experimentación se usaron técnicas de funcionalización para lograr suspensiones estables no sedimentadas, pero el crecimiento de las bacterias modifican las condiciones en el medio por lo que se comportaron de manera selectiva con las NP-TiO₂ lo cual podría ser la causa de la sedimentación temprana, incluso pudo ocurrir que productos de la ruta metabólica de las mismas modificaran la estabilidad de la suspensión de NP-TiO₂ (125).

Es importante recalcar que, debido a la propiedad de fotocatalisis, las NP-TiO₂ potencian sus propiedades antimicrobianas, sin embargo, en este trabajo cuando fueron activadas con radiación UVB, no se observaron tales propiedades. Algunos autores han reportado propiedades antimicrobianas, como Vargas *et al.* (124) que obtuvieron NP-TiO₂ por el método de sol-gel, con diámetros de 100 nm y con un efecto antimicrobiano contra *E. coli* sensible a los antibióticos bajo la activación con luz UVB. Dentro de su estudio, se realizó una dispersión de las NPs con DMSO, proceso que se realizó en este trabajo pero que no permitió dispersión sobre las NP-TiO₂ sintetizadas.

El no tejido de nylon-6 obtenido por electrohilado tuvo un diámetro promedio de fibra de 350 nm y una morfología bien definida. Estas dos variables están relacionadas con la concentración del polímero, voltaje aplicado, distancia inyector-colector, caudal, y las propiedades de la solución (tensión superficial, conductividad). Los parámetros ambientales también juegan un papel importante, sin embargo, el equipo de electrohilado utilizado en el estudio no permite modificar estas variables. Luego de impregnar el no tejido con las NP-Ag sintetizadas con la actividad antimicrobiana comprobada, NP13 y NP22, se logró inhibición microbiana por contacto luego de 24 horas de evaluación. Los estudios de actividad antimicrobiana de fibras no tejidas impregnadas con NP-Ag son diversos, sin embargo, no hay estudios reportados específicamente en impregnación de fibras no tejidas de nylon-6, como el reportado en este estudio. De forma análoga, Shi *et. al* (126) reportaron efecto antimicrobiano de NP-Ag en nylon-6 sintetizadas *in situ*, es decir que tanto la NP como la fibra se sintetizaron conjuntamente, y obtuvieron propiedades antimicrobianas al contacto contra *E. coli* y *B. cereus* con erradicación del 99,9 % de las bacterias. De la misma manera, Pant *et al.* (127) reportó propiedades antimicrobianas contra *E. coli* y *S. aureus*.

11. CONCLUSIONES

La presente investigación permitió sintetizar NP-Ag con actividad antimicrobiana sobre microorganismos que comúnmente están relacionados con IAAS; adicionalmente, estas NP-Ag pueden ser adaptadas a no tejidos, sin perder sus propiedades antimicrobianas, lo cual resulta ser de utilidad para desarrollos que tienen aplicabilidad en el ambiente hospitalario y en otros en donde el control del crecimiento microbiano sea un importante el bienestar de la población. No obstante, las condiciones experimentales son críticas para la adecuada síntesis de NP-Ag, así la necesidad de evaluar las características físico-químicas mediante métodos definidos.

Al comparar las nanopartículas obtenidas por este estudio siguiendo la metodología exacta de Brown *et al.* los resultados no lograron ser reproducidos tanto en las características físico-químicas ni en el efecto antimicrobiano, razón por la que se hicieron ajustes hasta modificar el método de tal manera que permitiera obtener NP-Ag de 15 nm de diámetro, las cuales presentaron forma esférica, mínima agregación y estabilidad al ser sintetizadas en condiciones con diferentes pH y recubiertas con iones de citrato de sodio. El ajuste del pH en la síntesis de las NP-Ag mostró ser un aspecto fundamental que tiene un efecto importante en la disminución del diámetro de las mismas, con una relación inversamente proporcional, que a su vez está especialmente relacionado con la forma de las mismas y las características de superficie necesarias para cumplir con su actividad antimicrobiana.

Las NP-Ag con diámetros menores mostraron un efecto antibacteriano mayor al comparar con trabajos de otros autores, siendo así que los valores de CMB obtenidos en este estudio fueron menores demostrando actividad antimicrobiana apropiada, de gran utilidad para los fines establecidos frente al control de las IAAS. Las bacterias Gram negativas tienen una mayor susceptibilidad a las NP-Ag comparadas con las bacterias Gram positivas; esta susceptibilidad se puede atribuir a la diferencia en la estructura de la pared bacteriana. Adicionalmente, las NP-Ag sintetizadas en este estudio tienen un efecto antifúngico a muy bajas concentraciones (0,13 – 2,4 ug/ml), lo que permite que futuros desarrollos tengan un impacto polimicrobiano, que es lo ideal para el ambiente hospitalario.

Las NP-TiO₂ sintetizadas en este estudio tuvieron diámetros inferiores a 20 nm y la estructura cristalina predominante fue anatasa. Las NP-TiO₂ fueron dispersadas con una funcionalización con carbono, sin embargo, no se logró mantener estable la dispersión y los efectos antimicrobianos, al menos contra *E. coli*; es probable que el tiempo de dispersión no fuera suficiente para lograr propiedades antibacterianas o que las condiciones experimentales alteraran sus propiedades. Se requiere de nuevos protocolos que permitan ajustar las condiciones para que la dispersión de las NP-TiO₂ sea apropiada y asegurar que la superficie de contacto en los microorganismos permita la interacción y se desencadenen los efectos microbicidas.

