

Síntesis de Nanopartículas de Oro Isotrópicas y Anisotrópicas con Potencial Actividad
Antibacteriana

María Alejandra Guerrero Amado

Trabajo de Grado para Optar el título de Química

Director

John Jairo Castillo León

Doctor en Química

Codirector

Jorge Andrés Gutiérrez Cifuentes

Doctor en Ciencias Químicas

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2019

Agradecimientos

A Dios, quien ha sido mi guía y mi fortaleza, enseñándome que con los sueños y metas si se pueden cumplir.

A mis padres Luz Ángela Amado y Víctor Guerrero, por los valores inculcados, por el apoyo, por los consejos y el amor brindado todos estos años de forma incondicional, que me motivan constantemente en el cumplimiento de mis metas. Gracias padres por todo el sacrificio que hacen y siguen haciendo por nuestra familia.

A mi hermano Luis Manuel Guerrero, que desde pequeño me ha enseñado a perseguir mis sueños, alentándome y apoyándome para nunca desfallecer y rendirme ante situaciones imprevistas, además por contagiarme con su alegría, entusiasmo y amor. También a toda mi familia (abuelo, abuelas, tías y primos) por el apoyo y la compañía durante toda mi vida.

Al grupo de investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM) por brindarme la oportunidad de ser parte y permitirme elaborar mi proyecto de grado en su laboratorio, a cada uno de los profesores, estudiantes de posgrado y pregrado por todo el apoyo y alegrías vividas.

A mi director John Jairo Castillo por los aportes brindados en la realización de mi proyecto de grado.

A mi co-director Jorge Gutiérrez por ser siempre fuente de motivación, por todas las enseñanzas, apoyo y paciencia en la realización de este proyecto, que me ayudaron a crecer como persona y profesional.

A Jennifer Ruiz por el apoyo y orientación brindada en el desarrollo y finalización mi proyecto.

Al profesor Sergio Blanco por la orientación, motivación y enseñanzas otorgadas durante el desarrollo de mi proyecto de grado.

A mis amigas con las que emprendí este largo viaje Laura Díaz, Paula Uribe, Lizeth Pabón y Laura González, por todos los consejos, apoyo, tiempo y compañía que hicieron que este proceso estuviera acompañado de grandes alegrías y momentos únicos.

A mis queridas tutus Silvia Caballero, Lady Quintero y Dayana Rojas, y Paula Guarín por tantos momentos compartidos, llenos de alegría y motivación.

A Yesica Bautista, Natalia Riaño, Karol Mantilla y Daniel Cancino que me enseñaron que la vida siempre te pone personas en los momentos menos esperados con el fin de brindar apoyo, alegrías, sonrisas y gratos momentos que siempre llevaré en mi corazón.

A Alejandra Parada, Yesica Hernández, Olga Cárdenas, Juliana Leal, Víctor Jiménez y muchos otros, que caminaron a mi lado por tantos años, brindándome su valiosa amistad, tiempo, dedicación y comprensión que me hacen crecer como ser humano y me enseñan a valorar los pequeños momentos vividos.

Al laboratorio de Fisicoquímica por toda la colaboración brindada mientras realizaba mi proyecto de grado.

A todos ustedes y a las personas que en algún momento conocí les agradezco de todo corazón el apoyo brindado durante toda esta etapa.

Tabla de Contenido

	Página
Introducción.....	18
1. Objetivos.....	21
1.1 Objetivo General.....	21
1.2 Objetivos Específicos	21
2. Marco Teórico.....	22
2.1 Nanotecnología y Nanomateriales	22
2.2 Métodos de Síntesis	26
2.2.1 Micelas Inversas (MIs)	30
2.3 Técnicas Instrumentales.....	33
2.3.1 Espectroscopia ultravioleta visible	33
2.3.2 Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR)	33
2.3.3 Dispersión dinámica de luz (DLS).....	34
2.3.4 Microscopía electrónica de transmisión (<i>TEM</i>).....	35
3. Estado del Arte.....	36
4. Metodología	42
4.1 Materiales y Reactivos.....	43
4.2 Síntesis de Nanopartículas Mediante Micelas Inversas	43
4.2.1 Micelas inversas usando surfactante aniónico en solventes no polares.....	43

4.2.2	Micelas inversas usando surfactante catiónico en solventes no polares.....	45
4.3	Caracterización Físicoquímica de Nanopartículas de Oro.....	46
4.3.1	Espectroscopia Ultravioleta Visible.....	46
4.3.2	Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR)	47
4.3.3	Dispersión dinámica de Luz (DLS)	47
4.3.4	Microscopia Electrónica de transmisión (TEM).....	47
4.3.5	Microscopia Electrónica de Barrido para Transmisión (STEM).....	48
4.4	Transferencia de fase de las AuNPs	48
4.5	Estudio de la Actividad Antibacterial de las AuNPs Sintetizadas.....	49
4.5.1	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	49
4.5.2	Telas con actividad antimicrobiana	50
5.	Resultados y Discusión.....	55
5.1	Caracterización de AuNPs Sintetizadas con Surfactante AOT	55
5.1.1	Micelas Inversas de AuNPs en Tol/AOT y Tol:Hx/AOT.....	56
5.2	Caracterización de AuNPs Sintetizadas con Surfactante BHDC.....	64
5.2.1	Micelas Inversas de AuNPs en Tol/BHDC y Tol:Hx/BHDC.....	64
5.3	Estudios Antibacterianos de las AuNPs sintetizadas.....	74
5.3.1	Actividad antimicrobiana.....	74
5.3.2	Caracterización de las telas soportadas con AuNPs	75

5.3.3 Evaluación de la inhibición del crecimiento planctónico y la adhesión a superficie en cepas bacterianas	78
6. Conclusiones.....	83
7. Recomendaciones	85
8. Divulgación de Resultados	86
Referencias Bibliográficas.....	88
Apéndices	99

Lista de Figuras

<i>Figura 1.</i> Escala de tamaños. (Adaptado de: Takeuchi, 2010).....	23
<i>Figura 2.</i> Métodos generales de síntesis de nanopartículas.	27
<i>Figura 3.</i> Representación simplificada de estructuras organizadas en diferentes medios. (Adaptado de: Nudelman, 2004).	29
<i>Figura 4.</i> Representación de las regiones de las micelas inversas.	30
<i>Figura 5.</i> Estructura molecular del AOT y BHDC.	32
<i>Figura 6.</i> Representación de la metodología (I) convencional (morfología isotrópica) y (II) convencional modificada (morfología anisotrópica) para la síntesis de nanopartículas de oro a través de micelas inversas.....	46
<i>Figura 7.</i> Procedimiento de transferencia de fase.	49
<i>Figura 8.</i> Telas impregnadas con nanopartículas de oro.....	51
<i>Figura 9.</i> Esquema general para la evaluación cuantitativa de actividad antimicrobiana en telas con AuNPs.....	54
<i>Figura 10.</i> Nanopartículas de oro sintetizadas en micelas inversas de (a) Tol/AOT, (b) Tol:Hx/AOT, (c) Tol/BHDC y (d) Tol:Hx/BHDC a $W_s=7$	55
<i>Figura 11.</i> Espectro UV-Vis de AuNPs sintetizadas en micelas inversas de: (a) Tol/AOT (b) Tol:Hx/AOT.	56

- Figura 12.* Diámetro hidrodinámico e histograma de medidas de AuNPs obtenidas por medio de Micelas Inversas de: (a) Tol/AOT (b) Tol:Hx/AOT. 59
- Figura 13.* Espectro infrarrojo del estiramiento del carbonilo C=O y estiramiento asimétrico y simétrico del SO₃⁻ para los sistemas (a) AuNps Tol/AOT (línea naranja) y blanco de Tol/AOT (línea negra) (b) AuNps Tol:Hx/AOT (línea roja) y blanco de Tol:Hx/AOT (línea negra). 61
- Figura 14.* Micrografías TEM de AuNPs obtenidas a través de Micelas Inversas de: (a) Tol/AOT (b) Tol:Hx/AOT a Ws= 7. 63
- Figura 15.* Espectros de UV-Vis de: (a) AuNPs formadas por metodología de Sistema A + Sistema B + Sistema C de Tol/BHDC. (b) Espectro final después de 2 minutos. (c) AuNPs formadas por metodología convencional de Sistema A + Sistema B de Tol:Hx/BHDC. 65
- Figura 16.* Diámetro hidrodinámico e Histograma de medidas de AuNPs obtenidas por medio de Micelas Inversas de: (a) Tol/BHDC (b) Tol:Hx/BHDC. 68
- Figura 17.* Espectro Infrarrojo del estiramiento asimétrico, simétrico y flexión del N⁺-CH₃ para los sistemas (a) AuNps Tol/BHDC (línea verde) y blanco de Tol/BHDC (línea negra) (b) AuNps Tol:Hx/BHDC (línea azul) y blanco de Tol:Hx/BHDC. 70
- Figura 18.* Micrografías STEM y TEM de AuNPs obtenidas a través de Micelas Inversas de: (a) Tol/BHDC (b) Tol:Hx/BHDC, respectivamente a Ws= 7. 72
- Figura 19.* Espectro UV-Vis de las telas recubiertas con AuNPs sintetizadas por micelas inversas de (a)Tol:Hx/AOT, (b)Tol/BHDC y (c) Tol:Hx/BHDC. 76
- Figura 20.* Micrografía SEM de telas (a) sin NPs y (b) con AuNPs. 77

Figura 21. Inhibición del crecimiento bacteriano sobre telas con recubrimiento de AuNPs sintetizadas en Tol:Hx/BHDC frente a cepas (a) *S. aureus* ATCC. (b) SARM. 81

Figura 22. Micrografía SEM de telas impregnadas con AuNPs después de evaluar la actividad antibacteriana de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213..... 81

Lista de Tablas

Tabla 1. <i>Efecto antibacteriano en Staphylococcus aureus (S. aureus), Escherichia coli (E. coli), Klebsiella pneumonia (K. pneumonia) y Bacillus subtilis (B. subtilis) para dosis bajas, medias y altas de nanopartículas de oro (NPs) de dos tamaños, nombradas como muestra G1 y G2.....</i>	41
Tabla 2. <i>Procedimiento de Análisis para la Evaluación Cualitativa de la Inhibición del Crecimiento Plantónico y la Adhesión a Superficie.....</i>	52
Tabla 3. <i>Datos obtenidos por DLS de las AuNPs en Tol/AOT y Tol:Hx/AOT a una relación molar de $W_s=7$.....</i>	58
Tabla 4. <i>Datos obtenidos por DLS de las AuNPs en Tol/BHDC y Tol:Hx/BHDC a una relación molar de $W_s=7$.....</i>	67
Tabla 5. <i>Valores de potencial zeta de las AuNPs obtenidas en cada uno de los sistemas micelares.....</i>	73
Tabla 6. <i>Resultados CMI50 y CMI90 para las nanopartículas sintetizadas frente a S. aureus ATCC 29213 y SARM.....</i>	74
Tabla 7. <i>Resultados de las muestras recubiertas con AuNPs y su correspondiente control.....</i>	78
Tabla 8. <i>Reducción logarítmica del crecimiento de las cepas bacterianas adheridas a las telas con recubrimiento de AuNPs.....</i>	79

Lista de Apéndices

“Ver apéndices adjuntos en CD y puede visualizarse en base de datos de la biblioteca”

Apéndice A. Espectro UV-Vis de micelas inversas de Tol/AOT a relaciones molares $W_s=3, 5$ y 7 .	99
Apéndice B. Espectro UV-Vis de micelas inversas de Tol:Hx/AOT a relaciones molares $W_s=3, 5$ y 7 .	99
Apéndice C. Espectro UV-Vis de micelas inversas de Tol /BHDC a relaciones molares $W_s=3, 5$ y 7 .	100
Apéndice D. Espectro UV-Vis de micelas inversas de Tol:Hx/BDC a relaciones molares $W_s=3, 5$ y 7 .	100
Apéndice E. (a) Cinética de crecimiento de <i>S. aureus</i> ATCC 29213 tratado con AuNPs, (b) Porcentaje de inhibición de AuNPs sobre el crecimiento de <i>S. aureus</i> ATCC 29213 y (c) Porcentaje de inhibición y viabilidad de las AuNPs a diferentes concentraciones (AuNPs sintetizadas mediante Tol/AOT).	101
Apéndice F. (a) Cinética de crecimiento de <i>S. aureus</i> ATCC 29213 tratado con AuNPs, (b) Porcentaje de inhibición de AuNPs sobre el crecimiento de <i>S. aureus</i> ATCC 29213 y (c) Porcentaje de inhibición y viabilidad de las AuNPs a diferentes concentraciones (AuNPs sintetizada mediante Tol:Hx/AOT).	102
Apéndice G. (a) Cinética de crecimiento de <i>S. aureus</i> ATCC 29213 tratado con AuNPs, (b) Porcentaje de inhibición de AuNPs sobre el crecimiento de <i>S. aureus</i> ATCC 29213 y (c)	

Porcentaje de inhibición y viabilidad de las AuNPs a diferentes concentraciones (AuNPs sintetizada mediante Tol/BHDC).....	104
Apéndice H. (a) Cinética de crecimiento de <i>S. aureus</i> ATCC 29213 tratado con AuNPs, (b) Porcentaje de inhibición de AuNPs sobre el crecimiento de <i>S. aureus</i> ATCC 29213 y (c) Porcentaje de inhibición y viabilidad de las AuNPs a diferentes concentraciones (AuNPs sintetizada mediante Tol:Hx/BHDC).....	105
Apéndice I. (a) Cinética de crecimiento de <i>SARM</i> tratado con AuNPs, (b) Porcentaje de inhibición de AuNPs sobre el crecimiento de <i>SARM</i> y (c) Porcentaje de inhibición y viabilidad de las AuNPs a diferentes concentraciones (AuNPs sintetizadas mediante Tol/AOT).	106
Apéndice J. (a) Cinética de crecimiento de <i>SARM</i> tratado con AuNPs, (b) Porcentaje de inhibición de AuNPs sobre el crecimiento de <i>SARM</i> y (c) Porcentaje de inhibición y viabilidad de las AuNPs a diferentes concentraciones (AuNPs sintetizadas mediante Tol:Hx/AOT).	108
Apéndice K. (a) Cinética de crecimiento de <i>SARM</i> tratado con AuNPs, (b) Porcentaje de inhibición de AuNPs sobre el crecimiento de <i>SARM</i> y (c) Porcentaje de inhibición y viabilidad de las AuNPs a diferentes concentraciones (AuNPs sintetizadas mediante Tol /BHDC).....	109
Apéndice L. (a) Cinética de crecimiento de <i>SARM</i> tratado con AuNPs, (b) Porcentaje de inhibición de AuNPs sobre el crecimiento de <i>SARM</i> y (c) Porcentaje de inhibición y	

viabilidad de las AuNPs a diferentes concentraciones (AuNPs sintetizadas mediante Tol:Hx/BHDC).	110
Apéndice M. Resultados de actividad antimicrobiana cualitativa en telas de los diferentes recubrimientos frente a <i>S. aureus</i> ATCC 29213	111
Apéndice N. Resultados de actividad antimicrobiana cualitativa en telas de los diferentes recubrimientos Frente a SARM	112

Resumen

TÍTULO: SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO ISOTRÓPICAS Y ANISOTRÓPICAS CON POTENCIAL ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA*

AUTOR: María Alejandra Guerrero Amado**

PALABRAS CLAVE: Nanopartículas de oro, micelas inversas, surfactante aniónico, surfactante catiónico, actividad antimicrobiana.

DESCRIPCIÓN:

En la actualidad, la nanotecnología es un gran desafío de vital importancia en medicina y atención médica, que enfrenta problemas producidos por microorganismos patógenos resistentes a los antibióticos convencionales. Asimismo, involucra la transformación a escala nanométrica de las propiedades físicas y químicas de algunos metales nobles como el oro (Au), que presentan efecto fototérmico y actividad antimicrobiana inclusive al depositarse en textiles convencionales para el tratamiento de múltiples enfermedades. Las nanopartículas (NPs) pueden ser sintetizadas utilizando diversas metodologías, que incluyen el uso de sistemas coloidales en medios de reacción confinados como las micelas inversas (MIs), las cuales garantizan estabilidad termodinámica, alta capacidad de solubilización, tamaño y morfología específica a escala nanométrica, que permiten potencializar sus propiedades en aplicaciones biomédicas. En este sentido, se sintetizaron nanopartículas de oro (AuNPs) empleando MIs de solvente orgánico/AOT (1,4-bis-2-etilhexilsulfosuccinato de sodio) y solvente orgánico/BHDC (Cloruro de bencil dimetil-N-hexadecil amonio). Las AuNPs obtenidas fueron caracterizadas y analizadas por técnicas espectroscópicas, microscópicas y de dispersión, y depositadas en telas para ensayos antimicrobianos. Los resultados mostraron AuNPs de morfología isotrópica y anisotrópica con geometrías tipo esférico, elipsoidal, triangular y pentágono con tamaños aproximados a 10 y 40 nm. Finalmente, en los estudios cualitativos y cuantitativos para la actividad antimicrobiana de las AuNPs soportadas en telas convencionales, y evaluadas frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y SARM, se obtuvieron resultados de la inhibición del crecimiento bacteriano significativos para las AuNPs sintetizadas mediante MIs de solvente orgánico/BHDC, postulándolas como alternativas para el desarrollo de vendajes, textiles o materiales para terapias antibacterianas.

* Proyecto de grado

** Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Director: John Jairo Castillo León, Químico, Doctor en Química. Co-directores: Jorge Andrés Gutiérrez Cifuentes, Doctor en Ciencias Químicas

Abstract

TITLE: SYNTHESIS OF ISOTROPIC AND ANISOTROPIC GOLD NANOPARTICLES WITH POTENTIAL ANTIBACTERIAL ACTIVITY*

AUTHOR: María Alejandra Guerrero Amado**

KEY WORDS: Gold nanoparticles, reverse micelles, anionic surfactant, cationic surfactant, antimicrobial activity.

DESCRIPTION:

Nowadays, the nanotechnology is a big challenge of vital importance in medicine and healthcare, facing issues produced by pathogenic microorganisms resistant to conventional antibiotics. Nanotechnology involves the transformation on a nanometric scale of the physical and chemical properties of some noble metals such as gold (Au), which have a photothermal effect and antimicrobial activity even when deposited in conventional textiles for the treatment of multiple diseases. The nanoparticles (NPs) can be synthesized using various methodologies, including the use of colloidal systems in reaction media confined as reverse micelles (RMs), which ensure thermodynamic stability, high solubilizing capacity, size and specific morphology nanoscale, which allow to enhance its properties in biomedical applications. In this sense, gold nanoparticles (AuNPs) were synthesized using RMs of organic solvent / AOT (1,4-bis-2-ethylhexylsulfosuccinate) and organic solvent / BHDC (Benzyl dimethyl-N-hexadecyl ammonium chloride). The AuNPs obtained were characterized and analyzed by spectroscopic, microscopic and dispersion techniques, and deposited in fabrics for antimicrobial assays. The results showed AuNPs of isotropic and anisotropic morphology with spherical, ellipsoidal, triangular and pentagon type geometries with approximate sizes at 10 and 40 nm. Finally, qualitative and quantitative studies for the antimicrobial activity of AuNPs supported on conventional fabrics were performed, and evaluated against *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and SARM, significant bacterial growth inhibition results were obtained for AuNPs synthesized by RMs of organic solvent / BHDC, applying them as alternatives for the development of bandages, textiles or materials for antibacterial therapies.

* Bachelor Thesis

** Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Director: John Jairo Castillo León, Químico, Doctor en Química. Co-directores: Jorge Andrés Gutiérrez Cifuentes, Doctor en Ciencias Químicas

Introducción

La resistencia de los microorganismos patógenos a los antibióticos convencionales ha generado gran preocupación a nivel mundial, sobre todo por la aparición y propagación de nuevas infecciones causadas por virus, hongos, parásitos y bacterias multirresistentes, poniendo no solo en peligro la salud pública (World Health Organization, 2017), sino también de sanidad animal y del medio ambiente. Provocando un mayor aporte económico por parte del gobierno para garantizar la atención sanitaria de los pacientes infectados, empleando los recursos en hospitalización y atención médica especializada (Castillo *et al.*, 2012; World Health Organization, 2017).

Uno de los principales problemas a nivel mundial es la generación de infecciones de heridas en el periodo postoperatorio, puesto que causan enfermedades comunes como forunculosis, impétigo e incluso enfermedades graves como neumonía, septicemia, endocarditis (Castillo *et al.*, 2012; Olarte *et al.*, 2010). Estas enfermedades se le atribuyen al microorganismo *Staphylococcus aureus*, patógeno Gram-positivo que se encuentra presente en la mucosa de individuos sanos. Desde su aparición ha reportado resistencia a los fármacos en especial a la meticilina, antibiótico betalactámico que era usado en el tratamiento de infecciones provocadas por bacterias Gram-positivas productoras de betalactamasa (Fosch, Yones, Trossero, Grosso, & Nepote, 2012; Tarai, Das, & Kumar, 2013). Otros mecanismos usados para combatir estas enfermedades, ha sido el uso de péptidos antimicrobianos y nanopartículas de oro de tamaños de 25 nm, que presentan limitaciones por toxicidad y gran cantidad de uso que van de 50 a 200 µg/mL (Mohamed, Fouad, Elshoky, Mohammed, & Salaheldin, 2017) que al igual que muchos antibióticos necesitan grandes concentraciones para producir un efecto significativo en

los pacientes; aunque se calcula que los portadores con infecciones de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) presentan una mortalidad mayor al 64 % frente a los pacientes con infecciones no resistentes.

Por otra parte, las infecciones adquiridas de dicho patógeno provienen comúnmente de hospitales, donde se tiene una tasa de colonización 25.8 % (182 pacientes) y 7.2 % resistentes a meticilina, pero en zonas de cuidados intensivos se puede obtener una colonización por SARM hasta de 9.1 % (Abante *et al.*, 2016; Fosch *et al.*, 2012; Tarai *et al.*, 2013), haciendo que sea una de las bacterias más estudiadas por su alta capacidad de colonización, crecimiento y diseminación. Además, un estudio realizado por el grupo para el estudio de la resistencia a los antibióticos en Medellín (GERMEN), reveló la resistencia a antibióticos por las principales bacterias como *E. coli* para salas de hospitalización con un 29.8% y en cuidados intensivos un 15.3 %, seguido de *S. aureus* con un 12.8 % (Londoño, Macias, & Ochoa, 2016; Montalvo, Huaroto, Alvarezcano, Ticona, & García, 2009).

El principal desafío que enfrenta la salud pública es la lucha constante contra nuevas patologías causadas por microorganismos, dando lugar a la búsqueda de nuevas estrategias efectivas a partir de la ciencia moderna, siendo la nanotecnología una de las más llamativas. En este sentido las nanopartículas (NPs) metálicas, se destacan ya que a escala nanométrica generan propiedades físicas y químicas únicas que difieren del comportamiento clásico. Particularmente, las nanopartículas de oro (Au) han generado mucha atención en los últimos años, debido a sus excelentes propiedades ópticas, catalíticas y electrónicas dependiendo de la forma y tamaño sintetizado, promoviendo su uso en varios campos, como espectroscopias mejoradas, aplicaciones biomédicas que incluyen administración de fármacos, bioetiquetado, biosensores, terapia fototérmica y tratamientos antibacterianos. Las AuNPs presentan relativamente pocos

estudios sobre sus propiedades antibacterianas en comparación con las investigaciones realizadas para las nanopartículas de plata como agentes antimicrobianos, que a tamaños inferiores a 10 nm exhiben un alto grado de citotoxicidad en células humanas (Gliga, Skoglund, Odnevall Wallinder, Fadeel, & Karlsson, 2014; Sun, Qiu, Liu, & Miao, 2009; Yen, Hsu, & Tsai, 2009), sugiriendo la formación de un nanocompuesto no tóxico, con alta capacidad de solubilización, estabilidad termodinámica y un tamaño específico. Esto es posible mediante el uso de sistemas coloidales o medios de reacción confinados como micelas inversas, para generar nanoestructuras de oro con diferentes tamaños y morfologías que interactúen de forma más eficiente con la pared celular de la bacteria, ocasionando lisis debido a las altas tensiones celulares o ruptura de la pared del microorganismo (Penders, Stolzoff, Hickey, Andersson, & Webster, 2017).

Por lo anterior, este trabajo se enfocó en la síntesis de nanopartículas de oro en el interior de micelas inversas de diferente naturaleza para la obtención de productos modulables en tamaño y morfología, con el fin de desarrollar y modificar textiles revestidos con nanopartículas que puedan aplicarse en prendas de vestir, vendajes medicinales e instrumentación quirúrgica y que sean capaces de actuar de manera efectiva en la inhibición de crecimiento bacteriano, y sobre cepas de *Staphyococcus aureus*.

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Sintetizar nanopartículas de oro de diferentes morfologías a partir de micelas inversas para evaluar su actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*.

1.2 Objetivos Específicos

Formar micelas inversas como nanoreactores moleculares de diferente composición con surfactantes aniónicos o catiónicos en diferentes solventes orgánicos.

Generar nanopartículas de oro menores a 10 nm con diferentes morfologías mediante micelas inversas.

Determinar las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas sintetizadas mediante técnicas espectroscópicas, microscópicas y de dispersión.

Estudiar el efecto antibacteriano de los nanocompuestos isotrópicos y anisotrópicos formados frente a *Staphylococcus aureus*.

2. Marco Teórico

2.1 Nanotecnología y Nanomateriales

Durante los últimos años la ciencia se ha encargado de investigar, estudiar y analizar nuevos fenómenos, herramientas y aplicaciones que contribuyen con el desarrollo industrial, tecnológico, ambiental, medicinal, entre otros. Permitiendo así, el desarrollo de campos “invisibles” o “microscópicos” que aluden a la visualización y manipulación de los átomos y moléculas, mediante el estudio de ciencias aplicadas como la nanociencia y la nanotecnología. El término nanociencia se puede definir como el estudio de procesos fundamentales (análisis de propiedades químicas, mecánicas, eléctricas, ópticas y magnéticas) que se generan especialmente en estructuras con tamaños entre 1 -100 nm, es decir, nanoestructuras. Por otro lado, la nanotecnología es el área de la investigación encargada del diseño y desarrollo de tecnologías a base de nanociencia (Andrada, 2012; Cao, 2004; Miller, Serrato, & Represas-Cardenas, Jose Miguel Kundahl, 2005; Takeuchi, 2010). Esto es debido a que los elementos a una escala nanométrica presentan un comportamiento diferente generado por el confinamiento de los electrones, variando propiedades fundamentales como la conductividad eléctrica, color, punto de fusión, entre otras, que son consideradas características constantes (Cao, 2004; Liu, 2006).