La creación de fibras de nylon-6 no tejidas a partir del método de electrohilado con diámetros nanométricos y multicapas en el desarrollo de la investigación permitió establecer un protocolo reproducible. Así, cuando las fibras fueron impregnadas con NP-Ag se logró mantener las propiedades antibacterianas al contacto contra *E. coli* ATCC 25922. Se requiere de evaluar con otros microorganismos y en condiciones que simulen el contacto en el ambiente hospitalario para determinar la utilidad de este desarrollo, así como aplicar pruebas de lavado y de otras condiciones físicas frente a la actividad antimicrobiana.

12. PERSPECTIVAS

Las NP-Ag sintetizadas tuvieron un diámetro de 15 nm. Se espera obtener un protocolo que asegure la homogeneidad en las soluciones con una mínima aglomeración, con el fin de lograr una mayor eficiencia antimicrobiana y disminuir los costos de producción.

Las NP-TiO₂ sintetizadas tuvieron un diámetro de 20 nm; sin embargo, no hubo propiedad antimicrobiana. Se espera mejorar la metodología de dispersión de las NPs para así obtener un menor porcentaje de aglomeración y propiedades antimicrobianas.

Se espera obtener una metodología de síntesis *in situ* de las NP-Ag para mejorar la dispersión de las NPs sobre las fibras no tejidas obtenidas por electrohilado.

Se propone que las nanopartículas sintetizadas puedan ser usadas como refuerzos de otros polímeros que se usen sobre tejidos celulares evaluando previamente su actividad antimicrobiana y con mínimo o nulo efecto citotóxico con fines de manejo de heridas, previniendo infecciones en los pacientes.

A futuro se pretende estudiar los mercados locales y nacionales para la comercialización de este tipo de productos en alianza con empresas del sector textil e industrial, todo con el fin de mejorar las condiciones de seguridad para el control de microorganismos y evitar la propagación de enfermedades; inicialmente, para el sector hospitalario, pero con miras hacia otro tipo de ambientes que así lo requieran, mejorando las condiciones de vida de las poblaciones.

13. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

13.1 Metodología de fabricación

Metodología de síntesis de nanopartículas de plata radicado en el CIDI con No. 10-10145-08/17. Ver anexo 1.

13.2 Ponencias

- Segundo Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología Molecular C2B2 2016, póster titulado “*Evaluación antibacteriana de nanopartículas de plata como estrategia de control de las infecciones asociadas a la atención en salud*”, radicado en el CIDI No. 03-08980-03117. Ver anexo 2.
- VII Congreso Latinoamericano de Ingeniería Biomédica CLAIB 2016, ponencia oral titulada “*Characterization of silver nanoparticles for potential use as antimicrobial agent*”, radicado en el CIDI No. 03-09288-05117. Ver anexo 3.
- IV Simposio de Investigación Escuela de Ciencias de la Salud y Clínica Universitaria Bolivariana, “*Comparte tu conocimiento*” UPB 2016, ponencia oral titulada “*Caracterización físico-química y efecto antimicrobiano de nanopartículas de plata sintetizadas químicamente*”, radicado en el CIDI No. 03-08982-03117. Ver anexo 4.

13.3 Artículo revisión

Se presentó el artículo “Textiles funcionales como barrera de protección ante infecciones asociadas a la atención en salud” en espera de revisión en la Revista EIA. ISSN: 1794-1237. Ver anexo 5.

14. REFERENCIAS

1. Brown AN, Smith K, Samuels TA, Lu J, Obare SO, Scott ME. Nanoparticles functionalized with ampicillin destroy multiple-antibiotic-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter aerogenes* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol*. 2012 Apr;78(8):2768–74.
2. OMS | Carga mundial de infecciones asociadas a la atención sanitaria [Internet]. WHO. [cited 2016 Jan 13]. Available from: http://www.who.int/gpsc/country_work/burden_hcai/es/
3. Vigilancia epidemiológica de las infecciones asociadas a la atención en salud [Internet]. Washington D. C.: Organización Panamericana de la Salud; 2012 p. 54. Report No.: Módulo III. Available from: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=19272&Itemid=
4. WHO | The burden of health care-associated infection worldwide [Internet]. WHO. [cited 2016 Jan 13]. Available from: http://www.who.int/gpsc/country_work/burden_hcai/en/
5. Klevens RM, Edwards JR, Richards CL, Horan TC, Gaynes RP, Pollock DA, et al. Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals, 2002. *Public Health Rep Wash DC* 1974. 2007 Apr;122(2):160–6.
6. Neely AN, Maley MP. Survival of Enterococci and Staphylococci on Hospital Fabrics and Plastic. *J Clin Microbiol*. 2000 Feb;38(2):724–6.
7. Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012 Mar 1;18(3):268–81.

8. Malagon-Londoño G. Generalidades sobre infección hospitalaria. In: Infecciones Hospitalaria. 3rd ed. Bogota: Editorial Medica Internacional; 2010. p. 3–14.
9. CDC - Publications - HICPAC [Internet]. [cited 2016 Feb 24]. Available from: <http://www.cdc.gov/hicpac/pubs.html>
10. Schulster LM, Chinn RYW, Arduino MJ, Carpenter J, Donlan R, Ashford D, et al. Guidelines for environmental infection control in health-care facilities. Recommendations from CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). Chicago: American Society for Healthcare Engineering/American Hospital Association; 2004 p. 235.
11. Valderrama Beltran SL, Ariza Ayala BE, Osorio Pinzon JV. Medio ambiente e infección. In: Infecciones Hospitalarias. 3rd ed. Bogota: Editorial Medica Internacional; 2010. p. 126–47.
12. Pelgrift RY, Friedman AJ. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013 Nov 30;65(13–14):1803–15.
13. Som C, Wick P, Krug H, Nowack B. Environmental and health effects of nanomaterials in nanotextiles and façade coatings. *Environ Int.* 2011 Aug;37(6):1131–42.
14. Sattar SA, Springthorpe S, Mani S, Gallant M, Nair RC, Scott E, et al. Transfer of bacteria from fabrics to hands and other fabrics: development and application of a quantitative method using *Staphylococcus aureus* as a model. *J Appl Microbiol.* 2001 Jun;90(6):962–70.
15. Perry C, Marshall R, Jones E. Bacterial contamination of uniforms. *J Hosp Infect.* 2001 Jul;48(3):238–41.
16. Treacle AM, Thom KA, Furuno JP, Strauss SM, Harris AD, Perencevich EN. Bacterial contamination of health care workers' white coats. *Am J Infect Control.* 2009 Mar;37(2):101–5.