La nanotecnología se ocupa del diseño de estructuras o materiales a nivel atómico y molecular. La dimensión típica proviene del prefijo nano, que en latín es conocido como

“nanus”, (Takeuchi, 2010), que significa enano y en la actualidad hace referencia a lo nanométrico (nm), es decir, un nanómetro es igual a una milmillonésima parte del metro (10^{-9} m) que equivale a 10 átomos de hidrógeno dispuestos sobre una línea uno tras de otro. Por lo tanto, un átomo es más pequeño que un nanómetro, pero una molécula puede ser mayor, por ejemplo, un cabello humano que tiene un diámetro alrededor de 80000 nm o el diámetro de un glóbulo rojo que es aproximadamente de 3000 nm (Andrada, 2012; Galo, 2009). En la *Figura 1* se muestran algunos objetos con tamaños en esta escala.

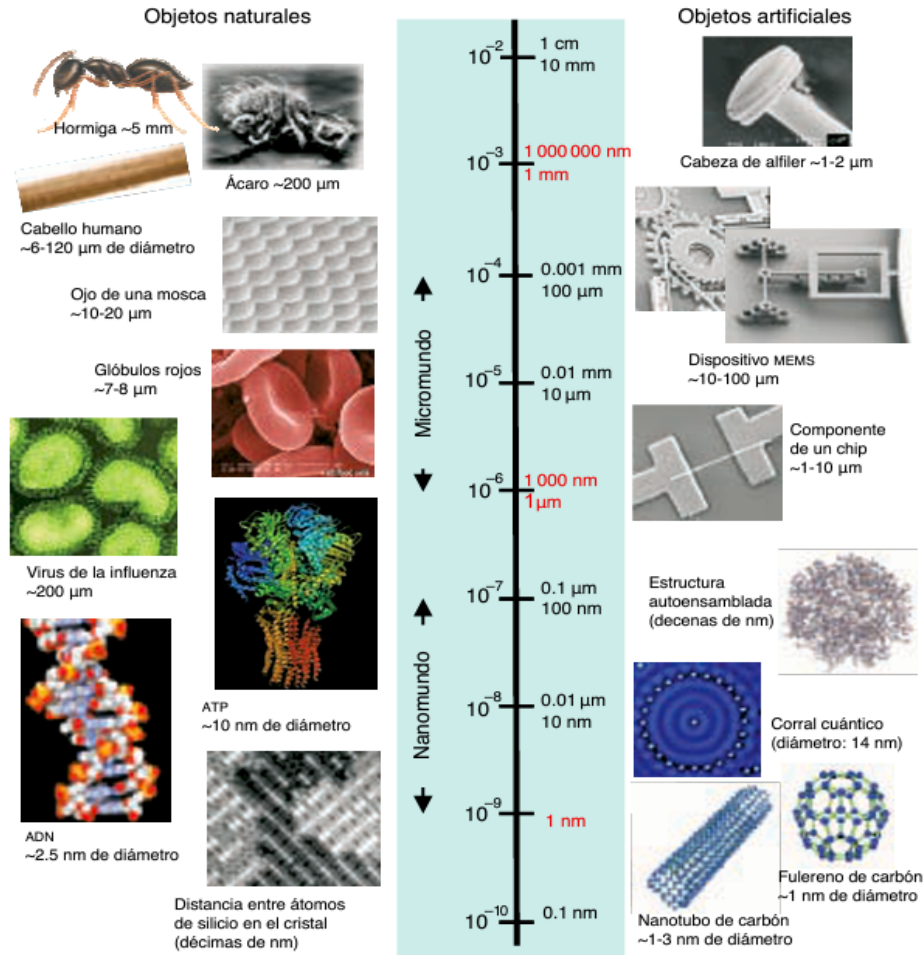


Figura 1. Escala de tamaños. (Adaptado de: Takeuchi, 2010)

En la edad media los artesanos decidieron mezclar oro o plata con vidrio y obtuvieron diferentes colores, que fueron usados en los vitrales de las iglesias, aunque ellos no sabían explicar este fenómeno, hoy se sabe que fue debido a la formación de pequeñas nanopartículas con diámetros menores a 100 nm (Takeuchi, 2010).

De acuerdo con la línea de tiempo, el concepto de nanotecnología se introdujo por primera vez por el físico Richard Feynman en 1959 en su discurso “*There's plenty of room at the bottom*” durante la reunión de la Sociedad Americana de Física (Feynman, 1960; Yadugiri & Malhotra, 2010), dando la posibilidad de manipular la materia a escala atómica. Pero fue, hasta 1974 cuando el profesor Norio Taniguchi mencionó su término para describir la precisión en la elaboración de materiales a escala nanométrica.

En los últimos años el desarrollo de los nanomateriales ha tenido un gran auge debido a las propiedades que surgen, puesto que un material en escalas reducidas cambia su conductividad, su óptica, su magnetismo y resistencia, que tienen una mayor relación área superficial / volumen de la partícula. Además, algunas propiedades de los nanomateriales también se pueden relacionar con una fracción de átomos y energías superficiales según el confinamiento espacial. Este último se da por la restricción de los electrones para moverse en una o más dimensiones espaciales o de cómo se encuentran ordenados los átomos en el interior del material (Cao, 2004; Galo, 2009; Miller *et al.*, 2005).

Algunos de los cambios en las propiedades físicas de los nanomateriales se pueden dar en la disminución significativa de su punto de fusión o temperatura de transición de fase, debido a una

enorme fracción de átomos superficiales. De igual manera, la conducción de electrones cambia con el tamaño, puesto que al reducir un material su conductividad eléctrica disminuye por un aumento en la dispersión de los electrones en la superficie. Sin embargo, en muchos nanomateriales se puede aumentar significativamente la conducción de electrones por un ordenamiento en su estructura. Por otra parte, las propiedades ópticas de los nanomateriales son diferentes de cristales a granel. Por ejemplo, en una nanopartícula semiconductor, la banda de absorción óptica se desplaza a una longitud de onda corta, ya que la banda prohibida conocida como “*band gap*” en un nanomaterial es mayor y, por ende, se requiere una mayor energía para pasar los electrones de la banda de valencia a la de conducción. No obstante, en nanopartículas metálicas el color cambia con el tamaño de las mismas, debido a la resonancia del plasmón superficial (RPS) y no a un proceso de absorción, la RPS consiste en una oscilación colectiva de los electrones de conducción a una energía específica cuando interactúan con la radiación electromagnética (Andrada, 2012; Cao, 2004; Galo, 2009).

Uno de los avances más significativos de la nanociencia ha sido el desarrollo de nanopartículas de diferentes materiales tales como, cerámica, polímeros, metales nobles y semiconductores. Estas poseen propiedades eléctricas, químicas, estructurales y magnéticas modulables con su volumen. Además, es posible controlar el método de síntesis dependiendo en gran medida de la aplicación que se quiera implementar. Una de las aplicaciones más frecuentes para las nanopartículas son las biocatalíticas como consecuencia de la gran actividad química y a la capacidad de modificar fácilmente su superficie (Devi *et al.*, 2019). Las nanopartículas poliméricas, presentan un sistema de nanocápsulas y nanoesferas que contribuyen fundamentalmente a la administración de fármacos debido a su tamaño subcelular y

biocompatibilidad, que permiten la liberación controlada y sostenida de medicamentos. De igual forma, las nanopartículas cerámicas son ampliamente usadas como portadores o vehículos de fármacos como resultado de sus propiedades fisicoquímicas de alta resistencia al calor, tamaño y porosidad (Jeevanandam, Aing, Chan, Pan, & Danquah, 2017; Moreno-Vega, Gómez-Quintero, Nuñez-Anita, Acosta-Torres, & Castaño, 2012; Thomas, Harshita, Mishra, & Talegaonkar, 2015). Los semiconductores por sus propiedades ópticas y electrónicas presentan múltiples estudios y aplicaciones como nanoelectrónica, catálisis o conversión de energía, descomposición de contaminantes orgánicos, desarrollo de energías limpias, sensores, biosensores, entre otros (Juárez, 2011). Por último, la nanopartículas metálicas como el oro, cobre, platino, plata, paladio, rutenio, etc., han generado gran interés en las aplicaciones biomédicas, ya que pueden actuar como agentes antimicrobianos con un alto potencial en la liberación dirigida y controlada de fármacos sobre un órgano específico con solo cambiar su tamaño a nivel nanométrico, mejorando así sus propiedades ópticas, electrónicas y catalíticas (Brust, Walker, Bethell, Schiffrin, & Whyman, 1994; Devi *et al.*, 2019; Poole & Owens, 2007).

2.2 Métodos de Síntesis

Existen dos vías generales para la generación de nanopartículas y nanomateriales, “*top-down*” o síntesis de arriba hacia abajo y “*bottom-up*” o síntesis de abajo hacia arriba. La primera se desarrolla mediante métodos físicos como la molienda o el grabado. Esta última ocasiona la ruptura de un sólido macizo con instrumentos tales como láseres que irradian dicho sólido produciendo nanomateriales anisotrópicos a escala nanométrica, por lo que esta técnica, usada convencionalmente en litografía, puede causar daños cristalográficos significativos e introducir

defectos que afectan estructuralmente la superficie. No obstante, la técnica *top-down* ofrece confiabilidad y producción masiva de nanoestructuras que permiten la fabricación de dispositivos complejos aun cuando se requiere un gasto significativo de energía y la generación de residuos contaminantes (Andrada, 2012).

Por otra parte, la metodología *bottom-up*, que es la más usada en la síntesis de nanopartículas, consiste en la fabricación de nanomateriales a partir de compuestos más pequeños (átomo por átomo o molécula por molécula) con control termodinámico y de nucleación. Esta técnica, está impulsada principalmente por la reducción de la energía libre de Gibbs, de modo que las nanoestructuras y nanomateriales producidos se encuentran en un estado más cercano a un estado de equilibrio termodinámico (Cao, 2004). Esta vía de síntesis se desarrolla a través de reacciones químicas de reducción, deposición química de vapor y agregación coloidal (Liu, 2006; Yadugiri & Malhotra, 2010) (véase *Figura 2*).

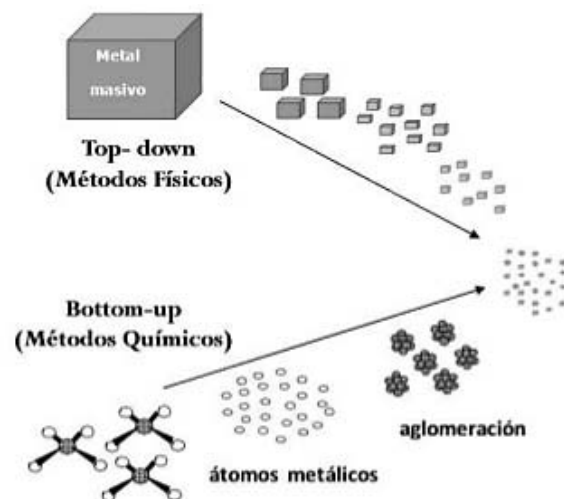


Figura 2. Métodos generales de síntesis de nanopartículas.

La técnica *bottom-up*, presenta diversos métodos químicos que utilizan reactivos en disolución para la síntesis de nanopartículas. Donde existen ciertos métodos que dependen del volumen efectivo en el que tiene lugar la reacción como: a) método sol-gel e hidrotermal, que tiene un volumen ilimitado para obtener una precipitación homogénea. b) emulsiones y aerosoles con restricción a pequeños volúmenes. Las emulsiones son dispersiones de un líquido inmiscible en otro líquido, constituido por dos fases la dispersa (acuosa) y la fase continua (oleosa) usadas ampliamente en la fabricación de nanoestructuras. Sin embargo, una emulsión es inestable por su propia naturaleza, por lo que es necesario introducir en el medio dos tipos de sustancias, ya sea, un tensoactivo o surfactante y/o un espesante. Dependiendo del tamaño de la fase dispersa las emulsiones pueden distinguirse como microemulsión o nanoemulsión (Padua & Wang, 2012).

Las microemulsiones son sistemas micro-heterogéneos, que a simple vista presentan una sola fase, siendo consideradas como soluciones homogéneas por ser traslucidas en escala macroscópica. Es preciso mencionar, que los sistemas micro-heterogéneos son termodinámicamente estables e isotrópicos (Nudelman, 2004). Por el contrario, las nanoemulsiones son sistemas que no se encuentran en equilibrio termodinámico y que tienen tendencia espontánea a separarse de las fases que lo conforman. Sin embargo, pueden poseer una estabilidad en suspensión relativamente alta debido a que son emulsiones de tamaño nanométrico y tiene la capacidad de estabilizarse con una reducida cantidad de emulsionantes o surfactantes que disminuyen la tensión interfacial y le permiten tener un aspecto traslucido como las microemulsiones (Gutiérrez *et al.*, 2008; Padua & Wang, 2012).

Por lo anterior, las nanoemulsiones permite la preparación de nanopartículas del tamaño deseado y de forma controlada empleando surfactantes aniónicos, catiónicos o anfóteros. Estas moléculas se componen de una parte polar y no polar. La parte polar conocida como cabeza hidrofílica contiene heteroátomos (O, S, N Y P) unidos a grupos funcionales como alcohol, éster, tiol, éter, amida y aminas; la cola que se caracteriza por ser no polar, es decir, hidrofóbica, generalmente es un hidrocarburo alifático o aromático. Los surfactantes pueden compatibilizar con compuestos polares y no polares permitiendo la formación de soluciones en una sola fase, garantizando una autoagregación espontánea y así un sistema homogéneo, que al ser expuestas en disolventes orgánicos tanto polares como no polares forman micelas inversas, micelas directas, liposomas, vesículas, entre otras como se observa en la *Figura 3*.

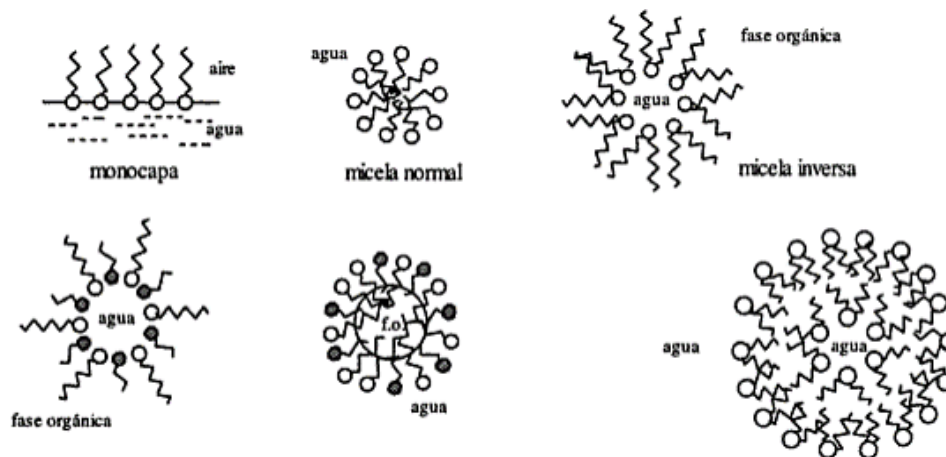


Figura 3. Representación simplificada de estructuras organizadas en diferentes medios. (Adaptado de: Nudelman, 2004).

2.2.1 Micelas Inversas (MIs). Las micelas son agregados moleculares (Nudelman, 2004), que poseen un ordenamiento de las moléculas del surfactante en el medio, de tal forma que los grupos polares se orientan hacia el interior, mientras que los no polares hacia afuera donde se encuentra el solvente orgánico de baja polaridad. Las micelas inversas constan de tres regiones: una microfase acuosa interna denominada corazón polar; la interfaz (región en donde se ubican los grupos cabezas polares y contraiones del surfactante) y la fase orgánica externa (solvente no polar) (véase Figura 4) (Harris, Gaster, & Gelabert, 2019; Nudelman, 2004). La formación de estos agregados moleculares se caracteriza por ser isotrópicos, es decir, poseen estructuras de forma homogénea. Pero a la vez son sistemas versátiles que permiten modificar la cristalización de los nanocompuestos, dando como resultado estructuras isotrópicas o anisotrópicas (Cushing, Kolesnichenko, & Connor, 2004; Yin & Alivisatos, 2005).

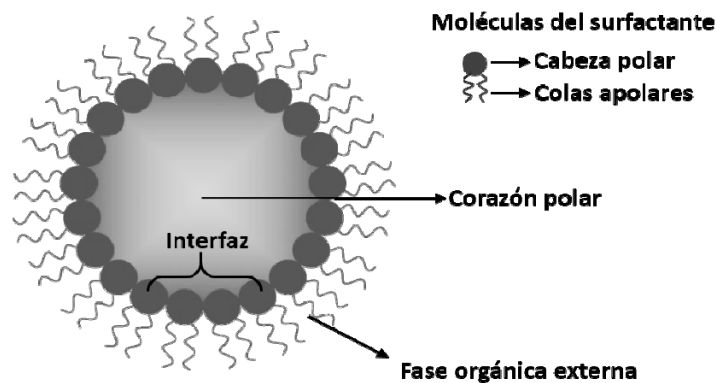


Figura 4. Representación de las regiones de las micelas inversas.

La formación de micelas es una asociación cooperativa donde a partir de una concentración micelar crítica las moléculas del surfactante se agregan para formar un sistema organizado.

Además, pueden encapsular diferentes cantidades de precursores según su relación molar: precursor disuelto en agua / surfactante, definido como W_0 .

$$W_0 = \frac{[Agua]}{[Surfactante]} \quad (1)$$

Los principales estudios de las micelas inversas se ven impulsados por el tamaño de la cavidad interior y la curvatura de la interfaz micelar, puesto que son factores influyentes en la reactividad de estos sistemas, los cuales controlan variables como las concentraciones de reactivos, es decir, la ubicación de estos dentro de la cavidad, el tamaño y forma de nanocompuestos que puedan ser sintetizados en su interior. Por ello, los nanoreactores son sistemas de vital importancia para la síntesis y desarrollo de nanoestructuras con propiedades químicas y físicas únicas, de gran interés en las aplicaciones químicas y biológicas (Correa *et al.*, 2004; Moilanen, Levinger, Spry, & Fayer, 2007).

En los últimos años los surfactantes aniónicos y catiónicos más usados para la formación de MIs tanto en presencia como ausencia de cosurfactantes son el 1,4-bis-2 etilhexilsulfosuccinato de sodio (AOT) y cloruro de bencil-n-hexadecildimetilamonio (BHDC), respectivamente, los cuales se representan en la *Figura 5*.

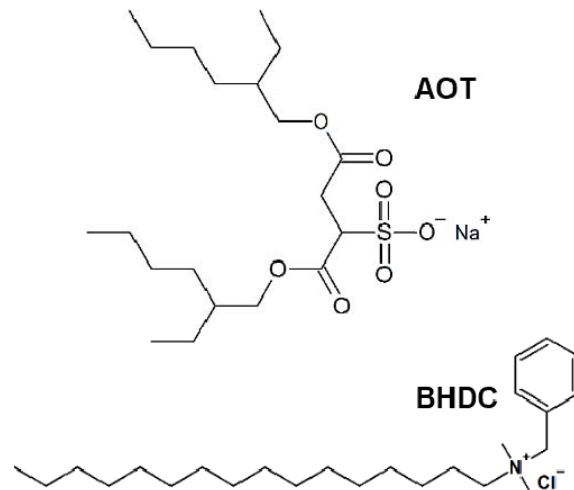


Figura 5. Estructura molecular del AOT y BHDC.

El AOT es un surfactante capaz de formar micelas inversas en diferentes medios no polares. Su estructura le da propiedades especiales sobre todo por presentar una cadena carbonada que confiere solubilidad en la fase acuosa, a temperatura ambiente, además, tiene la capacidad de solubilizar una alta cantidad de agua con valores de $W_0=40-60$ según el medio no polar en el que se encuentre (Blach & Martínez, 2017; Correa *et al.*, 2004; Gutierrez, Luna, Correa, Silber, & Darío Falcone, 2015; Nudelman, 2004). Las micelas inversas formadas con AOT son esféricas, ideales para exhibir efectos de confinamiento tridimensionales (Harris *et al.*, 2019; Silva, Correa, Silber, De Rossi, & Fernández, 2014). Al ser un surfactante no tóxico, es usado en preparaciones farmacológicas y biológicas. Las micelas inversas formadas por BHDC en comparación al AOT solo pueden solubilizar el agua hasta un $W_0=20$, según su solvente externo. En estas MIs las propiedades interfaciales se comparten de manera similar a la de otros nanoreactores inversos, debido a que el agua ubicada en el corazón polar del BHDC, muestra sus propiedades características del agua en masa, solo cuando se alcanza una cantidad de agua

mayor a la necesaria para la solvatación del surfactante (Correa *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2014). Por lo tanto, las propiedades del agua son diferentes al ser encapsulas en un sistema de MIs aniónicas o catiónicas.

2.3 Técnicas Instrumentales

2.3.1 Espectroscopia ultravioleta visible. Es una técnica que utiliza la radiación del espectro electromagnético para excitar los electrones a niveles de mayor energía. Los espectros de absorción para nanopartículas dan información sobre las propiedades ópticas de estos sistemas, en el caso de los metales nobles el espectro uv-vis no está dado por absorción como una molécula orgánica, en este caso se genera por el fenómeno de resonancia del plasmón superficial, el cual da lugar a una banda característica de cada partícula y brinda una idea del polidispersión y modificación superficial (Skoog D, Holler J, 2009).

2.3.2 Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR). La espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR), es una técnica analítica basada en la absorción de radiación infrarroja por parte de los diferentes grupos funcionales presentes en los compuestos, para obtener un patrón de señales características de éstos. La Transformada de Fourier, se utiliza para el tratamiento de los datos, y el resultado es un espectro infrarrojo el cual tiene picos de absorción que corresponden a las frecuencias de vibración entre los enlaces de los átomos que constituyen la molécula. Ésta técnica analítica es una herramienta de identificación importante ya que permite determinar grupos funcionales presentes en la estructura molecular del compuesto (Nicolet, 2001; Skoog D, Holler J, 2009).

2.3.3 Dispersión dinámica de luz (DLS). Determina el tamaño y polidispersión de partículas coloidales. Es una técnica fisicoquímica, que se aplica a partículas suspendidas en un líquido en constante movimiento Browniano, que tiene un pequeño desplazamiento de la longitud de onda por el efecto Doppler. El desplazamiento es tan leve que solo se puede medir por un láser de He:Ne pasando a través del líquido o dispersión coloidal. Las partículas de diferentes tamaños dispersan la luz con diferentes intensidades dependiendo del ángulo de lectura. Por lo que, existe un ángulo óptimo de dispersión para cada tamaño de partícula. No obstante, algunos equipos DLS miden en ángulo fijo, por lo que determinan el tamaño medio de la partícula en un rango limitado, caso contrario a los multiangulares, que pueden determinar la distribución de tamaño de la partícula completa (Gennaro, 2003; Horiba Scientific, 2000; LSinstruments, 2007). Por otro lado, la velocidad del movimiento Browniano que experimentan las partículas depende de su tamaño, temperatura y viscosidad del medio dispersante. Este movimiento está modelado por la ecuación de Stokes-Einstein (véase Ecuación 2) para la obtención del diámetro hidrodinámico, asumiendo en la mayor parte de los casos, que la forma de las partículas son de tipo esférico. En este sentido, el coeficiente de difusión D_0 está directamente relacionado con el tamaño de la partícula para las geometrías como elipsoides, cilindros, esferas y ovillos; D_h representa el diámetro hidrodinámico de la partícula, K_B la constante de Boltzmann, T la temperatura y η la viscosidad del medio (Clementi, Gugliotta, & Vega, 2009; Gennaro, 2003; Horiba Scientific, 2000).

$$D_0 = \frac{K_B T}{8\pi\eta D_h} \quad (2)$$

2.3.4 Microscopía electrónica de transmisión (TEM). La microscopía TEM por sus siglas en inglés, se usa para analizar la estructura cristalográfica, el tamaño, la morfología y composición de un material. Esta técnica, presenta una gran resolución que permite el análisis a escala atómica, usando un haz de electrones con energías > 60 keV (Tortora, Funke, & Case, 2007). El microscopio funciona con los principios básicos de un microscopio óptico, pero utilizando un haz de electrones acelerados y proyectados sobre una muestra delgada mediante un sistema de lentes condensadoras. Una parte de los electrones son dispersados, otros absorbidos o transmitidos por la muestra para formar una imagen magnificada y focalizada por un sistema de lentes electromagnéticos, los cuales chocan con una pantalla fluorescente para ser detectados por una cámara CCD (dispositivos de carga acoplada) y generar una fotografía de “sombras” de la muestra aumentada hasta un millón de veces, con diferentes grados de oscuridad que varían de acuerdo con la densidad del material (Gómez, 2009; Takeuchi, 2010).

3. Estado del Arte

Desde su descubrimiento, el oro, fue uno de los materiales más usados, incluso en la época alquimista, por ser un metal noble de alta ductilidad, densidad y maleabilidad, al cual se le atribuye un valor medicinal e indestructible. Años más tarde, durante la época romana se fue desarrollando el uso de oro nanoparticulado con propósitos decorativos. Sin embargo, hasta 1857 Faraday estudió las interacciones de la luz con partículas metálicas de oro, profundizando en la formación y naturaleza de las propiedades físicas de este material. Siendo, uno de los primeros en observar que las soluciones coloidales tenían propiedades diferentes a las del oro granel, ya que el fluido rubí obtenido era compuesto de oro dispersado en un líquido de forma metálica finamente dividida, a lo que llamó “estado de oro dividido”. Estas fueron sintetizadas por reducción acuosa de cloro-aurato usando fósforo en disulfuro de carbono para la formación de un sistema de fases (Faraday, 1857). Gracias a las investigaciones realizadas por Faraday se dio el nacimiento de la química coloidal y el desarrollo de las propiedades ópticas de las películas preparadas con soluciones coloidales.