17. Trillis F, Eckstein EC, Budavich R, Pultz MJ, Donskey CJ. Contamination of hospital curtains with healthcare-associated pathogens. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2008 Nov;29(11):1074–6.
18. Ohl M, Schweizer M, Graham M, Heilmann K, Boyken L, Diekema D. Hospital privacy curtains are frequently and rapidly contaminated with potentially pathogenic bacteria. *Am J Infect Control*. 2012 Dec;40(10):904–6.
19. Cataño, O JC, Echeverri LM, Szela C, Cataño, O JC, et al. Bacterial Contamination of Clothes and Environmental Items in a Third-Level Hospital in Colombia, Bacterial Contamination of Clothes and Environmental Items in a Third-Level Hospital in Colombia. *Interdiscip Perspect Infect Dis Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2012 Mar 26;2012, 2012:e507640.
20. Wiener-Well Y, Galuty M, Rudensky B, Schlesinger Y, Attias D, Yinnon AM. Nursing and physician attire as possible source of nosocomial infections. *Am J Infect Control*. 2011 Sep;39(7):555–9.
21. Callaghan I. Bacterial contamination of nurses' uniforms: a study. *Nurs Stand R Coll Nurs G B 1987*. 1998 Sep 23;13(1):37–42.
22. <http://www.happycog.com> HCS-. *ACP Hospitalist*, August 2011 - The white coat of the future [Internet]. [cited 2016 Feb 24]. Available from: <http://www.acphospitalist.org/archives/2011/08/infection.htm>
23. Panagea S, Winstanley C, Walshaw MJ, Ledson MJ, Hart CA. Environmental contamination with an epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa* in a Liverpool cystic fibrosis centre, and study of its survival on dry surfaces. *J Hosp Infect*. 2005 Feb;59(2):102–7.
24. Sasahara T, Hayashi S, Morisawa Y, Sakihama T, Yoshimura A, Hirai Y. *Bacillus cereus* bacteremia outbreak due to contaminated hospital linens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. 2011 Feb;30(2):219–26.

25. Dohmae S, Okubo T, Higuchi W, Takano T, Isobe H, Baranovich T, et al. *Bacillus cereus* nosocomial infection from reused towels in Japan. *J Hosp Infect.* 2008 Aug;69(4):361–7.
26. Fijan S, Turk SŠ. Hospital textiles, are they a possible vehicle for healthcare-associated infections? *Int J Environ Res Public Health.* 2012 Sep;9(9):3330–43.
27. Boyce JM. Environmental contamination makes an important contribution to hospital infection. *J Hosp Infect.* 2007 Jun;65 Suppl 2:50–4.
28. Sexton T, Clarke P, O’Neill E, Dillane T, Humphreys H. Environmental reservoirs of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in isolation rooms: correlation with patient isolates and implications for hospital hygiene. *J Hosp Infect.* 2006 Feb;62(2):187–94.
29. Esteves DC, Pereira VC, Souza JM, Keller R, Simões RD, Winkelstroter Eller LK, et al. Influence of biological fluids in bacterial viability on different hospital surfaces and fomites. *Am J Infect Control.* 2016 Mar 1;44(3):311–4.
30. Otter JA, Yezli S, French GL. The role played by contaminated surfaces in the transmission of nosocomial pathogens. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2011 Jul;32(7):687–99.
31. Hajipour MJ, Fromm KM, Akbar Ashkarran A, Jimenez de Aberasturi D, Larramendi IR de, Rojo T, et al. Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends Biotechnol.* 2012;30(10):499–511.
32. Oćwieja M, Adamczyk Z, Morga M, Kubiak K. Silver particle monolayers — Formation, stability, applications. *Adv Colloid Interface Sci.* 2015 Aug;222:530–63.
33. Oćwieja M, Adamczyk Z, Morga M, Kubiak K. Silver particle monolayers - formation, stability, applications. *Adv Colloid Interface Sci.* 2014;
34. Rai MK, Deshmukh SD, Ingle AP, Gade AK. Silver nanoparticles: The powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *J Appl Microbiol.* 2012;112(5):841–52.

35. Kvítek L, Panáček A, Soukupová J, Kolář M, Večeřová R, Pucek R, et al. Effect of surfactants and polymers on stability and antibacterial activity of silver nanoparticles (NPs). *J Phys Chem C*. 2008;112(15):5825–34.
36. Moritz M, Geszke-Moritz M. The newest achievements in synthesis, immobilization and practical applications of antibacterial nanoparticles. *Chem Eng J*. 2013;228:596–613.
37. El Badawy AM, Luxton TP, Silva RG, Scheckel KG, Suidan MT, Tolaymat TM. Impact of environmental conditions (pH, ionic strength, and electrolyte type) on the surface charge and aggregation of silver nanoparticles suspensions. *Environ Sci Technol*. 2010;44(4):1260–6.
38. Rai MK, Deshmukh SD, Ingle AP, Gade AK. Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *J Appl Microbiol*. 2012 May;112(5):841–52.
39. Blecher K, Nasir A, Friedman A. The growing role of nanotechnology in combating infectious disease. *Virulence*. 2011;2(5):395–401.
40. Knetsch MLW, Koole LH. New strategies in the development of antimicrobial coatings: The example of increasing usage of silver and silver nanoparticles. *Polymers*. 2011;3(1):340–66.
41. Huh AJ, Kwon YJ. “Nanoantibiotics”: A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *J Controlled Release*. 2011;156(2):128–45.
42. Lara HH, Ayala-Núñez N V., Ixtepan Turrent L del C, Rodríguez Padilla C. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *World J Microbiol Biotechnol*. 2010;26(4):615–21.
43. Pelgrift RY, Friedman AJ. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65(13–14):1803–15.

44. Durán N, Durán M, de Jesus MB, Seabra AB, Fávaro WJ, Nakazato G. Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med*. 2016 Apr;12(3):789–99.
45. Lok C-N, Ho C-M, Chen R, He Q-Y, Yu W-Y, Sun H, et al. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *J Biol Inorg Chem JBIC Publ Soc Biol Inorg Chem*. 2007 May;12(4):527–34.
46. Bera RK, Mandal SM, Raj CR. Antimicrobial activity of fluorescent Ag nanoparticles. *Lett Appl Microbiol*. 2014;58(6):520–6.
47. Pal S, Tak YK, Song JM. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(6):1712–20.
48. Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim J-H, Park SJ, Lee HJ, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med*. 2007 Mar;3(1):95–101.
49. Knetsch MLW, Koole LH. New Strategies in the Development of Antimicrobial Coatings: The Example of Increasing Usage of Silver and Silver Nanoparticles. *Polymers*. 2011 Jan 26;3(1):340–66.
50. Panáček A, Kolár M, Vecerová R, Pucek R, Soukupová J, Krystof V, et al. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials*. 2009 Oct;30(31):6333–40.
51. Kim K-J, Sung WS, Moon S-K, Choi J-S, Kim JG, Lee DG. Antifungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes. *J Microbiol Biotechnol*. 2008 Aug;18(8):1482–4.
52. Artunduaga Bonilla JJ, Paredes Guerrero DJ, Sánchez Suárez CI, Ortiz López CC, Torres Sáez RG. In vitro antifungal activity of silver nanoparticles against fluconazole-resistant *Candida* species. *World J Microbiol Biotechnol*. 2015 Nov;31(11):1801–9.
53. Kim K-J, Sung WS, Suh BK, Moon S-K, Choi J-S, Kim JG, et al. Antifungal activity

and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*. *Biometals Int J Role Met Ions Biol Biochem Med*. 2009 Apr;22(2):235–42.

54. Hwang I, Lee J, Hwang JH, Kim K-J, Lee DG. Silver nanoparticles induce apoptotic cell death in *Candida albicans* through the increase of hydroxyl radicals. *FEBS J*. 2012 Apr;279(7):1327–38.

55. Monteiro DR, Gorup LF, Silva S, Negri M, de Camargo ER, Oliveira R, et al. Silver colloidal nanoparticles: antifungal effect against adhered cells and biofilms of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Biofouling*. 2011 Aug;27(7):711–9.

56. Vazquez-Muñoz R, Avalos-Borja M, Castro-Longoria E. Ultrastructural Analysis of *Candida albicans* When Exposed to Silver Nanoparticles. *PLoS ONE* [Internet]. 2014 Oct 7 [cited 2017 Mar 2];9(10). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4188582/>

57. Rai M, Deshmukh SD, Ingle AP, Gupta IR, Galdiero M, Galdiero S. Metal nanoparticles: The protective nanoshield against virus infection. *Crit Rev Microbiol*. 2016;42(1):46–56.

58. Lara HH, Ayala-Nuñez NV, Ixtapan-Turrent L, Rodriguez-Padilla C. Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. *J Nanobiotechnology*. 2010;8:1.

59. Xiang D, Zheng Y, Duan W, Li X, Yin J, Shigdar S, et al. Inhibition of A/Human/Hubei/3/2005 (H3N2) influenza virus infection by silver nanoparticles in vitro and in vivo. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:4103–14.

60. Gaikwad S, Ingle A, Gade A, Rai M, Falanga A, Incoronato N, et al. Antiviral activity of mycosynthesized silver nanoparticles against herpes simplex virus and human parainfluenza virus type 3. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:4303–14.

61. Saini P, Saha SK, Roy P, Chowdhury P, Sinha Babu SP. Evidence of reactive oxygen species (ROS) mediated apoptosis in *Setaria cervi* induced by green silver nanoparticles from

Acacia auriculiformis at a very low dose. *Exp Parasitol*. 2016 Jan;160:39–48.

62. Rahimi MT, Ahmadpour E, Rahimi Esboei B, Spotin A, Kohansal Koshki MH, Alizadeh A, et al. Scolicidal activity of biosynthesized silver nanoparticles against *Echinococcus granulosus protoscolices*. *Int J Surg*. 2015 Jul;19:128–33.

63. Dastjerdi R, Montazer M. A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles: Focus on anti-microbial properties. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010 Aug 1;79(1):5–18.

64. Gupta SM, Tripathi M. A review of TiO₂ nanoparticles. *Chin Sci Bull*. 2011 May 19;56(16):1639–57.

65. Park YR, Kim KJ. Structural and optical properties of rutile and anatase TiO₂ thin films: Effects of Co doping. *Thin Solid Films*. 2005 Jul 22;484(1–2):34–8.