En 1890, Robert Koch pionero de la microbiología, evidenció que los compuestos elaborados con oro inhibían el crecimiento de bacterias (Fuentes, Castillo, & Blanco, 2007). Por lo cual, las nanopartículas de oro (AuNPs) cuentan con una inmensa área de investigación biomédica, ya que estas nanoestructuras se pueden conjugar o funcionalizar fácilmente con moléculas biológicamente activas como fármacos, ácidos nucleicos, proteínas y péptidos (Nirmala Grace & Pandian, 2007). Por otra parte, con el desarrollo del microscopio electrónico se pudieron estudiar la forma, tamaño y distribución del tamaño de los diferentes sistemas coloidales de oro

mencionados por Faraday. En 1951, Turkevich empleó múltiples metodologías de síntesis, obteniendo tamaños de 10 a 500 Å, donde a las partículas <10 Å no fue posible determinar su distribución de tamaño, de igual forma ocurrió con las partículas muy grandes, puesto que la extensa variabilidad de la forma no permitía determinar una curva de distribución. Sin embargo, el método que permitió el análisis óptico de las nanopartículas de oro fue el proceso de Sol-Citrato de sodio, en el que al ácido tetracloáurico (III) (HAuCl_4) se le agregaba citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) en altas temperaturas, para la obtención de un coloide altamente reproducible y de partículas esféricas con un diámetro de 200 Å, de coloración rojo vino (Turkevich & Hillier, 1949; Turkevich, Stevenson, & Hillier, 1951).

Las nanopartículas de oro son uno de los nanomateriales más sintetizados, puesto que en su forma coloidal se considera hidrofóbico con un tamaño de partícula menor al límite de resolución del microscopio óptico, y que al exponerse a la luz genera una excitación colectiva de los electrones de conducción para dar lugar a fenómenos plasmónicos; generando así múltiples aplicaciones dentro de la fisicoquímica. No obstante, cuando se generan nanopartículas menores a 2 nm de diámetro, se produce una cuantificación de la banda de conducción, por lo que es necesario un control atómico preciso de las partículas, llamadas *clusters* (Jana, Gearheart, & Murphy, 2001b). Estas presentan propiedades fluorescentes, quirales y magnéticas, debido al fuerte confinamiento en la adición o eliminación de átomos de oro, lo cual cambia significativamente su estructura y sus propiedades ópticas y electrónicas (Qian, Zhu, Wu, & Jin, 2012). Muchas de las investigaciones realizadas a los *clusters* de oro se basan en el tamaño y estabilización mediante condiciones de reacción y no de reducción de iones metálicos. Por ello, muchas veces los *clusters* metálicos son funcionalizados o recubiertos en su superficie con

moléculas orgánicas tales como tioles, lo que permite una manipulación y caracterización similar a la de los compuestos químicos, es decir, que pueda precipitarse, re-disolverse y purificarse mediante cromatografía sin ningún cambio en las propiedades (Brust, Fink, Bethell, Schiffrin, & Kiely, 1995; Brust, Walker, Bethell, Schiffrin, & Whyman, 1994).

Una de las características más importantes de las AuNPs son sus propiedades ópticas, presentan bandas de absorción en un rango de longitudes de onda desde el visible al infrarrojo cercano (IRC)(Link & El-Sayed, 1999). La banda de plasmón superficial para el oro nanoestructurado se encuentra normalmente ubicada alrededor de los 520 nm, pero dicha longitud de onda puede cambiar con el tamaño, morfología y agregación del sistema (Cruz *et al.*, 2012; Link & El-Sayed, 1999), otorgándole, una amplia gama de aplicaciones.

Actualmente, las nanopartículas de oro son objeto de estudio, porque poseen estabilidad química y fácil funcionalización superficial (Liu, 2006), siendo utilizadas en fármacos, regulación de genes intracelulares, bioimágenes, entre otras (Regiel-Futyra *et al.*, 2015). También, por su baja toxicidad y generación de calor, que amplía el uso biomédico para el transporte y funcionalización de medicamentos, terapia fototérmica y radioterapia, ya que a escala nanométrica este tipo de sistemas tienen una mayor selectividad en la entrega de principios activos en lugares determinados de las células, lo que contribuye al tratamiento de enfermedades cancerígenas y microorganismos multirresistentes (Pissuwan, Cortie, Valenzuela, & Cortie, 2010).

Diferentes autores han encontrado que las AuNPs son eficaces en el desarrollo de vías de administración sistemática, que mejoran la biodisponibilidad de fármacos poco adsorbidos por la pared bacteriana. Además, se ha demostrado que una combinación de antibióticos y nanopartículas de oro de 15 a 20 nm tiene una profunda eficacia antibacteriana contra cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas como *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* a una concentración mínima inhibitoria (CMI) de nanopartículas funcionalizadas con antibiótico de 0.5 mM (Nirmala Grace & Pandian, 2007). Otros autores, también determinaron la CMI de AuNPs de 16 nm impregnadas con quitosano para las cepas *S. aureus* y *P. aeruginosa*, obteniendo un efecto bactericida total con una concentración de 10 mM (Li *et al.*, 2014; Regiel-Futyra *et al.*, 2015).

Por otro lado, en los estudios realizados por Shahzadi Shamaila, las nanopartículas con tamaños de 6-34 nm han presentado una mayor actividad antibacteriana en comparación con las de tamaños de 20-40 nm. La capacidad bactericida se evaluó en cuatro cepas patógenas causantes de infecciones diarreicas en niños y adultos, que afectan gravemente el sistema inmune humano, *E. coli*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis* y *Klebsiella pneumoniae* obteniendo valores de CMI para las NPs pequeñas (G1) de 2.93 µg / mL, 3.92 µg / mL, 7.56 µg / mL y 3.15 µg / mL, respectivamente y para las NPs grandes (G2) una CMI de 2.96 µg / mL, 3.98 µg / mL, 8.61 µg / mL y 3.3 µg / mL (Shamaila *et al.*, 2016) (véase Tabla 1). En conclusión, las AuNPs mejoran su potencial en los campos de la física, la biomedicina y la química debido a sus excelentes características funcionalmente activas (Li *et al.*, 2014; Mohamed *et al.*, 2017; Prema, Inya, & Immanuel, 2016).

Recientemente, se están desarrollando investigaciones de productos textiles con múltiples funcionalidades debido al aspecto de salud e higiene en los ambientes hospitalarios, demandado la modificación de sus superficies con nanopartículas por sus propiedades antibacterianas, bloqueo UV, coloración y propiedades hidrofóbicas (Ganesan & Gurumallesh Prabu, 2015). Las estrategias para obtener estas combinaciones, han incluido tratamiento con plasma, ensamblaje electrostático, quelación por grupos activos y síntesis in situ de metales nobles (Emam, El-Hawary, & Ahmed, 2017; Tang, Sun, Kaur, Yu, & Wang, 2014). RM. Ganesan y colaboradores obtuvieron resultados satisfactorios de telas de algodón soportadas con AuNPs reducidas por un extracto de rizoma de *Acorus calamus* frente a *E. coli* y *S. aureus*. Las cuales presentan una mayor actividad antibacteriana en comparación de las telas sin recubrimiento y telas con extracto puro, además, el tejido con NPs mostró una mejor propiedad de bloqueo de UV respecto a los otros (Ganesan & Gurumallesh Prabu, 2015). Otros estudios relacionados con la industria textil, se han enfocado en la síntesis de nanopartículas de oro para la coloración de las telas de seda de forma in situ por la propiedad óptica de RPS que permite la tinción del material, debido a que muchos tintes se desvanecen al exponerse a la luz solar por efecto de la fotodegradación de las estructuras químicas presentes. Las sedas tratadas con AuNPs exhibieron una buena solidez y estabilidad del color, luego de ser expuestas a lavados e irradiación de luz, facilitando la aplicación industrial de la técnica de coloración in situ con NPs de metales nobles (Tang *et al.*, 2014, 2015; Zhang, Lv, Chen, & An, 2019).

Tabla 1. Efecto antibacteriano en *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Klebsiella pneumonia* (*K. pneumonia*) y *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) para dosis bajas, medias y altas de nanopartículas de oro (NPs) de dos tamaños, nombradas como muestra G1 y G2

Bacterias	(% + Error Estándar)			(% + Error Estándar)		
	muestra G1 de AuNPs			muestra G2 de AuNPs		
	Dosis Baja	Dosis Media	Dosis Alta	Dosis Baja	Dosis Media	Dosis Alta
	1.35	2.03	2.7	1.35	2.03	2.7
	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i>	46.4 ± 0.4	33.75 ± 1.2	22.4 ± 0.8	53.1 ± 0.6	40 ± 1.3	23.7 ± 0.8
<i>Escherichia coli</i>	45.2 ± 1.4	26.6 ± 0.8	4.2 ± 0.9	47.6 ± 1.3	32.2 ± 0.8	6.2 ± 0.9
<i>Klebsiella pneumonia</i>	38.3 ± 0.2	22.8 ± 0.3	10.0 ± 0.2	42.7 ± 0.3	26.8 ± 0.1	13.8 ± 0.2
<i>Bacillus Subtilis</i>	57.8 ± 0.2	52.1 ± 0.1	45.2 ± 0.2	60.7 ± 0.2	56.3 ± 0.1	49.4 ± 0.2

(Adaptado de: Shamaila *et al.*, 2016)

4. Metodología

Con el fin de cumplir los objetivos propuestos, se planteó el siguiente diseño metodológico. Adicionalmente, en este proyecto, se obtuvieron cuatro sistemas de nanopartículas metálicas de oro (AuNPs), sintetizadas mediante micelas inversas. Las nanopartículas fueron caracterizadas por diversas técnicas espectroscópicas, microscópicas y de dispersión. Por último, se determinó la actividad antimicrobiana de los nanocompuestos soportados en telas y en solución.

Diseño metodológico



4.1 Materiales y Reactivos

Los reactivos utilizados en esta investigación fueron: 1,4-bis-2 etilhexilsulfosuccinato de sodio, AOT (97 % Sigma-Aldrich), cloruro de bencil-n-hexadecildimetilamonio, BHDC, (≥ 99 %, Sigma-Aldrich), tolueno (≥ 99.9 %, Merck), n-hexano (≥ 99 %, Merck), hidracina anhidra, N_2H_4 , (98%, Sigma-Aldrich), ácido tetracloroáurico trihidratado, $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$, (99.9 %, Sigma-Aldrich), L-cisteína (97%, Sigma-Aldrich).

Para la síntesis de nanopartículas, se usaron viales de vidrio los cuales se lavaron previamente con agua regia ($HCl:HNO_3$, 3:1), seguido de una solución de jabón neutro, luego una solución de NaOH al 10%. Finalmente, se lavó con exceso de agua tipo 1, para retirar cualquier contaminante que interfiriera en la reacción.

4.2 Síntesis de Nanopartículas Mediante Micelas Inversas

La síntesis de nanopartículas de oro de tamaños menores a 10 y 20 nm con morfologías isotrópicas y anisotrópicas, se realizó a través de micelas inversas, MIs, empleando dos surfactantes de tipo aniónico y catiónico disueltos en solventes no polares tales como, tolueno y una mezcla de tolueno-hexano (70:30), controlando el tiempo de síntesis mediante la adición de un agente estabilizante (Cisteína, Cys) a 3 relaciones molares diferentes $W_s=3,5$ y 7.

4.2.1 Micelas inversas usando surfactante aniónico en solventes no polares. En la formación de micelas inversas con surfactantes aniónicos se utilizó 1,4-bis-2-etilhexil

sulfosuccinato de sodio (AOT) disuelto en solventes orgánicos de baja polaridad como el tolueno (Tol) o la mezcla de tolueno-hexano (Tol-Hx,70:30) a una concentración 0.1 M. Como precursores se usaron el HAuCl_4 0.05 M, N_2H_4 0.3 M y Cys 0.03 M.

Para la síntesis de nanopartículas se tienen dos sistemas micelares (MIs) A y B de Solvente/AOT 0.1 M a una relación molar $W_s=7$. La MIs A tiene una solución de 2.5 mL de Solvente/AOT con 31.6 μL de HAuCl_4 0.05 M; la MIs B presenta el mismo volumen de Solvente/AOT con 31.6 μL de N_2H_4 0.3 M. Cada sistema se homogenizó empleando agitación magnética constante por 2 minutos, a una temperatura ambiente aproximada de 20 °C, seguidamente se agregó la micela B a A en continua agitación magnética; y debido a que las micelas inversas están sujetas al movimiento Browniano, experimenta múltiples colisiones entre ellas, permitiendo que la interfaz micelar se abra y se una con otra micela para la conformación de un dímero, en el que se intercambian los solutos que contiene cada sistema, llevando a cabo la reducción del metal para formar las nanopartículas de oro y finalmente la separación micelar (Eastoe, Hollamby, & Hudson, 2006), como se muestra en la *Figura 6I*. Es de resaltar que este proceso ocurre en segundos, por lo que es necesario la adición de un agente estabilizante capaz de detener la reacción y el crecimiento del material nanoparticulado. Para la obtención de nanopartículas menores a 10 nm, se agregó como agente estabilizante 15 μL cisteína 0.03 M para 5 mL en un tiempo de 12 segundos después de mezclarse los MIs A y B. Para determinar las de mejores condiciones de síntesis se varió el tiempo de agitación tanto de los precursores, como la mezcla de los mismos.

4.2.2 Micelas inversas usando surfactante catiónico en solventes no polares. Se utilizó cloruro de bencil-n-hexadecildimetilamonio (BHDC) como surfactante catiónico para micelas inversas disueltas en solventes orgánicos no polares como el Tol o la mezcla Tol-Hx a una concentración 0.1 M, la cual fue sonicada por 2 minutos a temperatura de 50 °C para la formación de dichas micelas. Se usaron los mismos precursores del sistema anterior, H_{Au}Cl₄ 0.05 M, N₂H₄ 0.3 M y Cys 0.03 M. En este sistema micelar se emplearon dos metodologías diferentes para la obtención de nanopartículas de oro isotrópicas y anisotrópicas, basadas en el artículo de (Gutierrez *et al.*, 2015).

4.2.2.1 Síntesis de AuNPs anisotrópicas en BHDC. En esta síntesis se tienen tres sistemas micelares (MIs) A, B y C de Tol/BHDC 0.1 M a una relación molar $W_s=7$. Inicialmente, se utilizó la metodología convencional (dos sistemas), El sistema micelar A tiene volumen de 3 mL de Tol/BHDC con 37.8 μ L de H_{Au}Cl₄ 0.05 M; la MIs B presenta un volumen de 1.5 mL de Tol/BHDC con 18.9 μ L de N₂H₄ 0.3 M. Cada sistema se homogenizó en un baño ultrasonido Elmasonic E30H por 3 minutos a una temperatura aproximada de 50 °C, seguidamente se agregó el sistema micelar B a A para la obtención semillas de Au⁰, pero el contraión Cl⁻ del BHDC, afecta las capas cristalinas del Au⁰ formadas en la nucleación, induciendo cambios drásticos en la morfología. Posteriormente, se agregó el sistema micelar C de volumen de 1.5 mL de Tol/BHDC con 18.9 μ L de N₂H₄ 0.3 M para hacer crecer las semillas de AuNPs con morfología anisotrópica. Para frenar el proceso de reacción y evitar la aglomeración de las nanopartículas, se añadió 15 μ L cisteína 0.03 M y se sónico por 4 minutos hasta quedar disuelta en la solución, la representación de la síntesis se observa en la Figura 6.

4.2.2.2 Síntesis de AuNPs Isotrópicas en BHDC. Esta síntesis se desarrolla de forma similar a la del surfactante aniónico. Se tiene dos sistemas micelares (MIs) A y B de Tol-Hx /BHDC 0.1 M a una relación molar $W_s=7$. La MIs A tiene una solución de 2.5 mL de Tol-Hx /BHDC con 31.6 μL de HAuCl_4 0.05 M; la MIs B presenta el mismo volumen de Tol-Hx /BHDC con 31.6 μL de N_2H_4 0.3 M. Los sistemas se homogenizaron en el baño de ultrasonido por 4 minutos, a una temperatura aproximada de 50 °C. Seguidamente se agregó la micela B a A en agitación magnética constante, dando como resultado la formación de nanopartículas instantáneamente, por lo cual, se agregó 15 μL cisteína 0.03 M, que se agitaron rápidamente y sonicada por 4 minutos hasta quedar disuelta en la solución (Figura 6I).

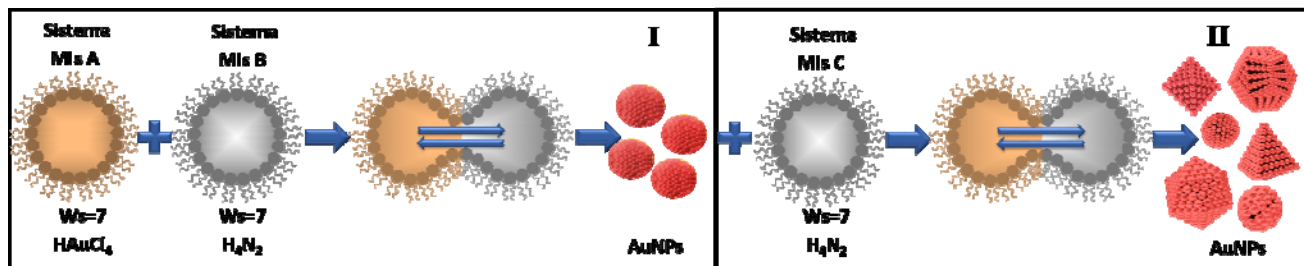


Figura 6. Representación de la metodología (I) convencional (morfología isotrópica) y (II) convencional modificada (morfología anisotrópica) para la síntesis de nanopartículas de oro a través de micelas inversas.

4.3 Caracterización Físicoquímica de Nanopartículas de Oro

4.3.1 Espectroscopia Ultravioleta Visible. Las mediciones se llevaron a cabo en el Espectrofotómetro UV-vis modelo UV-1800, usando dos celdas simultáneamente, una de blanco

y la otra con analito. En las celdas de cuarzo, se depositó 3 mL del analito (las nanopartículas en solución) y 3 mL de blanco (todo el sistema menos el producto) para determinar la banda característica de RPS de las nanopartículas, en la región de 900 a 250 nm.

4.3.2 Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR). Los espectros FT-IR se obtuvieron del equipo BRUKER Tensor 27, recolectando un total de 32 scans con resolución de 2 cm^{-1} . Las muestras fueron soportadas sobre una celda ATR modelo Platinum con cristal de diamante y se cubrieron con un lamina delgada de vidrio (cubreobjetos) para evitar la evaporación del solvente. Las mediciones se realizaron en la región de $4000 - 400\text{ cm}^{-1}$ determinando las interacciones de las nanopartículas con el surfactante y solvente orgánico en el que se encuentran.

4.3.3 Dispersión dinámica de Luz (DLS). Se utilizó un equipo Zetasizer Nano S90 Malvern, tomando los datos de diámetro hidrodinámico obtenidos por número y el índice de polidispersidad a temperatura constante. Se depositó 1 mL de las AuNPs sobre una celda de vidrio de cuatro caras transparentes, y se recolectó la dispersión obtenida a 90° . Se realizaron un total de 6 medidas, cada una de ellas consiste en 10 scans para un total de 60 scans, esto con el fin de promediar las medidas en un valor confiable.

4.3.4 Microscopia Electrónica de transmisión (TEM). La morfología y confirmación de tamaño de las nanopartículas se realizaron en el equipo marca TEM JEOL JEM 1011 con kilovoltaje de 100KV, sistema de fotografía que incorpora una cámara digital de 11 Mpixels (Gatan), un dispositivo de placas que permite alcanzar 600.000 aumentos y un poder de

resolución entre puntos de 0.4 nm y entre líneas de 0.2 nm. Para las medidas de TEM se agregó 50 μL de la solución coloidal de nanopartículas en una rejilla de cobre recubierta con FORMVAR (carbono amorfo y polímero resistente a solventes orgánicos), esto con el fin de que la rejilla no se deteriorará en presencia del medio dispersante.

4.3.5 Microscopía Electrónica de Barrido para Transmisión (STEM). El análisis morfológico de un sistema de nanopartículas, se ejecutó en el Microscopio Electrónico QUANTA FEG 650 (FEI) en modo de alto vacío y equipado con un detector de electrones secundarios, como el detector STEM I XT de electrones transmitidos y detector BSED de electrones retrodispersados para modo de alto y bajo vacío. La muestra se depositó en la rejilla de cobre recubierta con FORMVAR.

4.4 Transferencia de fase de las AuNPs

Para el cambio de fase de las nanopartículas se realizaron dos lavados de etanol/agua (1:1). Al volumen de solución obtenido de NPs se le adicionó la mitad del volumen de etanol/agua. Se obtuvieron dos fases, siendo la superior la fase orgánica con AuNPs y la inferior la fase acuosa. A la fase orgánica se le realizó nuevamente el lavado con etanol/agua y se extrajo para llevar a sequedad con nitrógeno (N_2) y finalmente, el sólido resultante se resuspendió en agua tipo I. El procedimiento de la transferencia de fase se puede observar en la *Figura 7*.

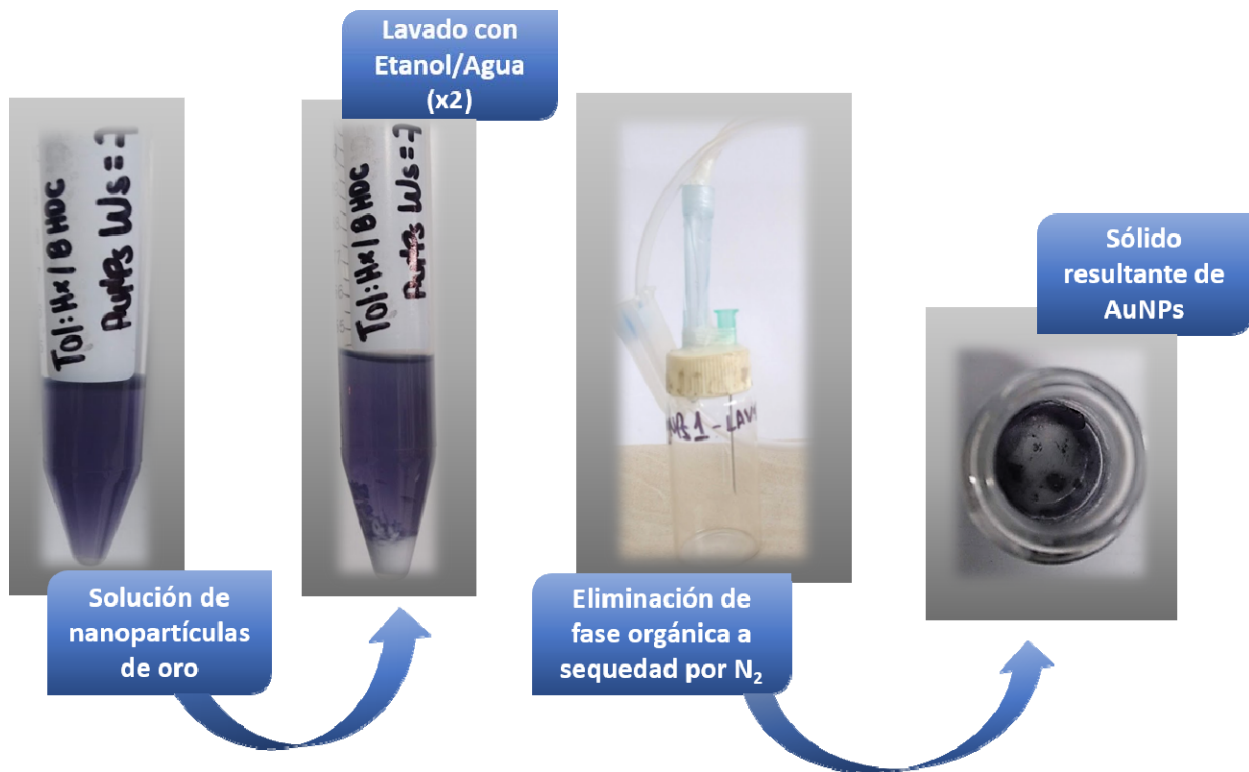


Figura 7. Procedimiento de transferencia de fase.

4.5 Estudio de la Actividad Antibacterial de las AuNPs Sintetizadas

La determinación de actividad antimicrobiana se llevó a cabo mediante pruebas de inhibición de crecimiento bacteriano, determinación de concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de cada agente, utilizando SARM, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (de acuerdo con el protocolo del *Clinical and Laboratory Standards* y adaptados a los protocolos del grupo de investigación en bioquímica y microbiología de la escuela de química).

4.5.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue determinada utilizando el ensayo de microdilución en caldo (Cruz

et al., 2017; Paredes, Ortiz, & Torres, 2014). Primero, se preparó un preinóculo (10% del volumen total requerido para el ensayo) de *S. aureus* ATCC 29213 y SARM en caldo Mueller-Hinton diluido a la mitad; se incubó durante 12 h a 37 ° C con agitación orbital de 200 rpm. Los preinóculos fueron incubados hasta alcanzar una concentración bacteriana de 4.6×10^8 unidades formadoras de colonia/mL (UFC/mL) de acuerdo a la escala de Mcfarland. El inóculo se preparó a partir del preinóculo llevándolo al volumen final con medio estéril, obteniendo una absorbancia entre 0.07 y 0.1 equivalente a $\sim 5 \times 10^5$ UFC. Posteriormente, se realizó el seguimiento de la cinética de crecimiento empleando 100 μ L de este inóculo bacteriano durante 9 h a 37 °C, en microplacas de Elisa que contenían previamente diluciones seriadas de NPs (100, 50, 25, 10, 5, 2.5 y 1.125 ppm) manteniendo una agitación orbital de 200 rpm. Las medidas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro lector de microplaca ELISA (Biorad, Imarck) a 595 nm. La CMI fue definida como la menor concentración de las NPs que produce una inhibición en el crecimiento de bacteriano. Los valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ corresponden a las dosis capaces de inhibir el 50 y 90 % del crecimiento bacteriano, respectivamente (Cruz *et al.*, 2014).