66. Fu G, Vary PS, Lin C-T. Anatase TiO₂ Nanocomposites for Antimicrobial Coatings. *J Phys Chem B*. 2005 May 1;109(18):8889–98.

67. Banerjee S, Gopal J, Muraleedharan P, Tyagi AK, Raj B. Physics and chemistry of photocatalytic titanium dioxide: visualization of bactericidal activity using atomic force microscopy. *Curr Sci*. 2006 May;90(10):1378–83.

68. Huh AJ, Kwon YJ. “Nanoantibiotics”: a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *J Control Release Off J Control Release Soc*. 2011 Dec 10;156(2):128–45.

69. Kubacka A, Fernández-García M, Cerrada ML, Fernández-García M. Titanium Dioxide–Polymer Nanocomposites with Advanced Properties. In: Cioffi N, Rai M, editors. *Nano-Antimicrobials* [Internet]. Springer Berlin Heidelberg; 2012 [cited 2016 Mar 18]. p. 119–49. Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-24428-5_4

70. Carré G, Hamon E, Ennahar S, Estner M, Lett M-C, Horvatovich P, et al. TiO₂ Photocatalysis Damages Lipids and Proteins in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*.

2014 Apr 15;80(8):2573–81.

71. Allahverdiyev AM, Abamor ES, Bagirova M, Rafailovich M. Antimicrobial effects of TiO₂ and Ag₂O nanoparticles against drug-resistant bacteria and leishmania parasites. *Future Microbiol.* 2011;6:933–40.

72. Allahverdiyev AM, Abamor ES, Bagirova M, Rafailovich M. Antimicrobial effects of TiO₂ and Ag₂O nanoparticles against drug-resistant bacteria and leishmania parasites. *Future Microbiol.* 2011 Aug;6(8):933–40.

73. Aashis S. Roy AP. Effect of Nano - Titanium Dioxide with Different Antibiotics against Methicillin- Resistant Staphylococcus Aureus. *J Biomater Nanobiotechnology.* 2010;1(1):37.

74. Jiang JF, Cui HX, Yang T, Cai HC, Wu DL. Inactivation efficiency of nano-Cu₂/TiO₂ on avian influenza (H9N2). *J Funtional Mater.* 2009;40:1403–6.

75. Cui H, Jiang J, Gu W, Sun C, Wu D, Yang T, et al. Photocatalytic Inactivation Efficiency of Anatase Nano-TiO₂ Sol on the H9N2 Avian Influenza Virus. *Photochem Photobiol.* 2010 Sep 1;86(5):1135–9.

76. Allahverdiyev AM, Abamor ES, Bagirova M, Baydar SY, Ates SC, Kaya F, et al. Investigation of antileishmanial activities of TiO₂@Ag nanoparticles on biological properties of *L. tropica* and *L. infantum* parasites, in vitro. *Exp Parasitol.* 2013 Sep;135(1):55–63.

77. Palmer RE. *Frontiers of Nanoscience.* United Kingdom: Elsevier; 2012.

78. Leng Y. *Materials Characterization: Introduction to Microscopic and Spectroscopic Methods.* Second. Singapore: John Wiley & Sons, Inc.; 2013. 392 p.

79. Stuart BH. Degradation. In: *Polymer Analysis.* John Wiley & Sons, Inc.; 2002. p. 191–208.

80. Bhardwaj N, Kundu SC. *Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique.*

Biotechnol Adv. 2010 Jan;28(3):325–47.

81. Mitchell GR, Davis F. Electrospinning and Tissue Engineering. In: Fernandes PR, Bártolo PJ, editors. *Advances on Modeling in Tissue Engineering*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2011. p. 111–36. (Computational Methods in Applied Sciences; vol. 20).

82. Braghirolli DI, Steffens D, Pranke P. Electrospinning for regenerative medicine: a review of the main topics. *Drug Discov Today*. 2014 Apr 2;

83. Agarwal S, Wendorff JH, Greiner A. Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer*. 2008 Dec;49(26):5603–21.

84. Sun B, Long YZ, Zhang HD, Li MM, Duvail JL, Jiang XY, et al. Advances in three-dimensional nanofibrous macrostructures via electrospinning. *Prog Polym Sci*. 2013 Jun;

85. Rogina A. Electrospinning process: Versatile preparation method for biodegradable and natural polymers and biocomposite systems applied in tissue engineering and drug delivery. *Appl Surf Sci*. 2014 Mar;296:221–30.

86. Qin Y, Chronakis IS. *Micro-/Nano-Fibers by Electrospinning Technology: Processing, Properties and Applications*. In: *Micro-Manufacturing Engineering and Technology*. Elsevier; 2010. p. 264–86.

87. Shahid-ul-Islam, Butola BS, Mohammad F. Silver nanomaterials as future colorants and potential antimicrobial agents for natural and synthetic textile materials. *RSC Adv*. 2016 May 3;6(50):44232–47.

88. Álvarez-Paino M, Muñoz-Bonilla A, Fernández-García M. Antimicrobial Polymers in the Nano-World. *Nanomater Basel Switz*. 2017 Feb 22;7(2).

89. Finn N. 2 - Types of smart materials for protection A2 - Chapman, R.A. In: *Smart Textiles for Protection* [Internet]. Woodhead Publishing; 2013 [cited 2016 Jul 12]. p. 34–86. (Woodhead Publishing Series in Textiles). Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780857090560500029>

90. Sen AK. Coated Textiles: Principles and Applications [Internet]. Second. CRC Press; 2007 [cited 2016 Feb 24]. 254 p. Available from: <https://www.crcpress.com/Coated-Textiles-Principles-and-Applications-Second-Edition/Sen/9781420053456>
91. Sundarrajan S, Ramakrishna S. 4 - The use of nanomaterials in smart protective clothing A2 - Chapman, R.A. In: Smart Textiles for Protection [Internet]. Woodhead Publishing; 2013 [cited 2016 Jul 12]. p. 127–47. (Woodhead Publishing Series in Textiles). Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780857090560500042>
92. Lacasse K, Baumann W. Textile Chemicals [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2004 [cited 2016 Feb 24]. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-18898-5>
93. Gugliuzza A, Drioli E. A review on membrane engineering for innovation in wearable fabrics and protective textiles. *J Membr Sci*. 2013 Nov 1;446:350–75.
94. Duquesne S, Magniez C, Camino G, editors. Multifunctional Barriers for Flexible Structure [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2007 [cited 2016 Feb 24]. (Materials Science; vol. 97). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-71920-5>
95. Palza H. Antimicrobial Polymers with Metal Nanoparticles. *Int J Mol Sci*. 2015 Jan 19;16(1):2099–116.
96. Windler L, Height M, Nowack B. Comparative evaluation of antimicrobials for textile applications. *Environ Int*. 2013 Mar;53:62–73.
97. Sarkar S, Guibal E, Quignard F, SenGupta AK. Polymer-supported metals and metal oxide nanoparticles: synthesis, characterization, and applications. *J Nanoparticle Res*. 2012 Jan 25;14(2):1–24.
98. Damani N. Manual of Infection Prevention and Control. 3 edition. Oxford University Press; 2012. 400 p.

99. Pollini M, Russo M, Licciulli A, Sannino A, Maffezzoli A. Characterization of antibacterial silver coated yarns. *J Mater Sci Mater Med*. 2009 Nov;20(11):2361–6.
100. Barani H. Antibacterial continuous nanofibrous hybrid yarn through in situ synthesis of silver nanoparticles: Preparation and characterization. *Mater Sci Eng C*. 2014 Oct 1;43:50–7.
101. Perera S, Bhushan B, Bandara R, Rajapakse G, Rajapakse S, Bandara C. Morphological, antimicrobial, durability, and physical properties of untreated and treated textiles using silver-nanoparticles. *Colloids Surf Physicochem Eng Asp*. 2013 Sep 5;436:975–89.
102. Balakumaran MD, Ramachandran R, Jagadeeswari S, Kalaichelvan PT. In vitro biological properties and characterization of nanosilver coated cotton fabrics – An application for antimicrobial textile finishing. *Int Biodeterior Biodegrad*. 2016 Feb;107:48–55.
103. Bearman GML, Rosato A, Elam K, Sanogo K, Stevens MP, Sessler CN, et al. A Crossover Trial of Antimicrobial Scrubs to Reduce Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Burden on Healthcare Worker Apparel. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2012 Mar;33(3):268–275.
104. Zhao Y, Zhou Y, Wu X, Wang L, Xu L, Wei S. A facile method for electrospinning of Ag nanoparticles/poly (vinyl alcohol)/carboxymethyl-chitosan nanofibers. *Appl Surf Sci*. 2012 Sep 1;258(22):8867–73.
105. Dastjerdi R, Mojtahedi MRM, Shoshtari AM, Khosroshahi A. Investigating the production and properties of Ag/TiO₂/PP antibacterial nanocomposite filament yarns. *J Text Inst*. 2010 Feb 22;101(3):204–13.
106. Schweizer M, Graham M, Ohl M, Heilmann K, Boyken L, Diekema D. Novel hospital curtains with antimicrobial properties: a randomized, controlled trial. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2012 Nov;33(11):1081–5.

107. Kotsanas D, Wijesooriya WRPLI, Sloane T, Stuart RL, Gillespie EE. The silver lining of disposable sporicidal privacy curtains in an intensive care unit. *Am J Infect Control*. 2014 Apr;42(4):366–70.
108. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing [Internet]. 27th ed. Vol. CLSI supplement M100. Wayne, PA; 2017. 282 p. Available from: <http://clsi.org/>
109. Ajitha B, Ashok Kumar Reddy Y, Sreedhara Reddy P. Enhanced antimicrobial activity of silver nanoparticles with controlled particle size by pH variation. *Powder Technol*. 2015 Jan;269:110–7.
110. Brause R, Möltgen H, Kleinermanns K. Characterization of laser-ablated and chemically reduced silver colloids in aqueous solution by UV/VIS spectroscopy and STM/SEM microscopy. *Appl Phys B*. 2002 Nov 1;75(6–7):711–6.
111. Kreibitz U, Vollmer M. Optical Properties of Metal Clusters [Internet]. Vol. 25. Springer Berlin Heidelberg; 1995. 535 p. Available from: <http://www.springer.com/la/book/9783540578369>
112. Mulvaney P. Surface Plasmon Spectroscopy of Nanosized Metal Particles. *Langmuir*. 1996 Jan 1;12(3):788–800.
113. Sosa IO, Noguez C, Barrera RG. Optical Properties of Metal Nanoparticles with Arbitrary Shapes. *J Phys Chem B*. 2003 Jul 1;107(26):6269–75.
114. Qin Y, Ji X, Jing J, Liu H, Wu H, Yang W. Size control over spherical silver nanoparticles by ascorbic acid reduction. *Colloids Surf Physicochem Eng Asp*. 2010 Dec 3;372(1):172–6.
115. Lara HH, Ayala-Núñez NV, Turrent L del CI, Padilla CR. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *World J Microbiol Biotechnol*. 2009 Oct 22;26(4):615–21.