4.5.2 Telas con actividad antimicrobiana. Se impregnaron telas (80% algodón y 20% poliéster) sumergiéndolas completamente y en agitación constante por 20 horas en las nanopartículas generadas y en los blancos de cada sistema (Figura 8), se evaluó su adherencia mediante espectroscopia ultravioleta-visible después de dos lavados convencionales con detergentes comerciales. Finalmente se evaluó su actividad antimicrobiana sumergiéndolas por 2 horas en el inóculo microbiano y soportándolas en una placa de Agar por 24 h.

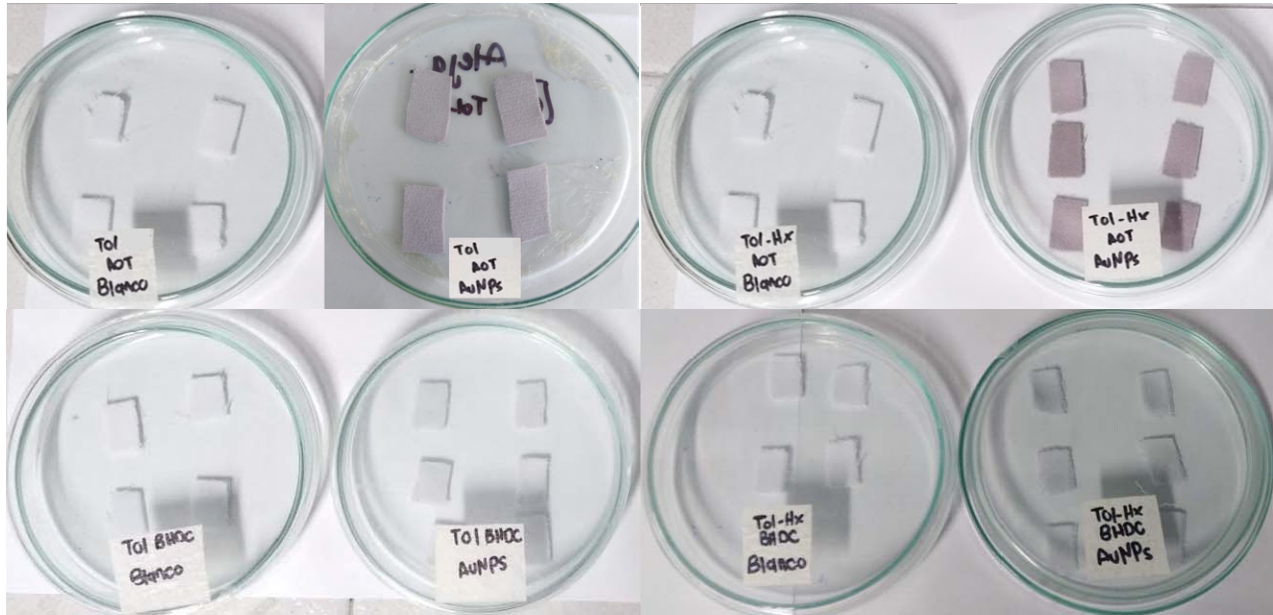









Figura 8. Telas impregnadas con nanopartículas de oro.

4.5.2.1 Evaluación cualitativa de la inhibición del crecimiento planctónico y la adhesión a superficie. Se realizó la evaluación cualitativa de la capacidad de las telas con AuNPs de inhibir el crecimiento de *S. aureus* ATCC 29213 y SARM en medio líquido, así como la capacidad de disminuir la adhesión de microorganismos a la superficie. Brevemente, se utilizaron muestras con recubrimiento de AuNPs y sin AuNPs (control de crecimiento microbiano). Cada tela se colocó en un vial de vidrio de 10 mL con 1 mL de caldo bacteriano a una concentración de 10^5 UFC/mL en medio Mueller Hinton y se incubaron a 37°C por 16 - 18 horas. Una vez finalizado el tiempo de incubación se registró el crecimiento microbiano de acuerdo con la turbidez del medio de cultivo. Posteriormente, cada una de las telas fue lavada con agua peptonada 1%, se colocó sobre una placa de agar BHI y se incubó a 37°C por 12

horas. Finalmente se registró el crecimiento de los microorganismos en el medio según el procedimiento de análisis mostrado en la Tabla 2.

Tabla 2. *Procedimiento de Análisis para la Evaluación Cualitativa de la Inhibición del Crecimiento Planctónico y la Adhesión a Superficie*

Inhibición planctónicas				
Resultado	-	+	++	
Visualización				
Descripción	No se evidencia crecimiento bacteriano en el medio de cultivo, medio traslucido.	Se observa crecimiento bacteriano, incremento en la turbidez del medio.	Se observa abundante crecimiento bacteriano, medio de cultivo muy turbio.	
Adhesión				
Resultado	-	+	++	+++
Visualización				
Descripción	No se evidencia crecimiento bacteriano en la placa de agar.	Se observan algunas colonias bacterianas.	Se observa crecimiento moderado en la tela.	Crecimiento abundante de bacteria adheridas a la tela.

4.5.2.2 Evaluación cuantitativa de la actividad antimicrobiana de telas. Se realizó la evaluación cuantitativa de actividad antimicrobiana de las telas con AuNPs frente a *S. aureus* ATCC 29213 y SARM siguiendo la metodología de ISO 20743 con algunas modificaciones. Brevemente, se utilizaron muestras con recubrimiento de AuNPs y sin AuNPs (control de crecimiento microbiano). Cada tela se colocó en un vial de vidrio de 10 mL con 1 mL de caldo bacteriano a una concentración de 10^5 UFC/mL en medio Mueller-Hinton y se incubaron a 37 °C por 18 horas. Una vez finalizado el tiempo de incubación, las muestras fueron sonicadas por 5 min en 1mL de PBS para recuperar las células bacterianas adheridas a la tela. Se realizó el conteo de colonias en placas de agar BHI para determinar las UFC/mL en la solución, la cual permite determinar el porcentaje de células viables después del procedimiento experimental. Adicionalmente, se realizó el conteo de la UFC/mL en el medio de cultivo para observar si hubo inhibición del crecimiento general o inhibición de la adherencia a la superficie de la tela.

Los valores de actividad antimicrobiana A fueron determinados usando la siguiente formula:

$$A = (\lg C_t - \lg C_0) - (\lg T_t - \lg T_0) = F - G$$

Donde F ($\lg C_t - \lg C_0$) representa el crecimiento de la muestra control (libre de AuNPs), $\lg C_t$ es el promedio del logaritmo decimal del número de bacterias encontradas en la muestra control incubada por 24 horas, mientras $\lg C_0$ es el logaritmo decimal número promedio de bacterias encontradas en la muestra control en el tiempo 0. G ($\lg T_t - \lg T_0$) es el crecimiento en la muestra con el recubrimiento antimicrobiano de nanopartículas, donde $\lg T_t$ es el promedio del logaritmo

decimal del número de bacterias encontradas en la muestra control incubada por 24 horas, mientras $\lg T_0$ es el logaritmo decimal número promedio de bacterias encontradas en la muestra control en el tiempo 0 (*Figura 9*).



Figura 9. Esquema general para la evaluación cuantitativa de actividad antimicrobiana en telas con AuNPs.

5. Resultados y Discusión

A continuación, se presentan los resultados de la síntesis y caracterización de las nanopartículas obtenidas para cada surfactante (véase *Figura 10*) en una relación molar de $W_s=7$, seguido del análisis bacteriano, donde se exhibe una comparación al exponer las nanopartículas sintetizadas con dos metodologías de actividad antibacteriana.

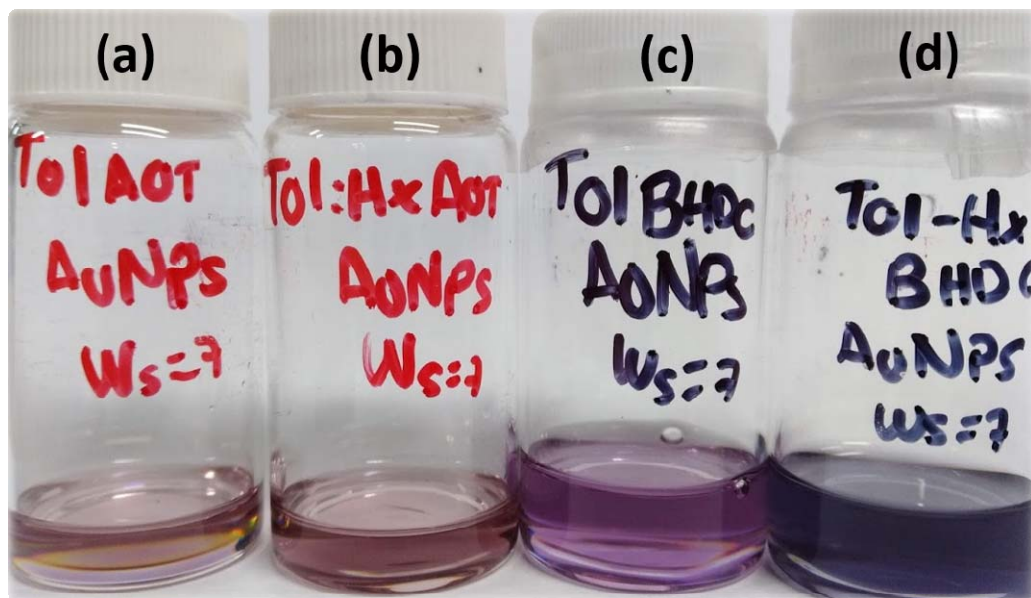


Figura 10. Nanopartículas de oro sintetizadas en micelas inversas de (a) Tol/AOT, (b) Tol:Hx/AOT, (c) Tol/BHDC y (d) Tol:Hx/BHDC a $W_s=7$.

5.1 Caracterización de AuNPs Sintetizadas con Surfactante AOT

5.1.1 Micelas Inversas de AuNPs en Tol/AOT y Tol:Hx/AOT. Los sistemas micelares de AuNPs en Tol/AOT y Tol:Hx/AOT fueron analizadas mediante diferentes técnicas espectroscópicas, microscópicas y de dispersión. Además, se realizó un estudio previo de la relación molar a $W_s = 3, 5$ y 7 , seleccionando este último, por presentar mayor estabilidad, aumento del plasmón superficial y formación de nanopartículas. En los Apéndice A y B, se observan los espectros UV-Vis de los W_s de cada sistema micelar.

Inicialmente se evaluaron sus propiedades ópticas mediante el UV-Vis mostrado en la *Figura 11*, usando como blanco una solución de Tol/AOT y Tol:Hx/AOT encapsulando Agua a la misma relación molar para cada sistema (ya que los precursores se encontraban disueltos en dichos solventes).

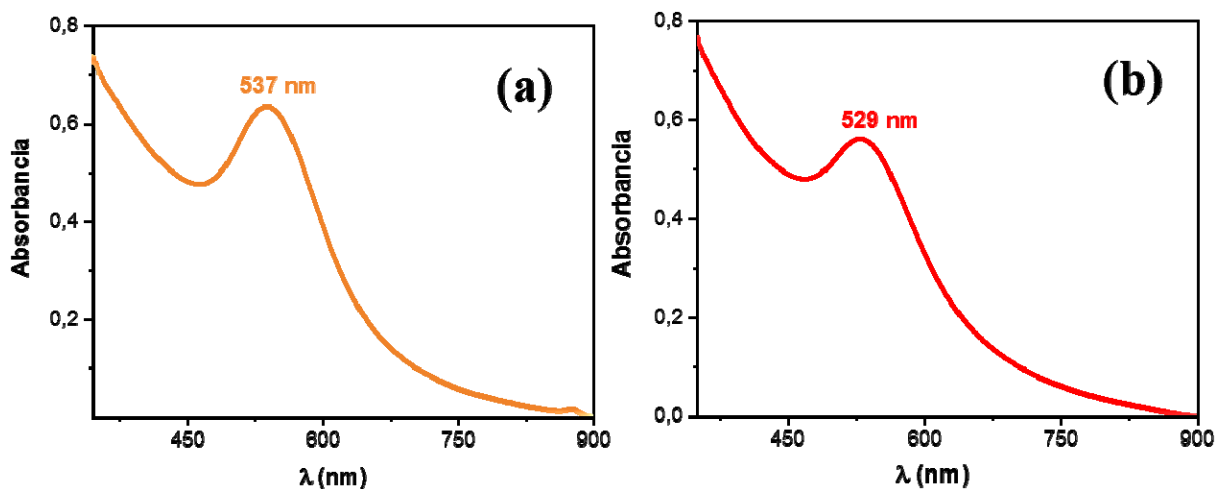


Figura 11. Espectro UV-Vis de AuNPs sintetizadas en micelas inversas de: (a) Tol/AOT (b) Tol:Hx/AOT.

En la *Figura 11* se determinó la posición de la resonancia de plasmón superficial de las AuNPs sintetizadas en nanoreactores de Tol/AOT y la mezcla de Tol:Hx/AOT. De acuerdo con los estudios realizados por (Jana, Gearheart, & Murphy, 2001a; Sun *et al.*, 2009), las nanopartículas de oro presentan su RPS característico a una $\lambda=530$ y 540 nm, para un tamaño aproximado de $3-4$ nm y $5-10$ nm, respectivamente. Lo anterior correlaciona los resultados obtenidos en el sistema de *Figura 11a*, ya que al reducir el HAuCl_4 mediante micelas inversas de Tol/AOT se observan AuNPs con RPS tipo gaussiana en 537 nm, que sugieren la formación de NPs esféricas y monodispersas con tamaños promedios de $5-6$ nm. Por otra parte, en la *Figura 11b*, las NPs presentan una λ menor en 529 nm, pero con ancho de banda significativamente mayor en comparación al sistema (a), sugiriendo que las especies reducidas de Au presentan mayor polidispersidad en este sistema, con un tamaño aproximado de 13 nm.

Adicionalmente, los resultados obtenidos en este trabajo se pueden comparar con los estudios realizados por (Gutierrez *et al.*, 2014), en el cual determinaron el efecto de la mezcla de solventes en las propiedades interfaciales de los medios MIs de AOT, demostrando que los tamaños de las micelas, la micropolaridad interfacial y las interacciones de agua-AOT dependen de la composición del medio orgánico no polar. Por lo tanto, el desplazamiento en las longitudes de onda del sistema (a) y (b), obedece al comportamiento del surfactante con los solventes orgánicos escogidos. En el sistema de Tol/AOT, el tolueno al tener una estructura aromática contribuye con una densidad electrónica mayor que la de una estructura alifática, además, los enlaces del anillo aromático le confieren una estructura rígida y plana, que forma canales intermicelares más estrechos, ocasionando una disminución en las interacciones atractivas entre partículas y, por consiguiente, una reducción de los tamaños micelares. Caso contrario ocurre

con el sistema Tol:Hx/AOT, que al presentar una pequeña adición de solvente alifático, es capaz de crear canales entre micelas más grandes y estables, que aumentan la interacción con el surfactante, favoreciendo el intercambio micelar, con una disminución en la velocidad de formación de nanopartículas y un corrimiento hipsocrómico con longitudes de ondas más cortas (Agazzi, Falcone, Silber, & Correa, 2011; Gutierrez *et al.*, 2014).

Es de resaltar que los espectros UV-Vis sugieren tamaños aproximados de las AuNPs sintetizadas por micelas inversas de Tol/AOT y Tol:Hx/AOT, siendo necesario la caracterizaron mediante DLS como se muestra en la Tabla 3 y la *Figura 12*, en donde se evidencia el diámetro hidrodinámico (d_{Ap}) y el índice de polidispersidad para cada medición.

Tabla 3. *Datos obtenidos por DLS de las AuNPs en Tol/AOT y Tol:Hx/AOT a una relación molar de $W_s=7$*

Sistema Micelar	No. Medición	PDI	D_{Ap} (nm)	$D_{Ap} \bar{X}$ (nm)	σ
AuNPs Tol/AOT	1	0.221	4.825		
	2	0.227	5.698	5.162	± 0.5
	3	0.220	4.964		
AuNPs Tol:Hx/AOT	1	0.331	14.30		
	2	0.341	12.25	13.770	± 1.3
	3	0.300	14.76		

Conforme con los datos de la Tabla 3 se obtuvieron AuNPs con tamaños hidrodinámicos de 5 ± 0.5 nm para el sistema de Tol/AOT y 13 ± 1.3 nm para Tol:Hx/AOT, con un índice de polidispersidad menor a 0.5, sugiriendo que las AuNPs presentan alta monodispersidad.

Adicionalmente, se muestran los gráficos del diámetro hidrodinámico aparente y el histograma para tres medidas de AuNPs.

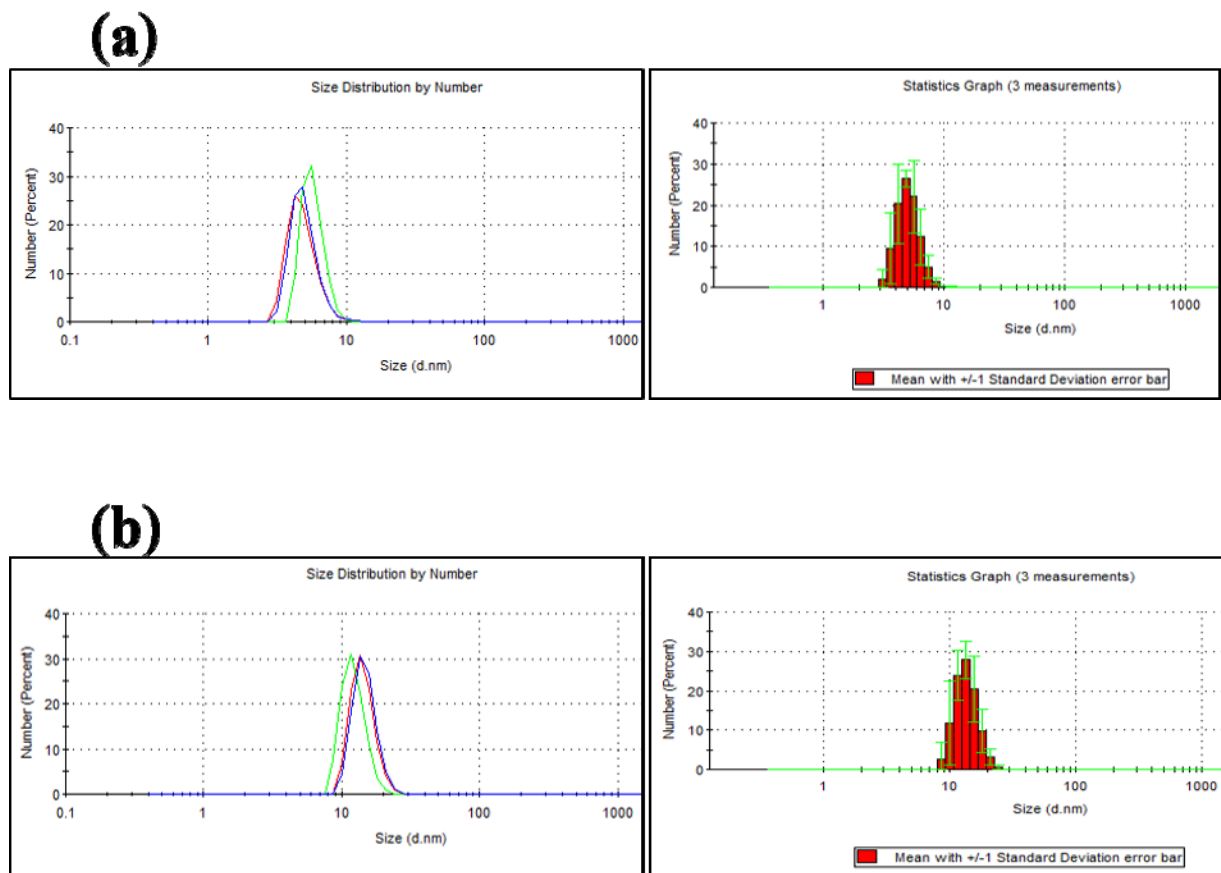
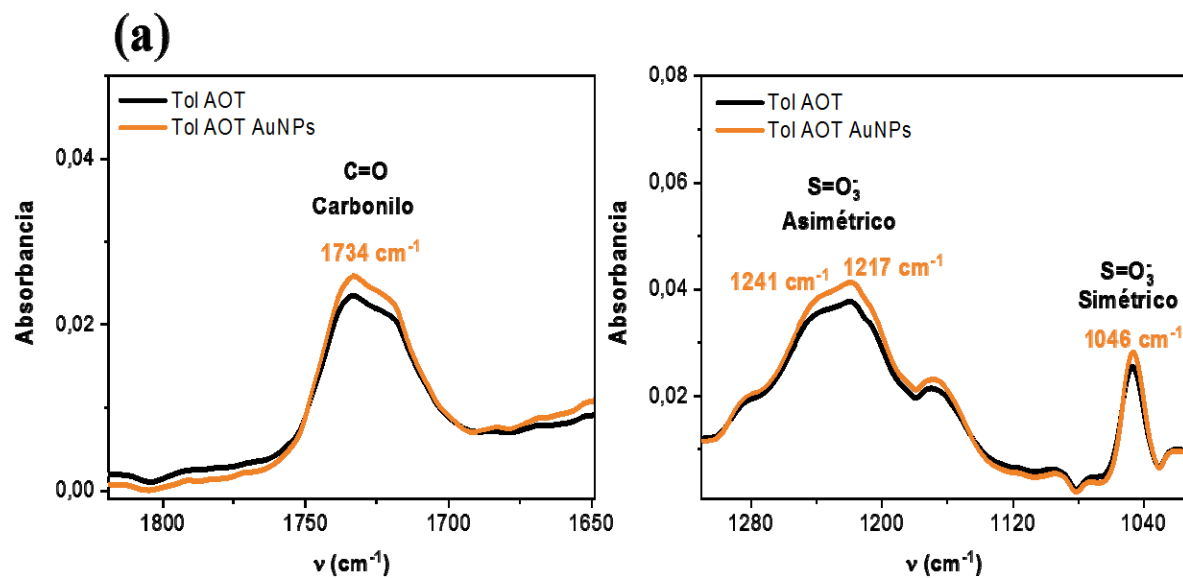


Figura 12. Diámetro hidrodinámico e histograma de medidas de AuNPs obtenidas por medio de Micelas Inversas de: (a) Tol/AOT (b) Tol:Hx/AOT.

En la *Figura 12* se observa que AuNPs presentan una alta monodispersidad, ya que prestan una sola población de tamaños y distribución de las partículas en suspensión. Con esto, se tuvo una idea inicial del tamaño de partícula sintetizado y de la morfología esférica en cada sistema micelar.

Para analizar las interacciones moleculares existentes entre la superficie de las nanopartículas y el surfactante que las estabiliza, se realizaron medidas de espectroscopia infrarroja, *Figura 13*.



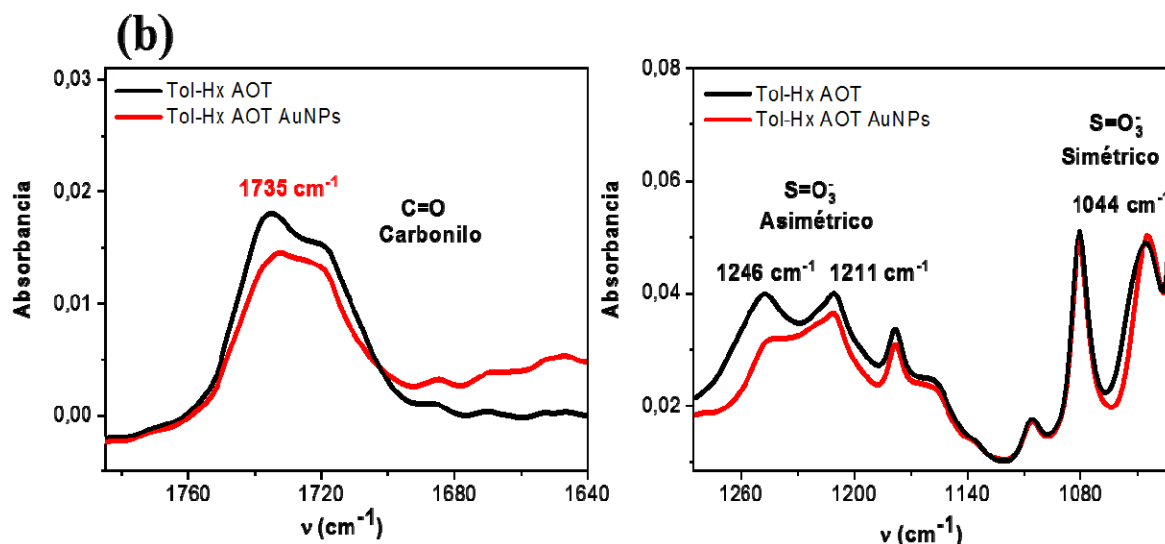


Figura 13. Espectro infrarrojo del estiramiento del carbonilo C=O y estiramiento asimétrico y simétrico del SO_3^- para los sistemas (a) AuNps Tol/AOT (línea naranja) y blanco de Tol/AOT (línea negra) (b) AuNps Tol:Hx/AOT (línea roja) y blanco de Tol:Hx/AOT (línea negra).

En la Figura 13 se puede observar una modificación de las intensidades, la forma y frecuencia de los espectros para cada sistema micelar, sugiriendo que la superficie de las AuNPs presenta una fuerte interacción con la cabeza polar del surfactante AOT. Para la Figura 13a, se observa un aumento en la intensidad de la señal asimétrica del SO_3^- para sistema de AuNPs-MIs y una disminución en la frecuencia de los picos en un rango de $1241\text{-}1217\text{ cm}^{-1}$ (línea naranja), respecto al blanco del sistema (línea negra), debido a que en esta zona se atribuyen las interacciones del estiramiento asimétrico del SO_3^- con el contraión Na^+ . El corrimiento de las señales en este sistema, indica un desplazamiento del catión Na^+ , por la inserción de AuNPs en los iones sulfonato, que confieren la estabilidad a las nanopartículas por interacciones electrostáticas. Asimismo, se experimentaron cambios en la zona de menor energía, entre 1046 cm^{-1} correspondiente al estiramiento simétrico del SO_3^- , y un cambio en la simetría en la zona de

los 1734 cm^{-1} correspondiente al C=O, lo que sugiere que las nanopartículas están interactuando con todas las partes de la zona polar del tensoactivo.