116. Panáček A, Kvítek L, Pucek R, Kolář M, Večeřová R, Pizúrová N, et al. Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity. *J Phys Chem B*. 2006 Aug 1;110(33):16248–53.
117. Jain J, Arora S, Rajwade JM, Omray P, Khandelwal S, Paknikar KM. Silver nanoparticles in therapeutics: development of an antimicrobial gel formulation for topical use. *Mol Pharm*. 2009 Oct;6(5):1388–401.
118. Liu J, Hurt RH. Ion Release Kinetics and Particle Persistence in Aqueous Nano-Silver Colloids. *Environ Sci Technol*. 2010 Mar 15;44(6):2169–75.
119. Sotiriou GA, Pratsinis SE. Antibacterial Activity of Nanosilver Ions and Particles. *Environ Sci Technol*. 2010 Jul 15;44(14):5649–54.
120. Taglietti A, Diaz Fernandez YA, Amato E, Cucca L, Dacarro G, Grisoli P, et al. Antibacterial Activity of Glutathione-Coated Silver Nanoparticles against Gram Positive and Gram Negative Bacteria. *Langmuir*. 2012 May 29;28(21):8140–8.
121. Kohler T, Xia G, Kulauzovic E, Peschel A. Chapter 5 - Teichoic acids, lipoteichoic acids and related cell wall glycopolymers of Gram-positive bacteria. In: Holst O, Brennan PJ, Itzstein M von, Moran AP, editors. *Microbial Glycobiology* [Internet]. San Diego: Academic Press; 2010. p. 75–91. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123745460000055>
122. Nasrollahi A, Pourshamsian K, Mansourkiaee P. Antifungal activity of silver nanoparticles on some of fungi. *Int J Nano Dimens*. 2011 Mar 1;1(3):233–9.
123. Rodrigues AG, Ping LY, Marcato PD, Alves OL, Silva MCP, Ruiz RC, et al. Biogenic antimicrobial silver nanoparticles produced by fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013 Jan;97(2):775–82.
124. Vargas MA, Rodríguez-Páez JE. Amorphous TiO₂ nanoparticles: Synthesis and antibacterial capacity. *J Non-Cryst Solids*. 2017 Mar 1;459:192–205.

125. Lin D, Story SD, Walker SL, Huang Q, Liang W, Cai P. Role of pH and ionic strength in the aggregation of TiO₂ nanoparticles in the presence of extracellular polymeric substances from *Bacillus subtilis*. *Environ Pollut*. 2017 Sep 1;228:35–42.
126. Shi Q, Vitchuli N, Nowak J, Noar J, Caldwell JM, Breidt F, et al. One-step synthesis of silver nanoparticle-filled nylon 6 nanofibers and their antibacterial properties. *J Mater Chem*. 2011;21:10330–5.
127. Pant B, Pant HR, Pandeya DR, Panthi G, Nam KT, Hong ST, et al. Characterization and antibacterial properties of Ag NPs loaded nylon-6 nanocomposite prepared by one-step electrospinning process. *Colloids Surf Physicochem Eng Asp*. 2012 Feb 5;395:94–9.

CONFIDENTIAL

Pares Evaluadores

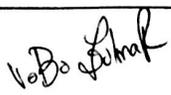
Interno y Externo

Nombres y Apellidos	Cargo	Institución	Teléfono
Diana Ginette Zárate Triviño, PhD. dianazt@gmail.com	Docente investigador Facultad de Ciencias Biológicas	Universidad Autónoma de Nuevo León	(81) 83294115 Ext. 2933
Ana Eliza Casas Botero, PhD. ana.casas@upb.edu.co	Directora Facultad Ingeniería Textil	Universidad Pontificia Bolivariana	4488388

15. ANEXOS

Anexo 1. Metodología de síntesis de nanopartículas de plata radicadas en el CIDI.

Favor Devolver Copia Firmada. Escuela Ciencias de la Salud

		CARTA REMISORIA DE PRODUCTOS Versión: 4 Código: II-FO-384	
TIPO DE PRODUCTO:	Metodología_Procedimiento_Documentos		
SUBTIPO	Metodología		
Anexos:	Documento con la especificación de la metodología o el procedimiento registrado. (Digital)		
Colciencias	#N/A		
Fecha de Recibido:	03-08-2017		
Radicado del producto:	10-10195-08/17		
TITULO DEL PRODUCTO O DESCRIPCION:	Fecha de publicación o solicitud de registro	8	5 2017
Síntesis química de nanopartículas de plata			
Ciudad de origen (publicación)	Medellin	País de origen (publicación o registro)	Colombia
Medio de divulgación	Impreso	ISSN	ISBN
Ambito	local	Confidencial	NO
Año de realización	2016	Idioma	Español
usos	Material reforzante para fibras poliméricas		
Idole (academico o industrial)			
No Aplica		No Aplica	
No Aplica		No Aplica	
No Aplica		No Aplica	
Observaciones:			
Autores			
ID	Nombre y Apellidos		
144908	Jennifer Zapata Giraldo	2520 - Isabel Ortiz	
91813	Lina Hoyos	65408 - Nelson Escobar	
5343	Diana Cuesta		
4812	Beatriz Galeano		
304436	Monica Mejia		
4093	Luz Elena Botero		
Radicado de proyecto	5468-01/16-55		
Título del Proyecto	Cubierta polimérica nanoreforzada como barrera de protección ante infecciones asociadas a la atención en salud		
Firma			
Nombre	Diana Marin		
Coordinador del Grupo / Unidad			
Formato elaborado por Luz Mery Herrera Galeano	Ultima actualización: 24/5/2013		

Anexo 2. Certificado de participación evento científico C2B2 2016.