Por otra parte, en la *Figura 13b* se puede evidenciar una fuerte interacción entre la superficie de AOT y AuNPs en el sistema de Tol:Hx. Se generó un aumento en el *splitting* (división) del estiramiento asimétrico del sulfonato, disminuyendo la asimetría de la banda, debido al desplazamiento del contraión de sodio por la presencia de AuNP en la superficie polar del surfactante. En la región de 1044 cm^{-1} la banda simétrica del SO_3^- y el carbonilo en 1735 cm^{-1} también presentan cambios atribuidos por las interacciones débiles del catión-anión de la cabeza polar (Moran, Bowmaker, Cooney, Bartlett, & Woolfrey, 1995).

Por lo tanto, el corrimiento de las señales hacia menor números de onda ocurre cuando el oro encapsulado interactúa fuertemente con el grupo polar del AOT, e interponiéndose y alejando el Na^+ de la superficie polar.

Con el fin de comprobar la morfología y tamaño de las NPs se realizó microscopia electrónica de transmisión (TEM) véase *Figura 14*.

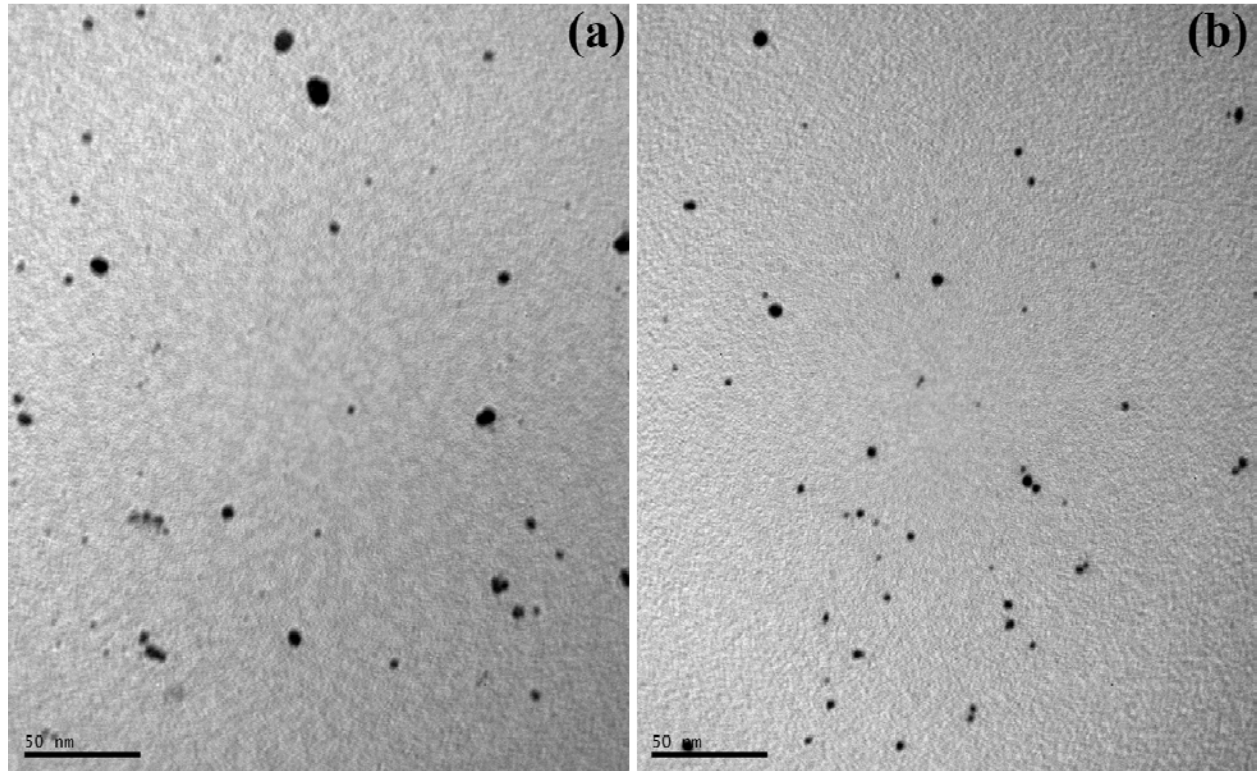


Figura 14. Micrografías TEM de AuNPs obtenidas a través de Micelas Inversas de: (a) Tol/AOT (b) Tol:Hx/AOT a $W_s=7$.

Como puede observar en la *Figura 14*, las nanopartículas sintetizadas presentan morfología esférica con tamaños inferiores a 10 nm y alta monodispersidad e independencia unas de otras. Para las AuNPs sintetizadas mediante Tol/AOT presentan tamaños promedios de 5.5 nm, aunque se pueden evidenciar especies con diámetros desde 3 hasta 8 nm, debido a que el canal intermicelar con tolueno es más rígido y estrecho, provocando un crecimiento desordenado de las nanopartículas (pequeñas y grandes). Las AuNPs obtenidas a través Tol:Hx/AOT tienen un tamaño promedio de 5.7 nm, ya que al adicionar el solvente alifático la interfaz micelar es más fluida, permitiendo el paso directo de los precursores y llevar a cabo la reducción de forma ordenada, generando nanopartículas más monodispersas entre sí, por lo que en la *Figura 14b*, se

pueden observar la mayoría de las especies de un mismo tamaño. Cabe resaltar que los tamaños obtenidos por el DLS difieren, quizás por una aglomeración de las nanopartículas en solución al momento de tomar la medición. No obstante, las nanopartículas obtenidas en estos nanoreactores, se consideran como un sistema monodisperso puesto que la diferencia de tamaños es pequeña (2-3 nm) en estas soluciones coloidales, algo muy difícil de obtener en comparación con otras metodologías de síntesis.

5.2 Caracterización de AuNPs Sintetizadas con Surfactante BHDC

5.2.1 Micelas Inversas de AuNPs en Tol/BHDC y Tol:Hx/BHDC. A las AuNPs sintetizadas en Tol/BHDC y Tol:Hx/BHDC se les determinó sus propiedades fisicoquímicas mediante técnicas espectroscópicas, microscópicas y de dispersión. De igual manera, se estudió la relación molar a $W_s = 3, 5$ y 7 , seleccionando este último, por presentar mayor estabilidad, aumento del plasmón superficial y formación de nanopartículas. En los Apéndice C y Apéndice D, se pueden observar los espectros UV-Vis de los W_s de cada sistema micelar.

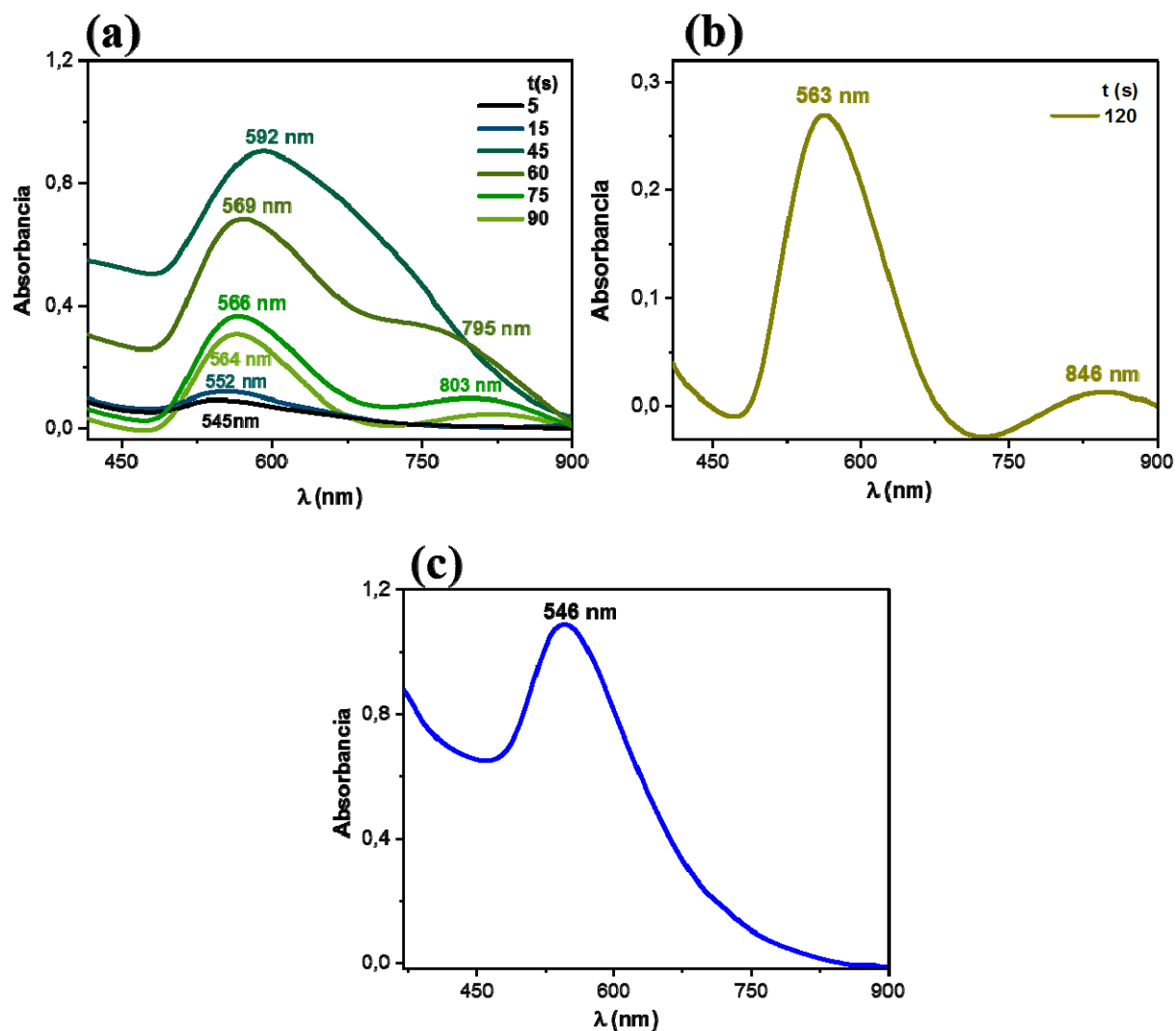


Figura 15. Espectros de UV-Vis de: (a) AuNPs formadas por metodología de Sistema A + Sistema B + Sistema C de Tol/BHDC. (b) Espectro final después de 2 minutos. (c) AuNPs formadas por metodología convencional de Sistema A + Sistema B de Tol:Hx/BHDC.

En la Figura 15a y Figura 15b se observa el espectro de UV-Vis para la formación de AuNPs anisotrópicas en el sistema micelar Tol/BHDC en un tiempo de reacción total de 120 segundos. La síntesis de AuNPs de morfología no definida, inició con la formación de semillas de Au por la metodología convencional (dos sistemas micelares), las cuales muestran una

resonancia de plasmón superficial de baja absorbancia a 545 nm, transcurridos 15 segundos de reacción se observa un perfilamiento de la banda y leve corrimiento en la longitud de onda a 552 nm. Al agregar el tercer sistema micelar, se evidencia una deformación y aumento en la intensidad de la banda RPS principal con un $\lambda_{\text{máx}}$ a 592 nm, asimismo, con el tiempo surge una segunda banda en 795 nm que se atribuye a las nanopartículas de morfología anisotrópica. El espectro final se muestra en la *Figura 15b* después de 2 minutos, en el que ocurre una disminución en la absorbancia de las dos bandas presentes, la banda de alta energía tiene un corrimiento hipsocrómico durante la reacción, dando como resultado una $\lambda_{\text{máx}}$ a 563 nm, y la banda de baja energía, un corrimiento batocrómico en 846 nm. La morfología obtenida en este sistema, se pueden atribuir a la poca flexibilidad que otorga el solvente orgánico al surfactante, ocasionando una disminución en la interacción micela-micela, y, por ende, un intercambio bajo de precursores que permite que el contraión Cl^- del surfactante afecte los procesos de nucleación en las capas cristalinas del oro favoreciendo así, el crecimiento anisotrópico y policristalino de las nanopartículas (Abante *et al.*, 2016; Blach & Martínez, 2017; Gutierrez *et al.*, 2015; Lisiecki, 2005; Pileni, 2007).

Por otro parte, las AuNPs sintetizadas por el sistema micelar de Tol:Hx/BHDC mediante la metodología convencional, exhiben una RPS tipo gaussiana a $\lambda=546$ nm (*Figura 15c*) constante en el tiempo. La posición y ancho de banda sugieren AuNPs más pequeñas que las obtenidas en el sistema de tolueno/BHDC, también se puede inferir una morfología isotrópica y monodispersa al tener una única banda en el espectro UV-Vis. En este sistema micelar se puede resaltar, como una pequeña adición del solvente alifático en la fase orgánica, mejora la efectividad de las interacciones micela-micela, confiriendo una mayor flexibilidad y aumento del ancho del canal

intermicelar (Gutierrez *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2014), que favorecen el intercambio de precursores y evita la inserción del contraión Cl^- en las primeras etapas cristalinas del oro, sugiriendo como resultado nanopartículas de morfología tipo esférica, de menor tamaño y baja polidispersidad. Por lo tanto, al comparar las micelas inversas de BHDC como nanoreactores en tolueno con tolueno:hexano, se evidencia que el solvente alifático mejora el proceso de reacción y nucleación. De esta manera, es importante destacar que: I) El tamaño del corazón polar es crucial en la anisotropía de las nanopartículas debido a la inserción del contraión Cl^- de BHDC en las capas de cristalinidad ocasionando cambios en la morfología. II) La efectividad de la interacción intermicelar y el proceso de reducción aumentan con la adición de hexano para la obtención de AuNPs más definidas y pequeñas.

Con el fin de evaluar el tamaño de las nanopartículas obtenidas se realizó un análisis por DLS, en la Tabla 4 y la *Figura 16*, se muestran los valores de tamaño y distribución promedio de los diámetros hidrodinámicos.

Tabla 4. *Datos obtenidos por DLS de las AuNPs en Tol/BHDC y Tol:Hx/BHDC a una relación molar de $W_s=7$*

Sistema	No.	PDI	D_{Ap}	$D_{Ap} \bar{X}$	σ
Micelar	Medición		(nm)	(nm)	
	1	0.476	32.17		
AuNPs	2	0.584	40.68	35.52	± 4.5
Tol/BHDC	3	0.685	33.71		

	1	0.499	27.55		
AuNPs	<hr/>				
Tol:Hx/BHDC	2	0.782	42.49	35.07	± 7.5
	<hr/>				
	3	0.483	35.17		

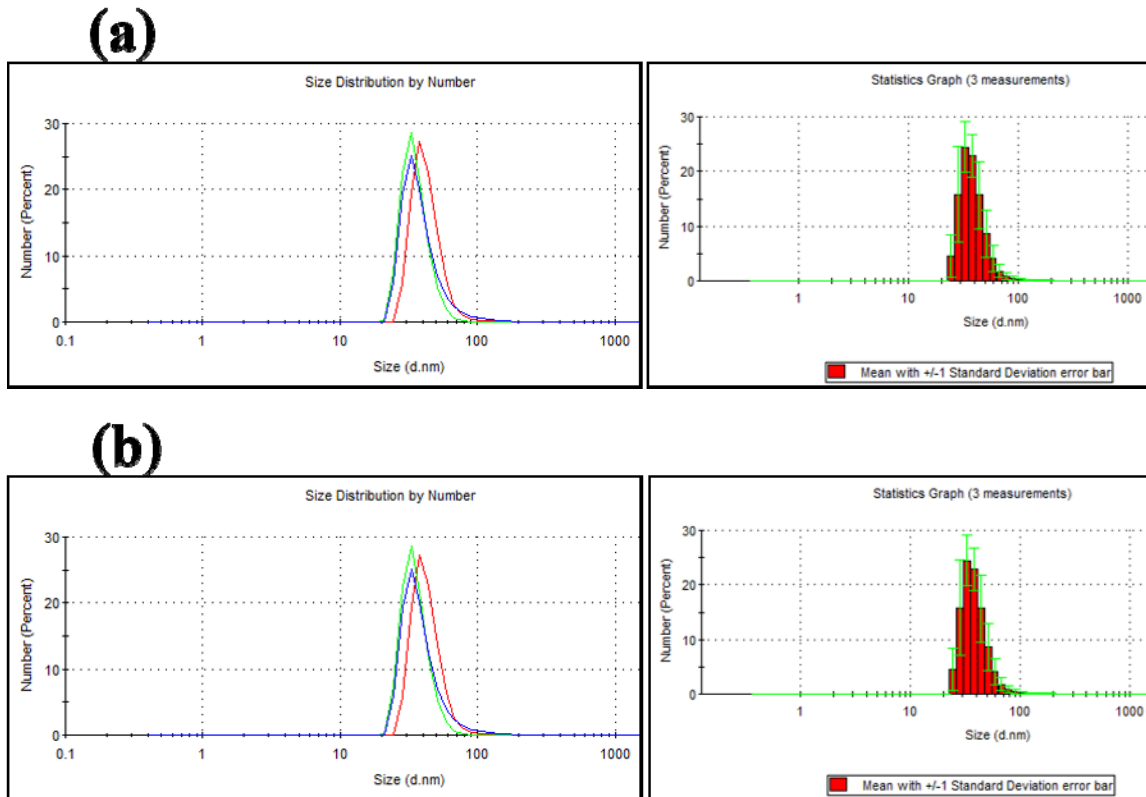


Figura 16. Diámetro hidrodinámico e Histograma de medidas de AuNPs obtenidas por medio de Micelas Inversas de: (a) Tol/BHDC (b) Tol:Hx/BHDC.

Los tamaños promedio del diámetro hidrodinámico mostrados en la Tabla 4 para las NPs sintetizadas en Tol/BHDC y Tol:Hx/BHDC son 35.52 ± 4.5 y 35.07 ± 7.5 , respectivamente. Para el sistema de Tol/BHDC el tamaño y la polidispersidad coinciden con lo planteado en el análisis de UV-Vis, puesto que se esperan obtener especies de morfología anisotrópica, lo que implica

que el diámetro obtenido por DLS solo obedece a nanopartículas tipo esféricas y no de geometría no definida. Caso contrario ocurre en el sistema Tol:Hx/BHDC, puesto que al ensanchar el canal intermicelar se sugiere la síntesis de especies más monodispersas y de menor tamaño, como se exhiben en la *Figura 16b*, donde las bandas e histogramas son más estrechos y pueden corresponder a un limitado rango de tamaño en comparación con la *Figura 16a*, que tiene bandas más anchas en la que posiblemente existen poblaciones de nanopartículas con diferentes tamaños.

Para analizar las interacciones moleculares existentes entre la superficie de las nanopartículas y el surfactante que las estabiliza, se realizaron medidas de espectroscopia infrarroja, *Figura 17*.

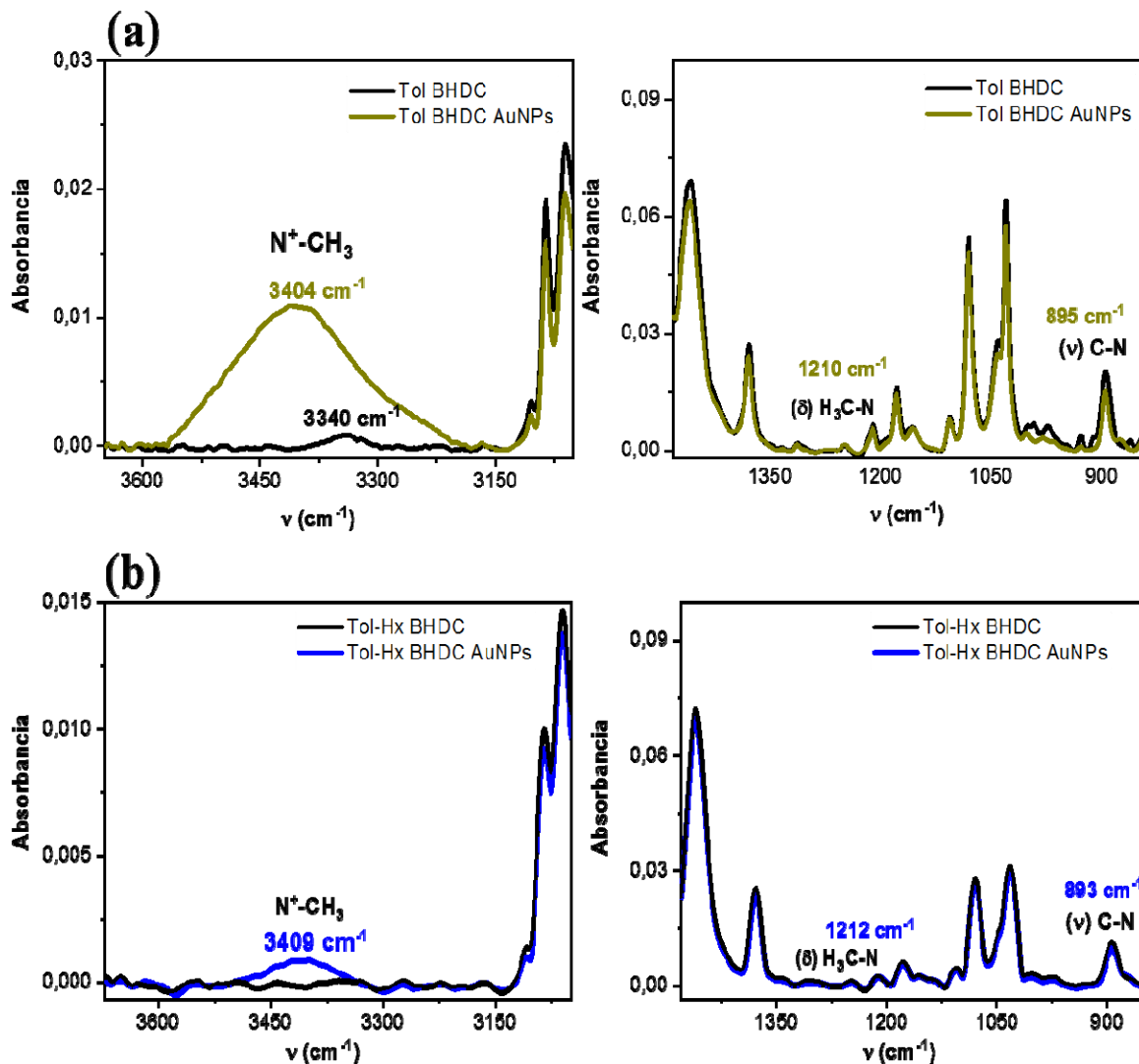
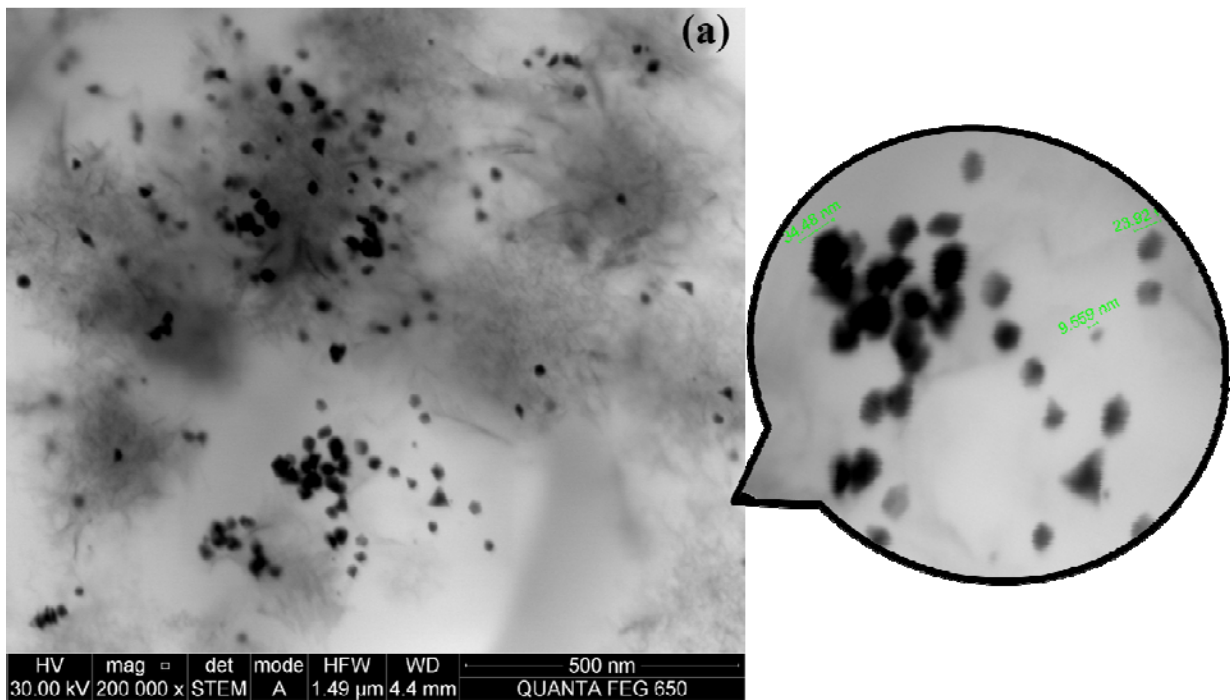


Figura 17. Espectro Infrarrojo del estiramiento asimétrico, simétrico y flexión del N^+-CH_3 para los sistemas (a) AuNps Tol/BHDC (línea verde) y blanco de Tol/BHDC (línea negra) (b) AuNps Tol:Hx/BHDC (línea azul) y blanco de Tol:Hx/BHDC.

En la Figura 17 se muestran las principales bandas vibracionales del grupo amino cuaternario del surfactante BHDC. Las bandas en 3404, 1210 y 895 cm^{-1} del sistema Tol/BHDC y 3409, 1212 y 893 cm^{-1} , corresponden a la absorción del grupo N^+-R de estiramientos asimétricos, simétrico y de flexión. Los espectros IR de las nanopartículas encapsuladas en estos dos

sistemas micelares, presentan un aumento significativo en la absorción del estiramiento *Figura 17* se evidencia el estiramiento de simétrico del C-N a menor energía con una pequeña disminución en su absorbancia.

Con el fin de comprobar la morfología y tamaño de las NPs se realizó microscopia electrónica de transmisión (TEM).



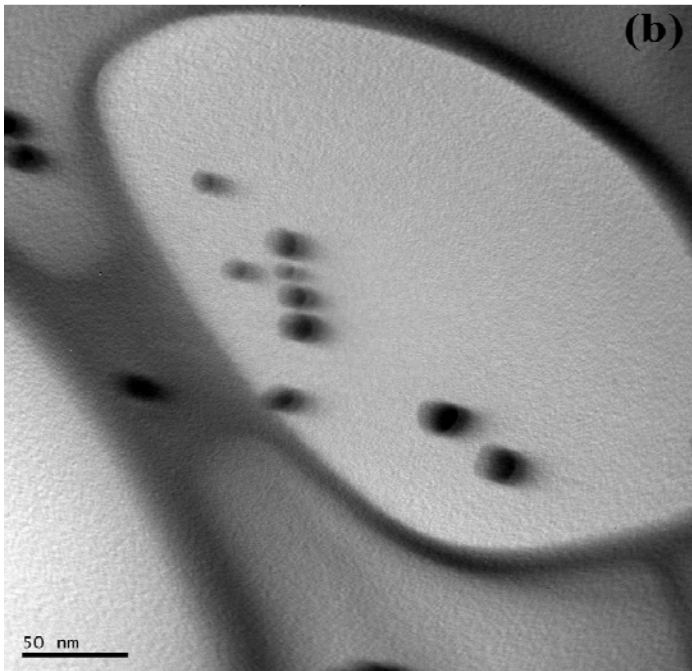


Figura 18. Micrografías STEM y TEM de AuNPs obtenidas a través de Micelas Inversas de: (a) Tol/BHDC (b) Tol:Hx/BHDC, respectivamente a $W_s=7$.

En la *Figura 18a*, se confirma la anisotropía de las nanopartículas de oro obtenidas mediante Tol/BHDC. En la imagen de STEM se logra visualizar AuNPs de tipo esferas, triángulos, decaedros, pentágono y morfología no definida, con tamaños que corresponden a los obtenidos en DLS de acuerdo a su geometría. Con esta micrografía se complementa lo planteado para las dos bandas de RPS presentes en dicho sistema, puesto que obedecen a la anisotropía de las especies resultantes de la síntesis con un solvente de poca interacción efectiva entre micelas, que permite la inserción del contraión Cl^- en las etapas cristalinas del oro y, por ende, un crecimiento desordenado de nanopartículas. Por otra parte, en la *Figura 18b* se muestra que la adición de un solvente de cadena lineal mejora la interacción micela-micela e impide la inserción del contraión

del surfactante BHDC, dando como resultado nanopartículas de oro isotrópicas de morfología elipsoidal con tamaños alrededor de 16 nm.

La estabilidad y carga de las nanopartículas después de realizar la transferencia de fase fue determinada mediante el potencial zeta como se observa en la Tabla 5.

Tabla 5. *Valores de potencial zeta de las AuNPs obtenidas en cada uno de los sistemas micelares*

Sistema Micelar	Potencial Zeta (mV)	σ
Tol/AOT	- 63.8	± 9.1
Tol:HX/AOT	- 50.2	± 9.4
Tol/BHDC	+ 65.6	± 6.8
Tol:HX/BHDC	+ 68.6	± 5.8

El potencial zeta es una medida de la repulsión o atracción electrostática que presentan las partículas o soluciones coloidales, y puede expresarse en valores positivos o negativos. Cuando las dispersiones tienen valores más positivos que +30 mV o más negativos que -30 mV son consideradas estables (Mahendran & Ranjitha Kumari, 2016).

Los valores de potencial zeta de la Tabla 5 sugieren nanopartículas estables, debido a las repulsiones electrostáticas generadas por las moléculas residuales de los surfactantes empleados. Las AuNPs obtenidas mediante sistemas micelares de AOT, presentan valores negativos,

asociados a la carga que proporcionan las moléculas residuales (SO_3^-) del surfactante aniónico en la superficie de las NPs. Caso contrario a las NPs sintetizadas con BHDC, que tiene valores positivos, asociados a la carga que proporcionan las moléculas residuales (NR_4^+) del surfactante catiónico en la superficie de las NPs.

5.3 Estudios Antibacterianos de las AuNPs sintetizadas

5.3.1 Actividad antimicrobiana. La Tabla 6 muestra los resultados de la actividad de concentración mínima inhibitoria de las nanopartículas de oro (después de la transferencia de fase) frente a *S. aureus* ATCC 29213 y *SARM*.

Tabla 6. Resultados CMI50 y CMI90 para las nanopartículas sintetizadas frente a *S. aureus* ATCC 29213 y *SARM*

AuNPs	<i>S. aureus</i> ATCC 29213		SARM	
	CMI50	CMI90	CMI50	CMI90
	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]
Tol/AOT	50	100	25	100
Tol:Hx/AOT	50	100	50	100
Tol/BHDC	2.5	5	2.5	5
Tol:Hx/BHDC	1.12	2.5	1.25	2.5
AOT	>100	>100	>100	>100
BHDC	~10	>50	~10	>50

De acuerdo con los resultados reportados en la Tabla 6, se evidencia que las nanopartículas de oro que presentaron una inhibición significativa del crecimiento bacteriano para las dos cepas tratadas son las sintetizadas en los sistemas micelares de BHDC. Además, las concentraciones del CMI entre *SARM* y *S. aureus ATCC 29213* no difiere significativamente entre sí, sugiriendo que poseen un mecanismo de acción o blanco común a ambas cepas del microorganismo. De igual manera, la actividad antibacteriana de estas AuNPs se comparó con los estudios reportados por (Elbehiry, 2018) para un CMI₅₀ y un CMI₉₀, en el cual reportan una inhibición del 50 % y 90 % del crecimiento de las bacterias a una concentración de 6.25 y 25 ppm, respectivamente, sugiriendo que las nanopartículas sintetizadas mediante los sistemas micelares de BHDC actúan de manera efectiva en la inhibición de crecimiento bacteriano respecto a las sintetizadas mediante AOT y la literatura.

Cabe resaltar que para estos ensayos las AuNPs fueron sometidas a un cambio de fase, por lo que la estabilidad inicial proporcionada por los nanoreactores puede cambiar, influyendo principalmente en las propiedades fisicoquímicas mostradas en la fase orgánica, atribuyendo en gran parte su actividad a estas nuevas propiedades. Las gráficas de cinética de crecimiento de *S. aureus ATCC 29213* y *SARM* y el porcentaje de inhibición y viabilidad de las AuNPs frente a ella pueden observarse en los Apéndice E al Apéndice L.

5.3.2 Caracterización de las telas soportadas con AuNPs. Las telas impregnadas con nanopartículas de oro fueron caracterizadas mediante las técnicas de UV-Vis y microscopía SEM como se muestra en la *Figura 19* y *Figura 20*.

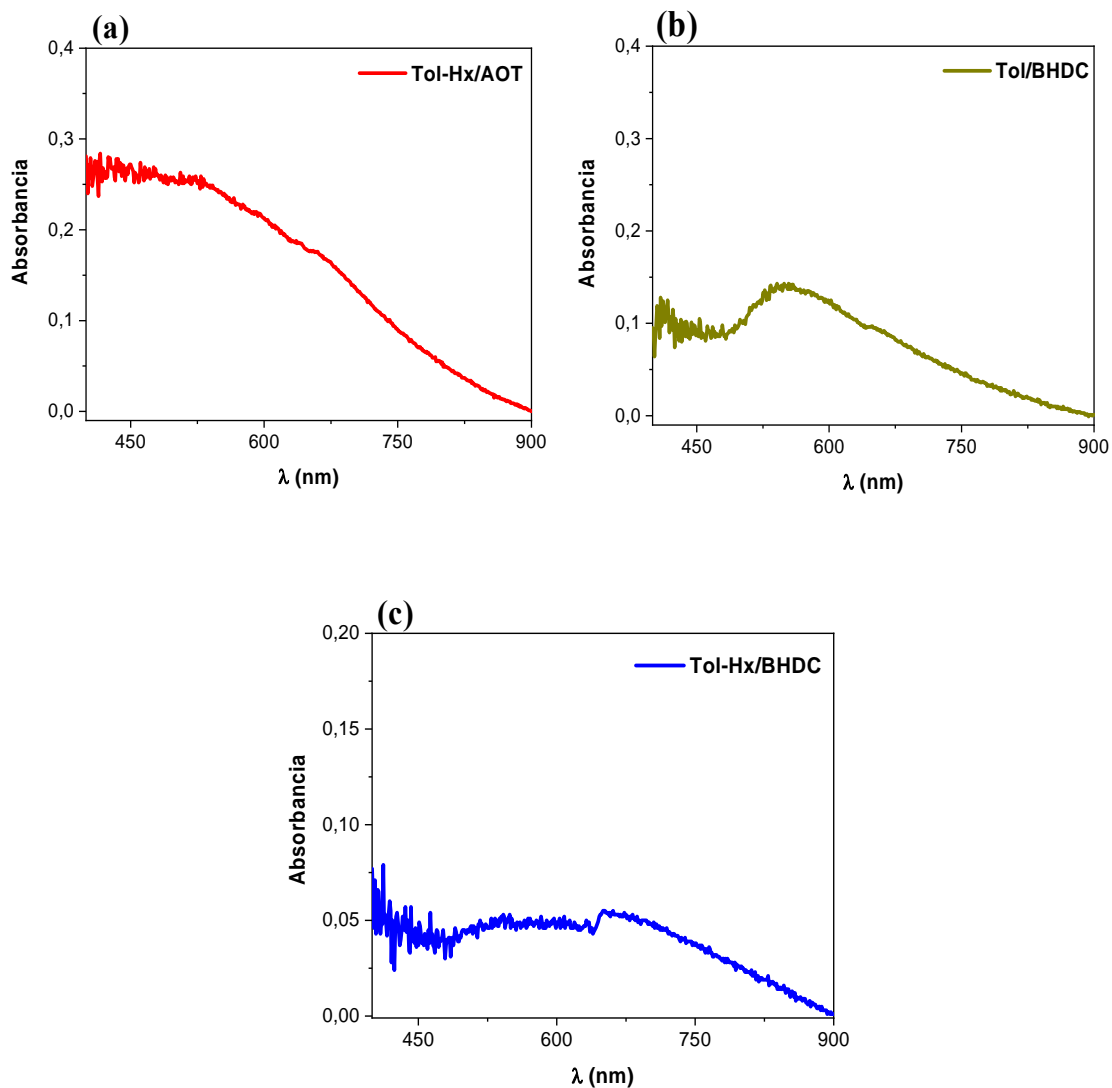


Figura 19. Espectro UV-Vis de las telas recubiertas con AuNPs sintetizadas por micelas inversas de (a)Tol:Hx/AOT, (b)Tol/BHDC y (c) Tol:Hx/BHDC.

Los espectros UV-Vis de las telas soportadas con AuNps, se realizaron con el fin de asegurar la impregnación y fijación de estas después de ser lavadas rigurosamente. En la *Figura 19*, se logra evidenciar de forma definida la resonancia de plasmón superficial característico de las AuNPs para el sistema de Tol/BHDC, sugiriendo que las NPs se adsorbe efectivamente entre las

fibras de la tela. En los sistemas (a) y (c), no se alcanza a exhibir el RPS de las AuNPs, pero se observa una curva menos definida que en el sistema (a), infiriendo una posible fijación de las NPs en la tela. Para garantizar la impregnación de las AuNPs sintetizadas, se realizó microscopía SEM (véase *Figura 20*).

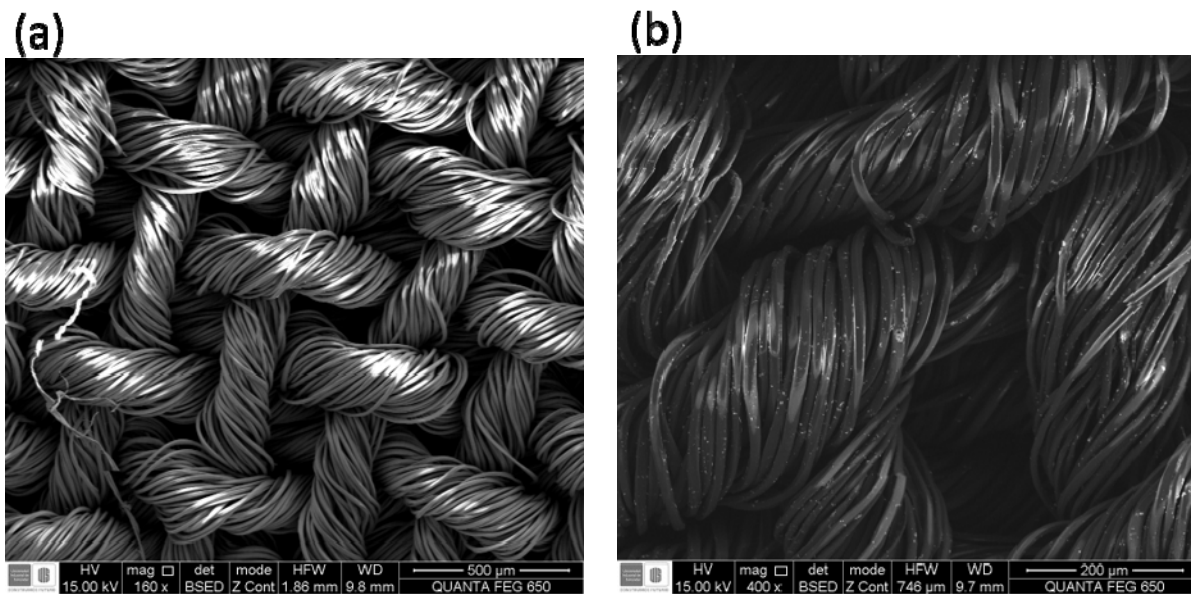


Figura 20. Micrografía SEM de telas (a) sin NPs y (b) con AuNPs.

La *Figura 20* es un ejemplo de uno de los sistemas estudiados por microscopía electrónica de barrido, la imagen (a) corresponde a la tela libre de nanopartículas, la cual fue sometida a un recubrimiento con oro por ser de material no conductor, exhibiendo únicamente las fibras de algodón y poliéster. En la micrografía (b) se muestran las nanopartículas distribuidas en toda la superficie de la tela, confirmando una buena impregnación y fijación en la tela. La importancia de estos resultados radica en la aplicabilidad de nuevos materiales de tipo quirúrgico para la inhibición del crecimiento antibacteriano.

5.3.3 Evaluación de la inhibición del crecimiento planctónico y la adhesión a superficie en cepas bacterianas. A continuación, se presentan los resultados obtenidos de los ensayos cualitativos y cuantitativos de la inhibición del crecimiento bacteriano de las cepas SARM y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 en telas soportadas con nanopartículas de oro y sus respectivos blancos. Las imágenes de los resultados de las pruebas cualitativas en telas se pueden observar en las Apéndice M y Apéndice N.

Tabla 7. Resultados de las muestras recubiertas con AuNPs y su correspondiente control

Microorganismo	SARM		<i>S. aureus</i>	
	Crecimiento planctónico	Adhesión a la superficie	Crecimiento planctónico	Adhesión a la superficie
Control AuNPs AOT	++	+++	++	+++
AuNPs Tol/AOT	++	+++	++	+++
AuNPs Tol:Hx/AOT	++	-	++	+++
Control Tol/BHDC	+	++	+	+++
AuNPs Tol/BHDC	-	+	-	+
Control AuNPs Tol:Hx BHDC	+	++	++	++
AuNPs Tol:Hx BHDC	-	-	-	-

++ o +++: Crecimiento cualitativo de la cepa estudiada

+: Crecimiento cualitativo leve de la cepa estudiada

-: No crecimiento de la cepa estudiada (Inhibición)

En la Tabla 7 se muestran los resultados obtenidos en la inhibición cualitativa del crecimiento bacteriano de las nanopartículas de oro frente a las cepas bacterianas SARM y *S. aureus* ATCC.

Es importante destacar la baja inhibición de los blancos en el crecimiento de las bacterias, sugiriendo que las inhibiciones presentadas por las telas con nanopartículas frente a las bacterias, se debe a la actividad de las NPs.

Tabla 8. Reducción logarítmica del crecimiento de las cepas bacterianas adheridas a las telas con recubrimiento de AuNPs

Muestra	SARM	<i>S. aureus</i>
AuNPs Tol/AOT	-0,24210545	0,86930787
AuNPs Tol:Hx/AOT	8,39322878*	0,62064876
AuNPs Tol/BHDC	2,28985454	2,3269682
AuNPs Tol:Hx/BHDC	2,39059399**	4,85404101*

*Se considera significativa una RL si es >3

**Se considera significativa, si se reduce la concentración de blanco empleado.

Las AuNPs sintetizadas mediante Tol:Hx/AOT presentó una reducción significativa del crecimiento de SARM (>8 RL) en las telas recubiertas. Sin embargo, no se observó esta reducción en *S. aureus* ATCC 29213, en concordancia con los resultados obtenidos en el análisis cualitativo de adhesión a la superficie. Para la prueba de inhibición del crecimiento planctónico, no se observaron diferencias significativas entre las dos cepas de *S. aureus* evaluadas. Esta actividad antimicrobiana diferenciada puede deberse a que el mecanismo de acción se encuentre relacionado con una característica individual del SARM como la expresión de proteínas diferenciales. El hecho de que no se observe reducción en el crecimiento en estado planctónico a pesar de su actividad en SARM puede deberse a que las nanopartículas no difunden su actividad al medio de cultivo y requieren que el microorganismo entre en contacto directo con ellas. Cabe

mencionar que para confirmar alguna de las hipótesis propuestas, se requieren estudios adicionales.

Por otra parte, las AuNPs de Tol:Hx/BHDC presentaron una reducción significativa del crecimiento de las cepas *S. aureus* en todas las metodologías evaluadas. Sin embargo, el control del sistema con BHDC presentó actividad antimicrobiana significativa frente a SARM, lo cual disminuye el cálculo de la inhibición atribuible a las nanopartículas, por el contrario, en *S. aureus* ATCC 29213 si se obtuvo una reducción logarítmica significativa (>4 RL). De acuerdo a lo anterior, este sistema podría tener una actividad promisorio frente a ambas cepas si se reduce el BHDC empleado en la síntesis, o se comprueba que no posee actividad citotóxica a las concentraciones evaluadas. Para los sistemas de AuNPs Tol/AOT y AuNPs Tol/BHDC no se evidencia una reducción logarítmica significativa en las cepas de *S. aureus*.

Es importante resaltar que a pesar de la notable actividad antimicrobiana del control de BHDC, el cual inhibió el crecimiento de microorganismos, no garantizó la muerte de todos aquellos presentes en la muestra. Por lo tanto, las nanopartículas sintetizadas en Tol:Hx/BHDC exhibieron una actividad bactericida mayor a la del control, al no presentar crecimiento bacteriano en ninguna de las telas evaluadas con SARM y *S. aureus* (*Figura 21*).

Adicionalmente, en la *Figura 22* se muestra la imagen SEM para las telas recubiertas con AuNPs una vez evaluada su actividad antibacteriana frente a *S. aureus* ATCC.

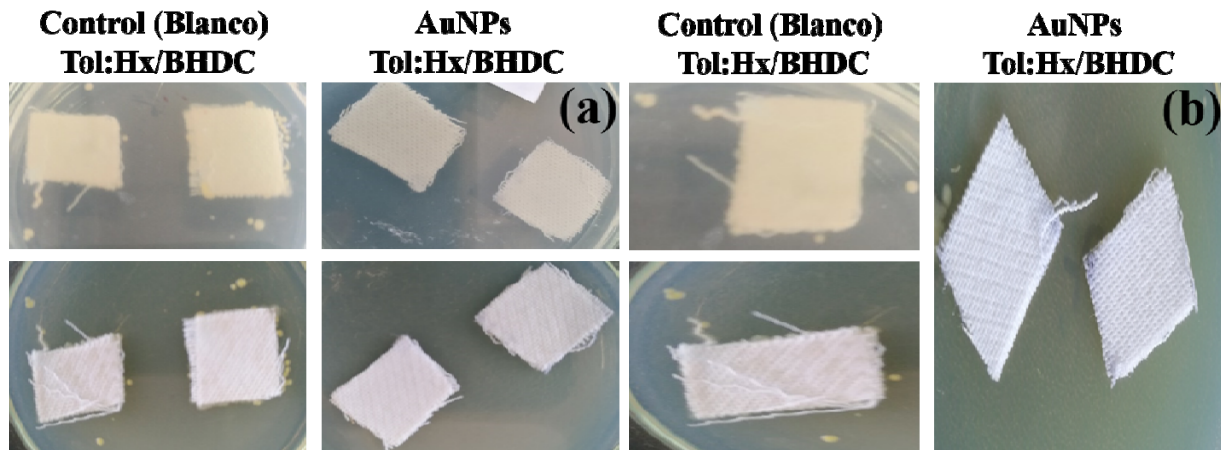


Figura 21. Inhibición del crecimiento bacteriano sobre telas con recubrimiento de AuNPs sintetizadas en Tol:Hx/BHDC frente a cepas (a) *S. aureus* ATCC. (b) SARM.

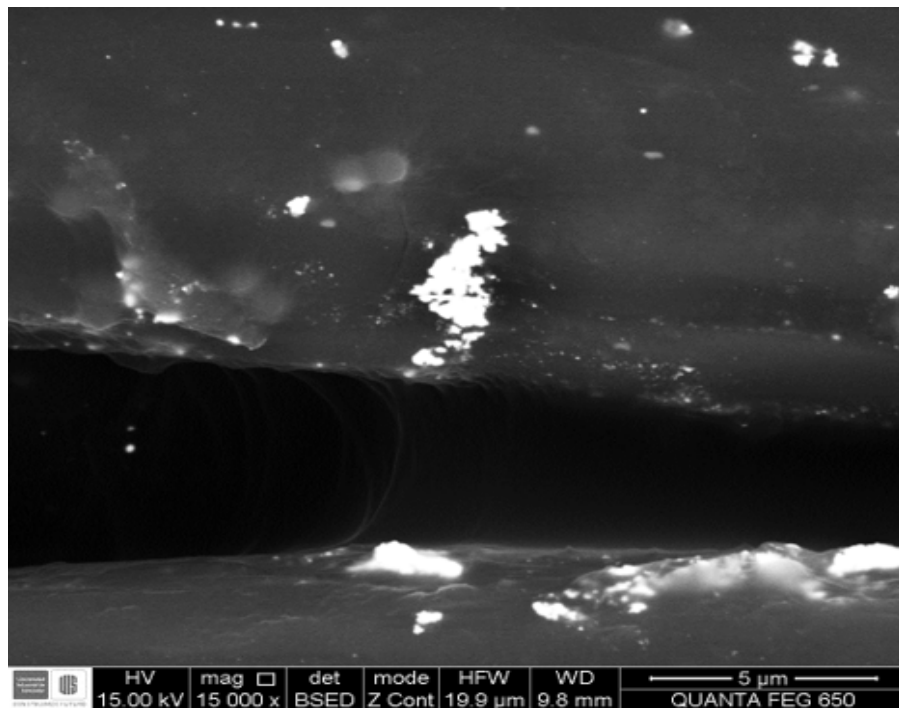


Figura 22. Micrografía SEM de telas impregnadas con AuNPs después de evaluar la actividad antibacteriana de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

En la *Figura 22* se evidencia poca población de las bacterias estudiadas, debido a que se encuentran inmersas entre las fibras de la tela y la resolución del microscopio dificultan su visualización. Sin embargo, en la micrografía se observan islas de AuNPs aparentemente aglomeradas por la escala de medición, y algunas NPs en la superficie de las bacterias efectuando su actividad antimicrobiana.

6. Conclusiones

Se obtuvieron nanopartículas de oro altamente monodispersas, esféricas con diámetros menores a 10 nm mediante micelas inversas de Tolueno/AOT y Tolueno:Hexano/AOT. Por el contrario, las nanopartículas sintetizadas mediante Tolueno/BHDC exhibieron una morfología tipo esferas, triángulos, decaedros, pentágono y no definida con tamaños de 10 a 40 nm y las de sistema micelar de Tolueno:Hexano/BHDC presentaron morfología isotrópica de geometría elipsoidal con tamaños promedio de 16 nm y monodispersas.

Las nanopartículas sintetizadas fueron caracterizadas por técnicas espectroscópicas, microscópicas y de dispersión, dando información de gran importancia respecto a sus propiedades fisicoquímicas que permiten establecer diferentes tipos de nanoestructuras con tan solo modificar la composición del surfactante o del solvente orgánico.

Los resultados de CMI₅₀ y CMI₉₀ para la actividad antibacteriana, sugieren que el efecto de las AuNPs sintetizadas es bacteriostático debido a que no producen muerte celular, pero si generan una inhibición del crecimiento. Las AuNPs sintetizadas mediante el sistema Tol:Hx/BHDC presentaron los resultados más significativos, con un CMI₅₀ y CMI₉₀ de 1.12 y 2.5 ppm para *S. aureus* ATCC 29213 y 1.25 y 2.5 ppm para SARM respectivamente.

Finalmente, se realizaron los estudios cualitativos y cuantitativos de la actividad antimicrobiana de telas convencionales recubiertas con AuNPs, obteniendo resultados

promisorios de la inhibición del crecimiento de las cepas estudiadas, que permiten el desarrollo de nuevos materiales y tecnologías alternativas para el tratamiento de enfermedades infecciosas.

7. Recomendaciones

Realizar la caracterización fisicoquímica de las nanopartículas de oro en fase acuosa, con el fin de determinar las nuevas propiedades adquiridas tras el cambio de fase y poder así, atribuir su actividad antibacteriana.

Evaluar la actividad citotóxica de las nanopartículas sintetizadas para determinar las concentraciones mínimas de aplicación, para el desarrollo de ropa médica o instrumentos quirúrgicos.