SOCIEDAD
COLOMBIANA
DE CIENCIAS
QUÍMICAS

Hacen constar que:

El trabajo “Evaluación antibacteriana de nanopartículas de plata como estrategia de control de las infecciones asociadas a la atención en salud” de autoría de:

Zapata-Giraldo J, Cuesta D, Hoyos L, Botero LE.

Fue presentado en la sesión de posters del **Segundo Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología Molecular C2B2 2016.**

Realizado en la ciudad de Medellín del 3 al 5 de noviembre de 2016.

LUIS FERNANDO RENDÓN CORTÉS
Director de Educación Continua
Universidad EAFIT

Harold Ardila
Presidente
Sociedad Colombiana de Ciencias Químicas

MYRIAM SÁNCHEZ DE GÓMEZ
Presidente Comité Científico
C2B2 – 2016

LUIS ALEJANDRO GÓMEZ RAMÍREZ
Presidente Comité Organizador
C2B2 - 2016

Anexo 3. Certificado de participación evento científico CLAIB 2016.



VII Congreso Latinoamericano de Ing. Biomédica

Octubre 26 - 28 de 2016
Bucaramanga, Colombia

CERTIFICADO DE AUTOR PARTICIPANTE EN CLAIB 2016

El suscrito Presidente de la Asociación Colombiana de Ingeniería Biomédica ABIOIN, se permite certificar que **Jennifer Zapata Giraldo** asistió al VII Congreso Latinoamericano de Ingeniería Biomédica, realizado en la ciudad de Bucaramanga desde el día 26 hasta el día 28 de octubre del 2016.

Participó como ponente del siguiente trabajo:

Trabajo	Autores
Characterization of silver nanoparticles for potential use as antimicrobial agent. (ID. 103)	Jennifer Zapata-Giraldo, Pedro Mena, Beatriz Galeano, Nelson Escobar, Monica Liliana Mejia, Isabel Ortiz, Diana Cuesta, Luz Elena Botero and Lina Marcela Hoyos-Palacio..

Se expide a solicitud del interesado, a los 28 días del mes de octubre del 2016.



ISNARDO TORRES RIVERA
Presidente, CLAIB 2016

Capítulo Santander, Personería Jurídica No. 139, Marzo 14 de 1994
Registro Cámara de Comercio 05-506758-37 Agosto 22 de 2006
Administración de Impuestos Nacionales NIT. 900.101.735

Cr. 26 # 89-40 Diamante II
Tel. 57-7-6950385 Cel. 57-315 726 7665
presidencia.nacional@abioin.com
www.abioin.com

Anexo 4. Certificado de participación evento científico ECS 2016.



La Escuela de Ciencias de la Salud y la Clínica Universitaria Bolivariana
Certifican que:

La investigación titulada:

"Caracterización fisico-química y efecto antimicrobiano de nanopartículas de plata sintetizadas químicamente"

Autores: Jenniffer Zapata Giraldo, Lina Hoyos, Luz Elena Botero, Pedro Mena, Beatriz Galeano, Nelson Escobar, Mónica Mejía, Isabel Ortiz, Diana Cuesta; fue presentada por la investigadora Luz Elena Botero, en la categoría de ponencia oral, en el:

IV Simposio de Investigación Escuela de Ciencias de la Salud y Clínica Universitaria Bolivariana, UPB 2016
"Comparte tu conocimiento"

Intensidad 11 horas

Realizado en: Medellín, 16 de noviembre de 2016


MÓNICA URIBE RÍOS
Decana
Escuela de Ciencias de la Salud


VÍCTOR ALEJANDRO ACEVEDO URREGO
Coordinador Docencia e Investigación
Clínica Universitaria Bolivariana


ZULMA VANESSA RUEDA VALLEJO
Coordinadora de Investigación
Escuela de Ciencias de la Salud

CONF

Anexo 5. Artículo de revisión sometido a la revista EIA.



[INICIO PORTAL](#) [INICIO](#) [ACERCA DE](#) [ÁREA PERSONAL](#) [CATEGORÍAS](#) [BUSCAR](#) [ACTUAL](#) [ARCHIVOS](#) [AVISOS](#) [ESTADÍSTICAS](#)

Inicio > Usuario/a > Autor/a > **Envíos activos**

Envíos activos

ACTIVO/A **ARCHIVAR**

ID.	AAAA-MM-DD ENVIAR	SECC	AUTORES/AS	TÍTULO	ESTADO
1166	2017-10-03	art.	Zapata Giraldo, Botero Palacio, Mejía...	TEXTILES FUNCIONALES COMO BARRERA DE PROTECCIÓN ANTE...	Asignación en espera

EMPEZAR UN NUEVO ENVÍO
HAGA CLIC AQUÍ para ir al primer paso del proceso de envío en cinco pasos.

ENLACES REFBACK

TODOS **NUEVO** **PUBLICADO** **OMITIDOS**

FECHA DE CREACIÓN	VISITAS	URL	ARTÍCULO	TÍTULO	ESTADO	ACCIÓN
<i>No hay ningún enlace refeedback.</i>						

Publicar **Omitir** **Eliminar** **Seleccionar todo**

CÓDIGO QR



PALABRAS CLAVE

QCM RCPSP TOFD
agua residual algoritmo
genético almidón de yuca
biorremediación
combinatorial
optimization
elementos finitos
ingeniería de tejidos
logística modelación
optimización
piezoelectricity quartz
crystal microbalance
redes neuronales
simulación sol-gel supply
chain traceability
trazabilidad

CONFID