8. Divulgación de Resultados



Sexta Escuela NanoAndes
Nanomateriales: Síntesis y Toxicología

La Universidad del Valle y el comité organizador de NanoAndes 2016 certificó que:

María Alejandra Guerrero Amado

Participó como ponente en la Sexta Escuela de NanoAndes, desarrollado en Cali, Colombia, Noviembre 7 al 12, 2016

María Elena Gómez
María Elena Gómez
Presidente del Comité Académico
Sexta Escuela NanoAndes

Robert Baptist
Robert Baptist
Coordinador Comité Internacional
Sexta Escuela NanoAndes

Walter Torres
Walter Torres Hernández
Decano Facultad de Ciencias Naturales y Exactas
Universidad del Valle



Universidad Industrial de Santander

50 AÑOS
FACULTAD DE SALUD UIS

El Consejo de la Facultad de Salud

Hace constar que el trabajo:

NANOPARTÍCULAS DE ORO CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA FRENTE A STAPHYLOCOCCUS AUREUS ATCC 29213

De los Autores:

María Alejandra Guerrero, Claudia Cristina Ortiz, Jennifer Ruiz, Jorge Andrés Gutiérrez,

Participó en modalidad POSTER
en el **1er Encuentro Internacional en Ciencias de la Salud: el saber y la tecnología al servicio de la vida**, realizado en la ciudad de Bucaramanga, del 13 al 16 de junio de 2017. Bucaramanga (Colombia), junio de 2017.

F. Bolívar
Fabio Bolívar Grimaldos
Decano Facultad de Salud

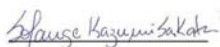
Diana Carolina Delgado Díaz
Diana Carolina Delgado Díaz
Presidente del Congreso



CERTIFICATE OF THE ATTENDANCE

I certify that work entitled *Reverse micelles as nanoreactors applied to controlled synthesis of gold nanoparticles with antimicrobial activity*, by *María Alejandra Guerrero*, was accepted for poster presentation in the **1st Pan American Congress of Nanotechnology - Fundamentals and Applications to Shape the Future**, which was held on Casa Grande Hotel - Guarujá - São Paulo – Brazil from 27th to 30th November 2017.

On Behalf of Organizing Committee,



Solange Sakata
Co-Chair



Debora F. Rodrigues
Co-Chair



Referencias Bibliográficas

- Abante, S., Carpinelli, L., Guillén, R., Rodríguez, F., Fariña, N., Laspina, F., & López, Y. (2016). Frecuencia de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y del factor de virulencia PVL en pacientes ambulatorios con infección de piel y partes blandas de Asunción, Paraguay. *Memorias Del Instituto de Investigaciones En Ciencias de La Salud*, 14(2), 8–16. [https://doi.org/10.18004/Mem.iics/1812-9528/2016.014\(02\)08-016](https://doi.org/10.18004/Mem.iics/1812-9528/2016.014(02)08-016)
- Agazzi, F. M., Falcone, R. D., Silber, J. J., & Correa, N. M. (2011). Solvent blends can control cationic reversed micellar interdroplet interactions. the effect of n- heptane: Benzene mixture on BHDC reversed micellar interfacial properties: Droplet sizes and micropolarity. *Journal of Physical Chemistry B*, 115(42), 12076–12084. <https://doi.org/10.1021/jp203014j>
- Andrada, A. M. (2012). *Nanotecnología. Descubriendo lo invisible*. Editorial Maipue.
- Blach, D., & Martínez, F. O. (2017). Gold nanoparticles optical properties induced by water and an ionic liquid (bmimBF₄) inside cationic reverse micelles. *New Journal of Chemistry*, 41(21), 13104–13113. <https://doi.org/10.1039/c7nj01106g>
- Brust, M., Fink, J., Bethell, D., Schiffrin, D. J., & Kiely, C. (1995). Synthesis and reactions of functionalised gold nanoparticles. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (16), 1655. <https://doi.org/10.1039/c39950001655>
- Brust, M., Walker, M., Bethell, D., Schiffrin, D. J., & Whyman, R. (1994). Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 801–802. <https://doi.org/10.1039/C39940000801>

- Cao, G. (2004). *Nanostructures & nanomaterials*. Imperial College Press.
- Castillo, J. S., Leal, A. L., Cortes, J. A., Alvarez, C. A., Sanchez, R., Buitrago, G., ...
Henriquez, D. H. (2012). Mortality among critically ill patients with bacteremia: a multicenter cohort study in Colombia Study setting. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 32(5), 343–350.
- Clementi, L. A., Gugliotta, L. M., & Vega, J. R. (2009). Estimación de distribuciones de tamaños de partícula por técnicas de dispersión de luz. Utilización de algoritmos genéticos para resolver el problema inverso. *Revista SAM*, 6(1), 33–39. Retrieved from <http://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/26112>
- Correa, N. M., Zorzan, D. H., EAnto, L. D., Lasta, E., Chiarini, M., & Cerichelli, G. (2004). Reverse micellar aggregates: effect on ketone reduction. 2. Surfactant role. *The Journal of Organic Chemistry*, 69(24), 8231–8238. <https://doi.org/10.1021/jo049172v>
- Cruz, D. A., Rodríguez, M. C., López, J. M., Herrera, V. M., Orive, A. G., & Creus, A. H. (2012). Nanopartículas metálicas y plasmones de superficie: una relación profunda. *Avances En Ciencias e Ingeniería*, 3(2), 67–78.
- Cruz, J., Flórez, J., Torres, R. G., Urquiza, M., Gutiérrez, J. A., Guzmán, F., & Ortiz, C. C. (2017). Antimicrobial activity of a new synthetic peptide loaded in polylactic acid or poly(lactic-co-glycolic) acid nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* O157:H7 and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Nanotechnology*, 28(13). <https://doi.org/10.1088/1361-6528/aa5f63>
- Cruz, J., Ortiz, C. C., Guzmán, F., Cárdenas, C., Fernandez-Lafuente, R., & Torres, R. G.

- (2014). Desing and actitivity of novel lactoferrampin analogues against O157:H7 enterohmorrhagic Escherichia coli. *Biopolymers*, *101*(4), 319–328. <https://doi.org/10.1002/bip>
- Cushing, B. L., Kolesnichenko, V. L., & Connor, C. J. O. (2004). Recent advances in the liquid-phase syntheses of inorganic nanoparticles. *Chemical Reviews*, *104*(9), 3893–3946.
- Devi, G. K., Suruthi, P., Veerakumar, R., Vinoth, S., Subbaiya, R., & Chozhavendhan, S. (2019). A Review on Metallic Gold and Silver Nanoparticles. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, *12*(2), 935. <https://doi.org/10.5958/0974-360x.2019.00158.6>
- Eastoe, J., Hollamby, M. J., & Hudson, L. (2006). Recent advances in nanoparticle synthesis with reversed micelles. *Advances in Colloid and Interface Science*, *128–130*, 5–15. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2006.11.009>
- Emam, H. E., El-Hawary, N. S., & Ahmed, H. B. (2017). Green technology for durable finishing of viscose fibers via self-formation of AuNPs. *International Journal of Biological Macromolecules*, *96*, 697–705. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.12.080>
- Faraday, M. (1857). The bakerian lecture: experimental relations of gold (and other metals) to light. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, *147*(0), 145–181. <https://doi.org/10.1098/rstl.1857.0011>
- Feynman, R. (1960). There's plenty of room at the bottom. *Engineering and Science*, pp. 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.applthermaleng.2013.04.038>
- Fosch, S., Yones, C., Trossero, M., Grosso, O., & Nepote, A. (2012). Portación nasal de *Staphylococcus aureus* en individuos de la comunidad: factores epidemiológicos. *Acta*

Bioquímica Clínica Latinoamericana, 46(1), 59–67.

Fuentes, C., Castillo, L. J., & Blanco, R. (2007). Los postulados de Koch: revisión histórica Y perspectiva actual. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 1(2), 262–266.

Galo, S. I. (2009). *Nanotecnología. El desafío del siglo XXI*. Eudeba.

Ganesan, R., & Gurumallesh Prabu, H. (2015). Synthesis of gold nanoparticles using herbal *Acorus calamus* rhizome extract and coating on cotton fabric for antibacterial and UV blocking applications. *Arabian Journal of Chemistry*.
<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.12.017>

Gennaro, A. R. (2003). *Remington: farmacia*. Editorial Médica Panamericana S.A.

Gliga, A. R., Skoglund, S., Odnevall Wallinder, I., Fadeel, B., & Karlsson, H. L. (2014). Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: The role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. *Particle and Fibre Toxicology*, 11(1), 1–17.
<https://doi.org/10.1186/1743-8977-11-11>

Gómez, J. E. (2009). *Efectos de los isómeros del resveratrol sobre la homeostasis del calcio y del óxido nítrico en células vasculares*. Universidade de Santiago de Compostela.

Gutierrez, J. A., Falcone, R. D., Lopez-Quintela, M. A., Buceta, D., Silber, J. J., & Correa, N. M. (2014). On the investigation of the droplet-droplet interactions of sodium 1,4-bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate reverse micelles upon changing the external solvent composition and their impact on gold nanoparticle synthesis. *European Journal of Inorganic Chemistry*, (12), 2095–2102. <https://doi.org/10.1002/ejic.201301612>

- Gutierrez, J. A., Luna, M. A., Correa, N. M., Silber, J. J., & Darío Falcone, R. (2015). The impact of the polar core size and external organic media composition on micelle-micelle interactions: The effect on gold nanoparticle synthesis. *New Journal of Chemistry*, *39*(11), 8887–8895. <https://doi.org/10.1039/c5nj01126d>
- Gutiérrez, J. M., González, C., Maestro, A., Solè, I., Pey, C. M., & Nolla, J. (2008). Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, *13*(4), 245–251. <https://doi.org/10.1016/J.COCIS.2008.01.005>
- Harris, C., Gaster, C., & Gelabert, M. C. (2019). Reverse Micelles as Templates for the Fabrication of Size-Controlled Nanoparticles: A Physical Chemistry Experiment. *Journal of Chemical Education*, *96*(3), 565–570. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.8b00630>
- Horiba Scientific. (2000). Dynamic Light Scattering for nanoparticle size analysis - HORIBA. Retrieved March 23, 2018, from <http://www.horiba.com/scientific/products/particle-characterization/technology/dynamic-light-scattering/>
- Jana, N. R., Gearheart, L., & Murphy, C. J. (2001a). Seed-mediated growth approach for shape-controlled synthesis of spheroidal and rod-like gold nanoparticles using a surfactant template. *Advanced Materials*, *13*(18), 1389–1393. [https://doi.org/10.1002/1521-4095\(200109\)13:18<1389::AID-ADMA1389>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1521-4095(200109)13:18<1389::AID-ADMA1389>3.0.CO;2-F)
- Jana, N. R., Gearheart, L., & Murphy, C. J. (2001b). Seeding growth for size control of 5-40 nm diameter gold nanoparticles. *Langmuir*, *17*(22), 6782–6786. <https://doi.org/10.1021/la0104323>
- Jeevanandam, J., Aing, Y. S., Chan, Y. S., Pan, S., & Danquah, M. K. (2017). Nanoformulation

- and Application of Phytochemicals as Antimicrobial Agents. *Antimicrobial Nanoarchitectonics*, 61–82. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-52733-0.00003-3>
- Juárez, B. (2011). Nanopartículas semiconductoras coloidales y aplicaciones. *Anales de La Real Sociedad Española de Química*, 107(3), 229–236.
- Li, X., Robinson, S. M., Gupta, A., Saha, K., Jiang, Z., Moyano, D. F., ... Rotello, V. M. (2014). Functional gold nanoparticles as potent antimicrobial agents against multi-drug-resistant bacteria. *ACS Nano*, 8(10), 10682–10686. <https://doi.org/10.1021/nn5042625>
- Link, S., & El-Sayed, M. A. (1999). Size and temperature dependence of the plasmon absorption of colloidal gold nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B*, 103(21), 4212–4217. <https://doi.org/10.1021/jp984796o>
- Lisiecki, I. (2005). Size, shape, and structural control of metallic nanocrystals. *Journal of Physical Chemistry B*, 109(25), 12231–12244. <https://doi.org/10.1021/jp058018p>
- Liu, W. (2006). Nanoparticles and their biological and environmental applications. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102(1), 1–7. <https://doi.org/10.1263/jbb.102.1>
- Londoño, J., Macias, I. C., & Ochoa, F. L. (2016). Factores de riesgo asociados a infecciones por bacterias multirresistentes derivadas de la atención en salud en una institución hospitalaria de la ciudad de Medellín 2011-2014. *Infectio*, 20(2), 77–83.
- LSinstruments. (2007). Dynamic Light Scattering: measuring the particle sizedistribution. Retrieved March 23, 2018, from https://www.lsinstruments.ch/technology/dynamic_light_scattering_dls/

- Mahendran, G., & Ranjitha Kumari, B. D. (2016). Biological activities of silver nanoparticles from *Nothapodytes nimmoniana* (Graham) Mabb. fruit extracts. *Food Science and Human Wellness*, 5(4), 207–218. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2016.10.001>
- Miller, J. C., Serrato, R. M., & Represas-Cardenas, Jose Miguel Kundahl, G. A. (2005). *The handbook of nanotechnology*.
- Mohamed, M. M., Fouad, S. A., Elshoky, H. A., Mohammed, G. M., & Salaheldin, T. A. (2017). Antibacterial effect of gold nanoparticles against *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 5(1), 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2017.02.003>
- Moilanen, D. E., Levinger, N. E., Spry, D. B., & Fayer, M. D. (2007). Confinement or the nature of the interface? dynamics of nanoscopic water. *Journal of the American Chemical Society*, 129(46), 14311–14318. <https://doi.org/10.1021/ja073977d>
- Montalvo, R., Huaroto, L., Alvarezcano, J., Ticona, E., & García, Y. (2009). Prevalencia de portadores nasales por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en personal de salud del servicio de Cuidados intensivos , Hospital Nacional Dos de Mayo. *Revista Peruana de Epidemiología*.
- Moran, P. D., Bowmaker, G. A., Cooney, R. P., Bartlett, J. R., & Woolfrey, J. L. (1995). Vibrational Spectroscopic Study of the Structure of Sodium Bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinate Reverse Micelles and Water-in-Oil Microemulsions. *Langmuir*, 11(3), 738–743. <https://doi.org/10.1021/la00003a012>
- Moreno-Vega, A.-I., Gómez-Quintero, T., Nuñez-Anita, R.-E., Acosta-Torres, L.-S., & Castaño,

- V. (2012). Polymeric and Ceramic Nanoparticles in Biomedical Applications. *Journal of Nanotechnology*, 2012, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2012/936041>
- Nicolet, T. (2001). *Introduction to fourier transform infrared spectrometry* (pp. 1–8). pp. 1–8. Retrieved from https://www.niu.edu/analyticallab/_pdf/ftir/FTIRintro.pdf
- Nirmala Grace, A., & Pandian, K. (2007). Antibacterial efficacy of aminoglycosidic antibiotics protected gold nanoparticles-A brief study. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 297, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2006.10.024>
- Nudelman, N. (2004). *Química sustentable*. Ediciones UNL.
- Olarte, N. M., Valderrama, I. A., Reyes, K. R., Garzón, M. I., Escobar, J. A., Castro, B. E., ... Tunal, H. El. (2010). Colonización por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina en una unidad de cuidados intensivos de adultos de un hospital colombiano : caracterización fenotípica y molecular con detección de un clon de circulación en la comunidad. *Biomédica*, 30(3), 353–361. <https://doi.org/doi.org/10.7705/biomedica.v30i3.269>
- Padua, G. W., & Wang, Q. (2012). *Nanotechnology research methods for foods and bioproducts*. Wiley-Blackwell.
- Paredes, D., Ortiz, C., & Torres, R. (2014). Synthesis, characterization, and evaluation of antibacterial effect of Ag nanoparticles against *escherichia coli* O157:H7 and methicillin-resistant *staphylococcus aureus* (MRSA). *International Journal of Nanomedicine*, 9(1), 1717–1729. <https://doi.org/10.2147/IJN.S57156>
- Penders, J., Stolzoff, M., Hickey, D. J., Andersson, M., & Webster, T. J. (2017). Shape-dependent antibacterial effects of non- cytotoxic gold nanoparticles. *International Journal*

of Nanomedicine, 12, 2457–2468. <https://doi.org/10.2147/IJN.S124442>

Pileni, M. P. (2007). Control of the size and shape of inorganic nanocrystals at various scales from nano to macrodomains. *Journal of Physical Chemistry C*, 111(26), 9019–9038. <https://doi.org/10.1021/jp070646e>

Pissuwan, D., Cortie, C. H., Valenzuela, S. M., & Cortie, M. B. (2010). Functionalised gold nanoparticles for controlling pathogenic bacteria. *Trends in Biotechnology*, 28(4), 207–213. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.12.004>

Poole, C. P., & Owens, F. J. (2007). *Introducción a la nanotecnología*. Editorial Reverté.

Prema, P., Inya, A., & Immanuel, G. (2016). Microbial mediated synthesis, characterization, antibacterial and synergistic effect of gold nanoparticles using *Klebsiella pneumoniae* (MTCC- 4030). *RSC Advances*, 6(6), 4601–4607. <https://doi.org/10.1039/C5RA23982F>

Qian, H., Zhu, M., Wu, Z., & Jin, R. (2012). Quantum Sized Gold Nanoclusters with Atomic Precision. *Accounts of Chemical Research*, 45(9), 1470–1479. <https://doi.org/10.1021/ar200331z>

Regiel-Futyra, A., Kus-Liškiewicz, M., Sebastian, V., Irusta, S., Arruebo, M., Stochel, G., & Kyzioł, A. (2015). Development of noncytotoxic chitosan-gold nanocomposites as efficient antibacterial materials. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 7(2), 1087–1099. <https://doi.org/10.1021/am508094e>

Shamaila, S., Zafar, N., Riaz, S., Sharif, R., Nazir, J., & Naseem, S. (2016). Gold nanoparticles: an efficient antimicrobial agent against enteric bacterial human pathogen. *Nanomaterials*, 6(4), 71. <https://doi.org/10.3390/nano6040071>

- Silva, O. F., Correa, N. M., Silber, J. J., De Rossi, R. H., & Fernández, M. A. (2014). Supramolecular assemblies obtained by mixing different cyclodextrins and AOT or BHDC reverse micelles. *Langmuir*, *30*(12), 3354–3362. <https://doi.org/10.1021/la404584q>
- Skoog D, Holler J, C. S. (2009). *Principios De análisis instrumental*. Cengage Learning.
- Sun, K., Qiu, J., Liu, J., & Miao, Y. (2009). Preparation and characterization of gold nanoparticles using ascorbic acid as reducing agent in reverse micelles. *Journal of Materials Science*, *44*(3), 754–758. <https://doi.org/10.1007/s10853-008-3162-4>
- Takeuchi, N. (2010). *Nanociencia y nanotecnología: La construcción de un nuevo mundo átomo por átomo*. FCE - Fondo de Cultura Económica.
- Tang, B., Sun, L., Kaur, J., Yu, Y., & Wang, X. (2014). In-situ synthesis of gold nanoparticles for multifunctionalization of silk fabrics. *Dyes and Pigments*, *103*, 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2013.12.008>
- Tang, B., Yao, Y., Li, J., Qin, S., Zhu, H., Kaur, J., Wang, X. (2015). Functional Application of Noble Metal Nanoparticles In Situ Synthesized on Ramie Fibers. *Nanoscale Research Letters*, *10*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s11671-015-1074-1>
- Tarai, B., Das, P., & Kumar, D. (2013). Recurrent challenges for clinicians: emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin resistance, and current treatment options. *Journal of Laboratory Physicians*, *5*(2), 71. <https://doi.org/10.4103/0974-2727.119843>
- Thomas, S. C., Harshita, S., Mishra, P. K., & Talegaonkar, S. (2015). Ceramic Nanoparticles: Fabrication Methods and Applications in Drug Delivery. *Current Pharmaceutical Design*,

21(42), 6165–6188. <https://doi.org/10.2174/1381612821666151027153246>

Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). *Microbiology: an introduction*. Pearson Education.

Turkevich, J., & Hillier, J. (1949). Electron microscopy of colloidal systems. *Analytical Chemistry*, 21(4), 475–485. <https://doi.org/10.1021/ac60028a009>

Turkevich, J., Stevenson, P. C., & Hillier, J. (1951). A study of the nucleation and growth process in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*, 11, 55–75. <https://doi.org/10.1039/df9511100055>

World Health Organization. (2017). WHO | Antimicrobial resistance. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>

Yadugiri, V., & Malhotra, R. (2010). “Plenty of room”-fifty years after the Feynman lecture. *Current Science*, 99(7), 900–907.

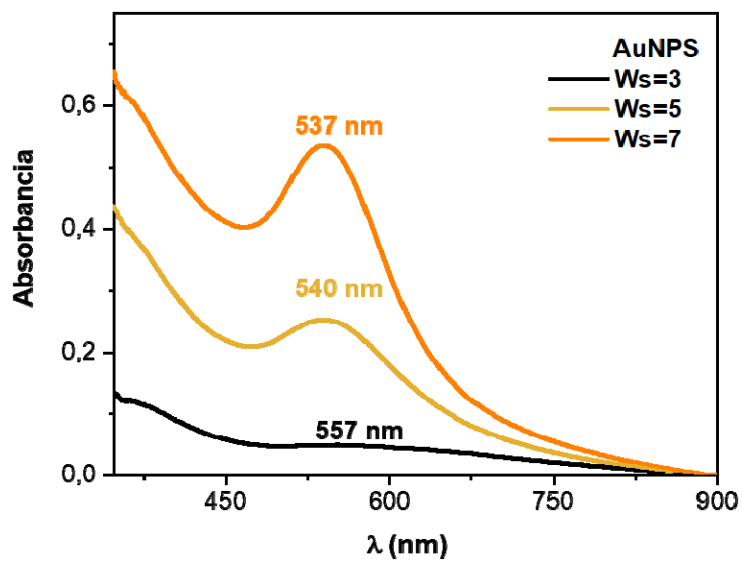
Yen, H., Hsu, S., & Tsai, C. (2009). Cytotoxicity and Immunological Response of Gold and Silver Nanoparticles of Different Sizes. *Small*, 5(13), 1553–1561. <https://doi.org/10.1002/sml.200900126>

Yin, Y., & Alivisatos, A. P. (2005). Colloidal nanocrystal synthesis and the organic-inorganic interface. *Nature*, 437(7059), 664. <https://doi.org/10.1038/nature04165>

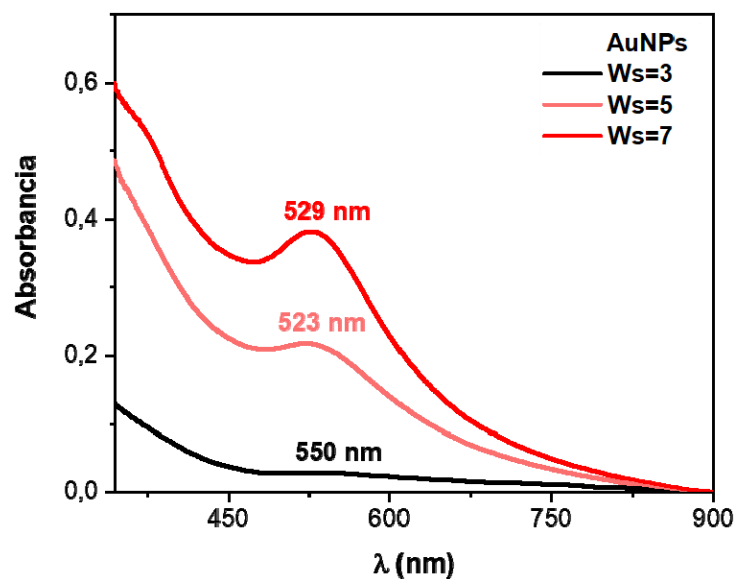
Zhang, Z., Lv, X., Chen, Q., & An, J. (2019). Complex coloration and antibacterial functionalization of silk fabrics based on noble metal nanoparticles. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, 14, 155892501986694. <https://doi.org/10.1177/1558925019866948>

Apéndices

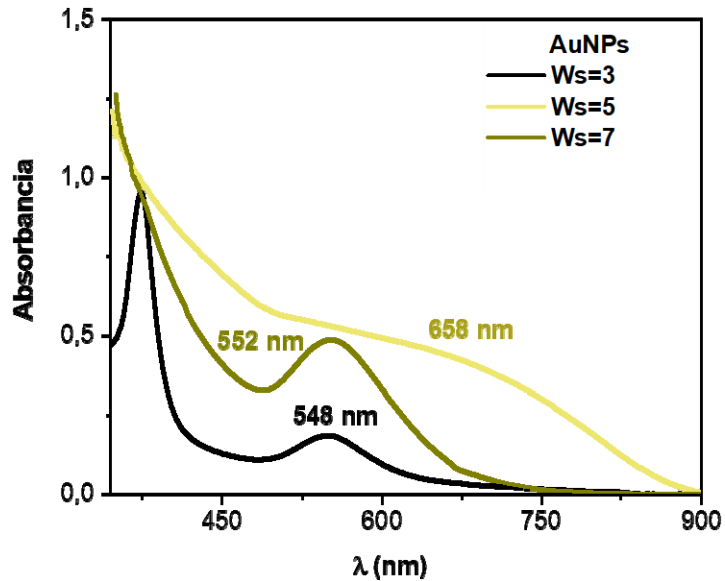
Apéndice A. Espectro UV-Vis de micelas inversas de Tol/AOT a relaciones molares $W_s=3, 5$ y 7.



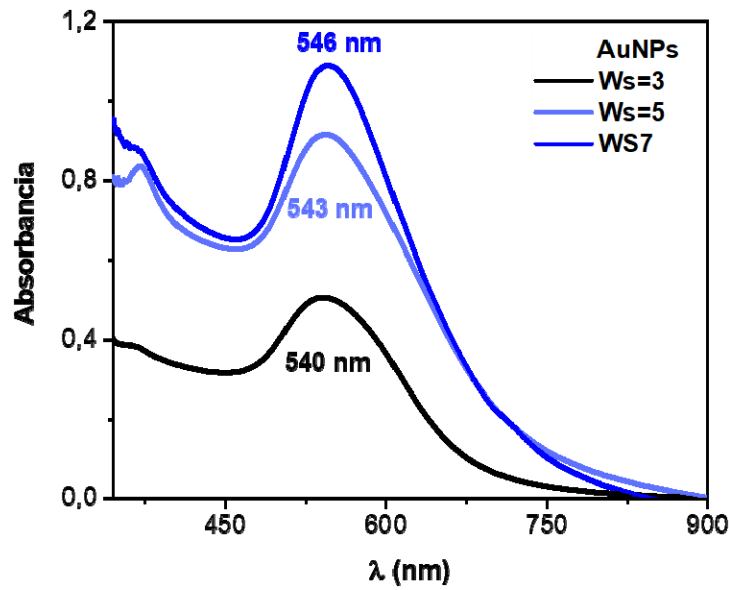
Apéndice B. Espectro UV-Vis de micelas inversas de Tol:Hx/AOT a relaciones molares $W_s=3, 5$ y 7.



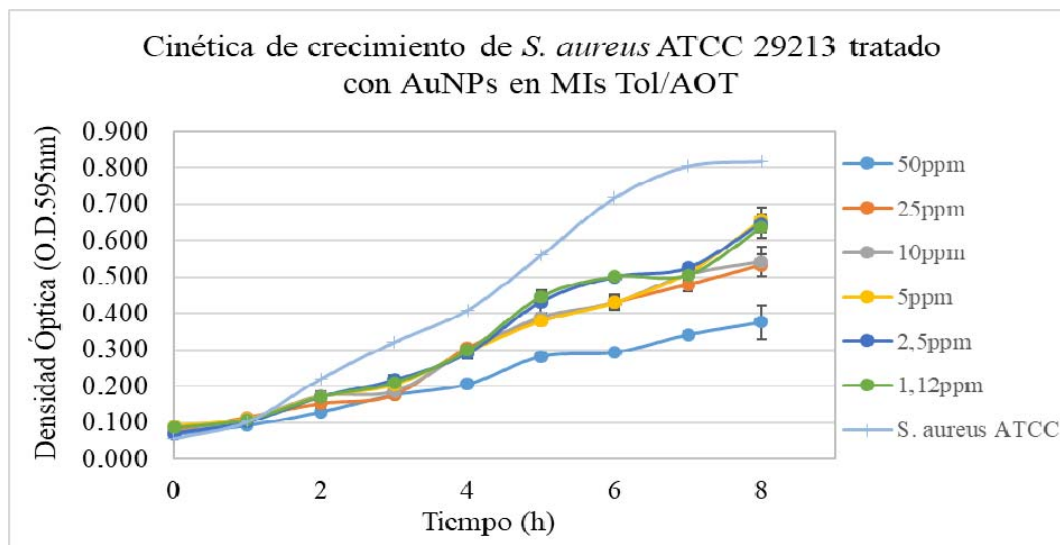
Apéndice C. Espectro UV-Vis de micelas inversas de Tol /BHDC a relaciones molares $W_s=3, 5$ y 7.

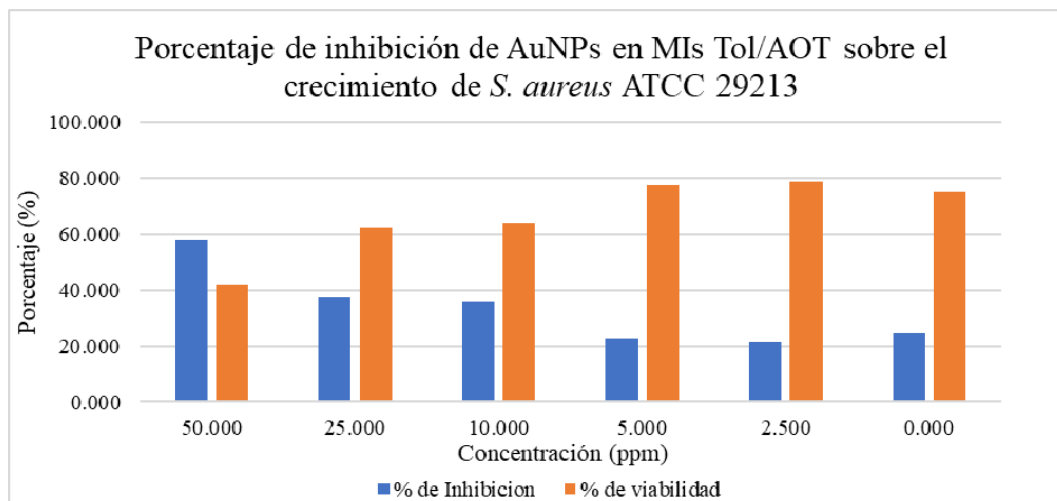


Apéndice D. Espectro UV-Vis de micelas inversas de Tol:Hx/BDC a relaciones molares $W_s=3, 5$ y 7.



Apéndice E. (a) Cinética de crecimiento de *S. aureus* ATCC 29213 tratado con AuNPs, (b) Porcentaje de inhibición de AuNPs sobre el crecimiento de *S. aureus* ATCC 29213 y (c) Porcentaje de inhibición y viabilidad de las AuNPs a diferentes concentraciones (AuNPs sintetizadas mediante Tol/AOT).

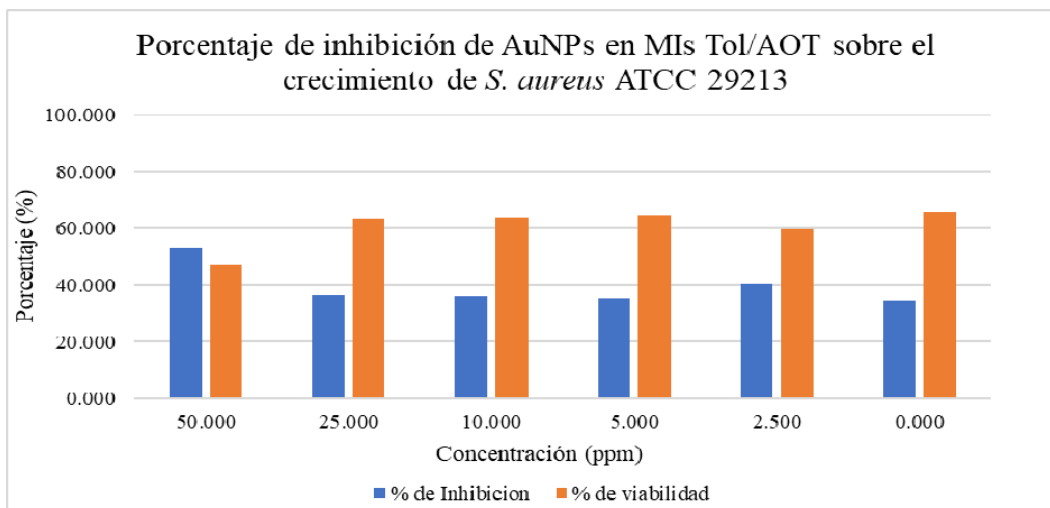
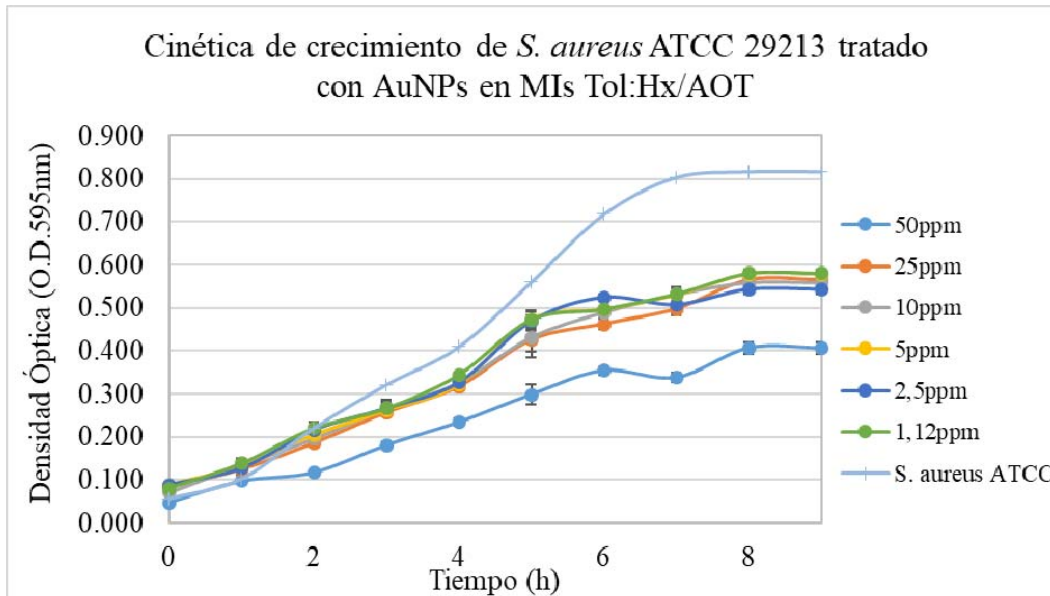




Concentración	% de Inhibición	% de viabilidad
50ppm	58,015	41,985
25ppm	37,568	62,432
10ppm	35,792	64,208
5ppm	22,541	77,459
2,5ppm	21,266	78,734
1,12ppm	24,863	75,137

CMI₅₀: 50ppm

Apéndice F. (a) Cinética de crecimiento de *S. aureus* ATCC 29213 tratado con AuNPs, (b) Porcentaje de inhibición de AuNPs sobre el crecimiento de *S. aureus* ATCC 29213 y (c) Porcentaje de inhibición y viabilidad de las AuNPs a diferentes concentraciones (AuNPs sintetizada mediante Tol:Hx/AOT)

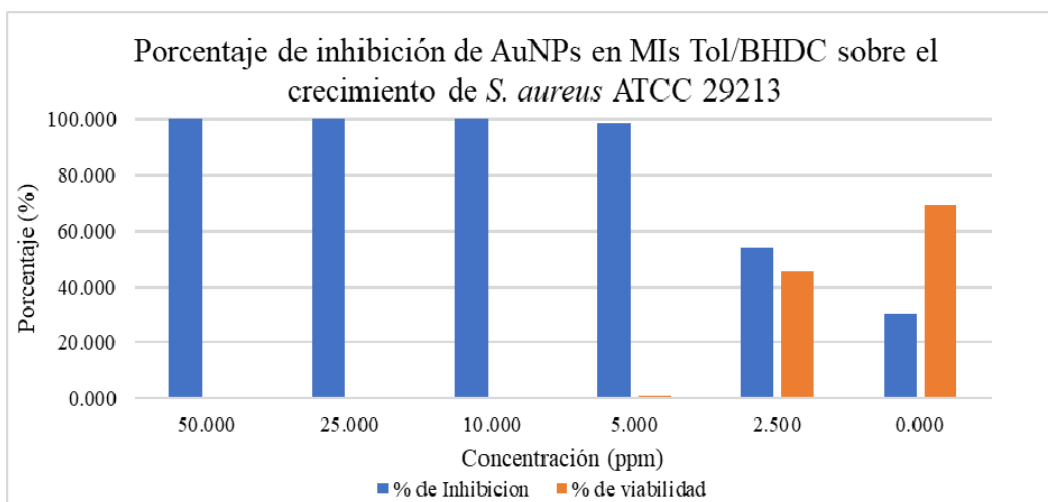
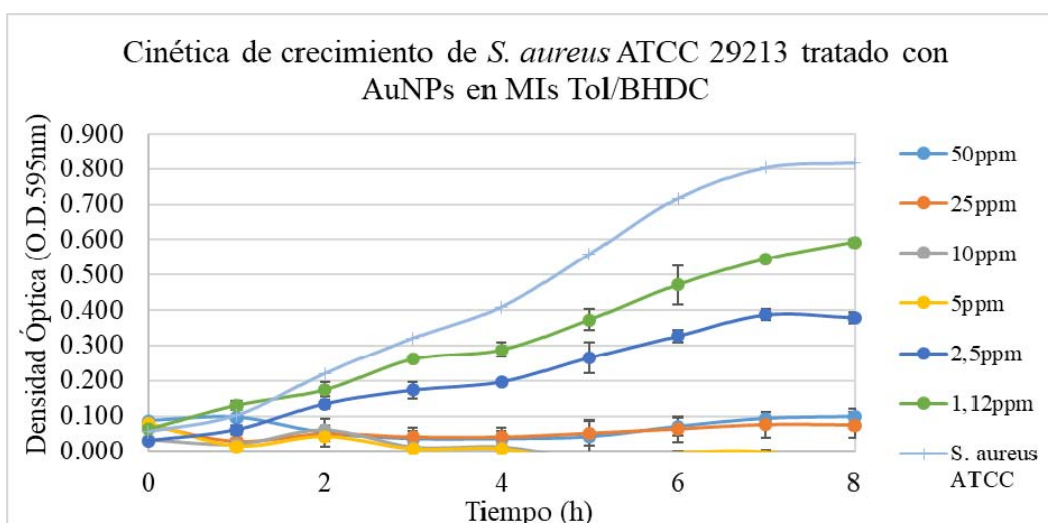


Concentración	% de Inhibición	% de viabilidad
50ppm	58,015	41,985
25ppm	37,568	62,432
10ppm	35,792	64,208
5ppm	22,541	77,459
2,5ppm	21,266	78,734

1,12ppm	24,863	75,137
----------------	--------	--------

CMI₅₀: 50ppm

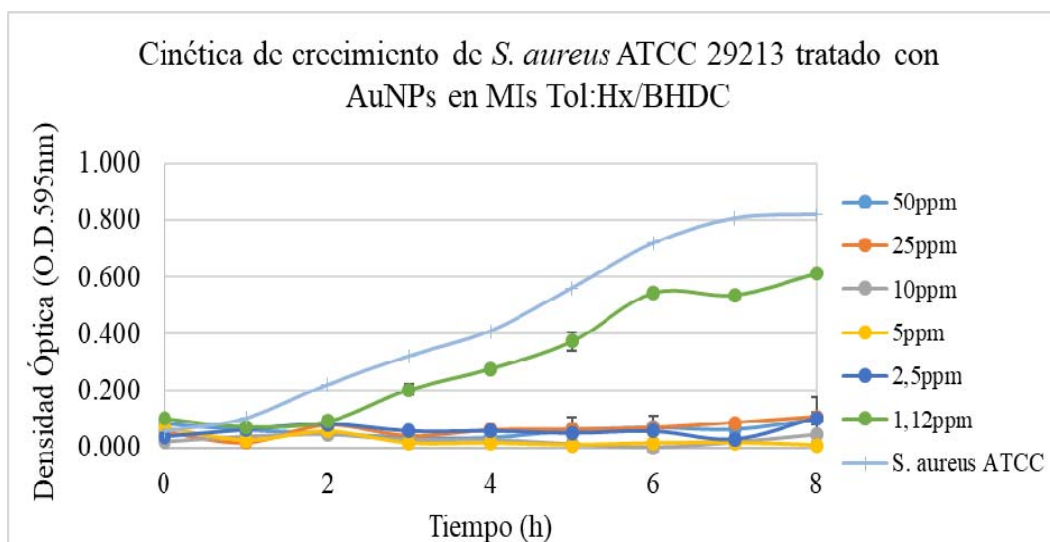
Apéndice G. (a) Cinética de crecimiento de *S. aureus* ATCC 29213 tratado con AuNPs, (b) Porcentaje de inhibición de AuNPs sobre el crecimiento de *S. aureus* ATCC 29213 y (c) Porcentaje de inhibición y viabilidad de las AuNPs a diferentes concentraciones (AuNPs sintetizada mediante Tol/BHDC)

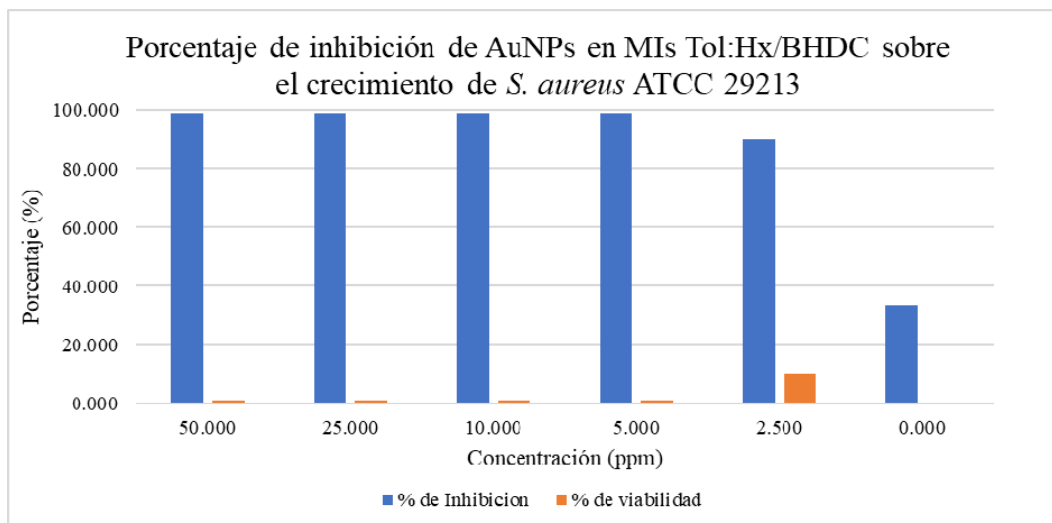


Concentración	% de Inhibición	% de viabilidad
50ppm	100,000	0,000
25ppm	100,000	0,000
10ppm	100,000	0,000
5ppm	99,000	1,000
2,5ppm	54,092	45,908
1,12ppm	30,460	69,540

CMI₅₀: 2.5 ppm

Apéndice H. (a) Cinética de crecimiento de *S. aureus* ATCC 29213 tratado con AuNPs, (b) Porcentaje de inhibición de AuNPs sobre el crecimiento de *S. aureus* ATCC 29213 y (c) Porcentaje de inhibición y viabilidad de las AuNPs a diferentes concentraciones (AuNPs sintetizada mediante Tol:Hx/BHDC)

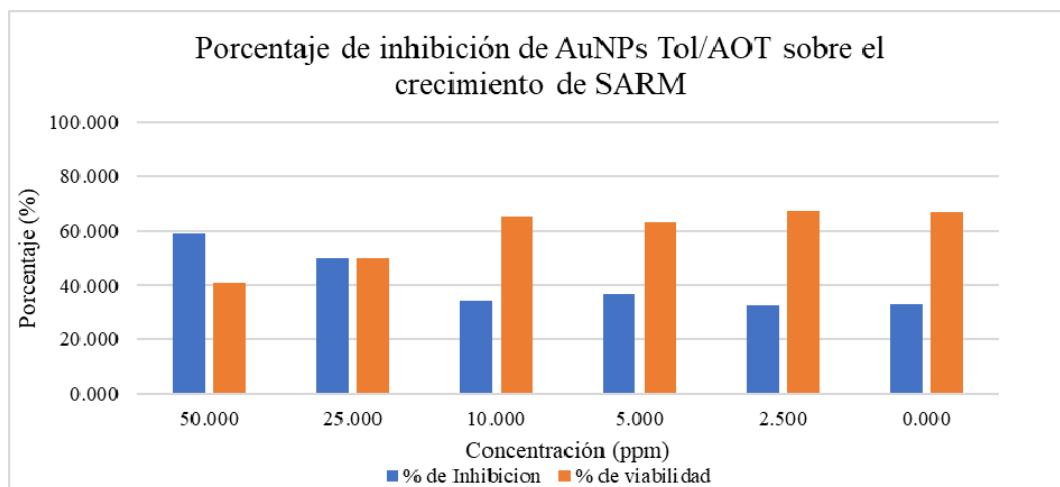
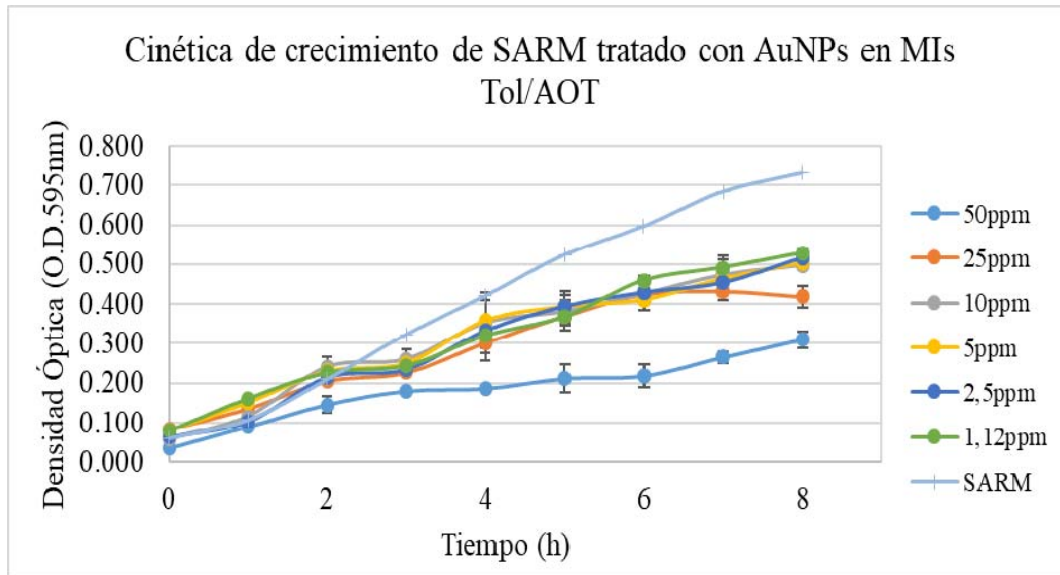




Concentración	% de Inhibición	% de viabilidad
50ppm	99,000	1,000
25ppm	99,000	1,000
10ppm	99,000	1,000
5ppm	99,000	1,000
2,5ppm	90,000	10,000
1,12ppm	33,392	0,000

CMI₅₀: entre 2,5 y 1,12 ppm

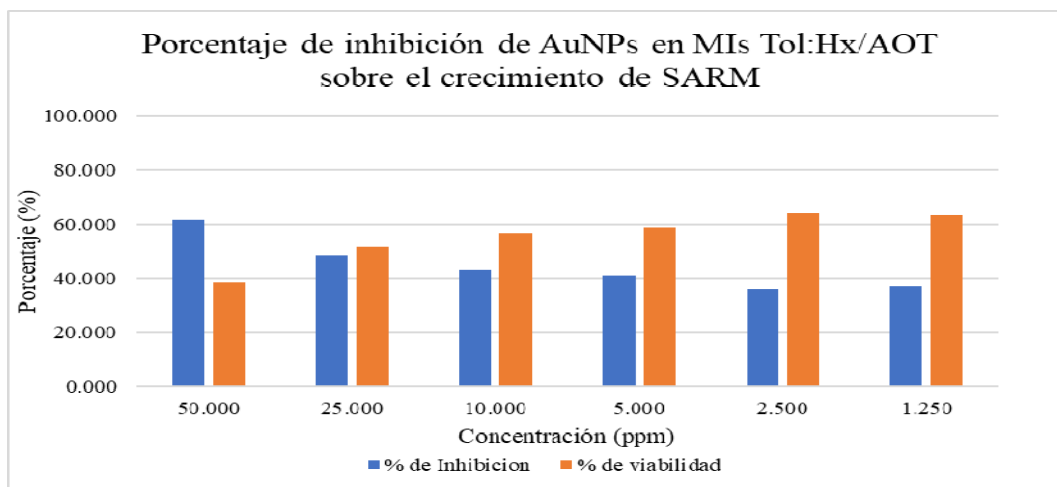
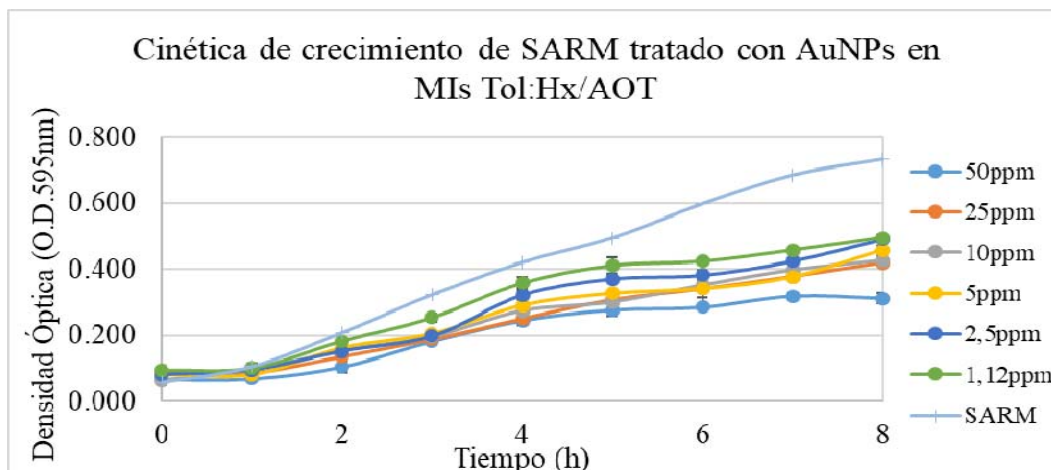
Apéndice I. (a) Cinética de crecimiento de *SARM* tratado con AuNPs, (b) Porcentaje de inhibición de AuNPs sobre el crecimiento de *SARM* y (c) Porcentaje de inhibición y viabilidad de las AuNPs a diferentes concentraciones (AuNPs sintetizadas mediante Tol/AOT).



Concentración	% de Inhibición	% de viabilidad
50ppm	59,066	40,934
25ppm	49,925	50,075
10ppm	34,575	65,425
5ppm	36,960	63,040
2,5ppm	32,688	67,312
1,12ppm	33,234	66,766

CMI₅₀:25ppm

Apéndice J. (a) Cinética de crecimiento de *SARM* tratado con AuNPs, (b) Porcentaje de inhibición de AuNPs sobre el crecimiento de *SARM* y (c) Porcentaje de inhibición y viabilidad de las AuNPs a diferentes concentraciones (AuNPs sintetizadas mediante Tol:Hx/AOT).

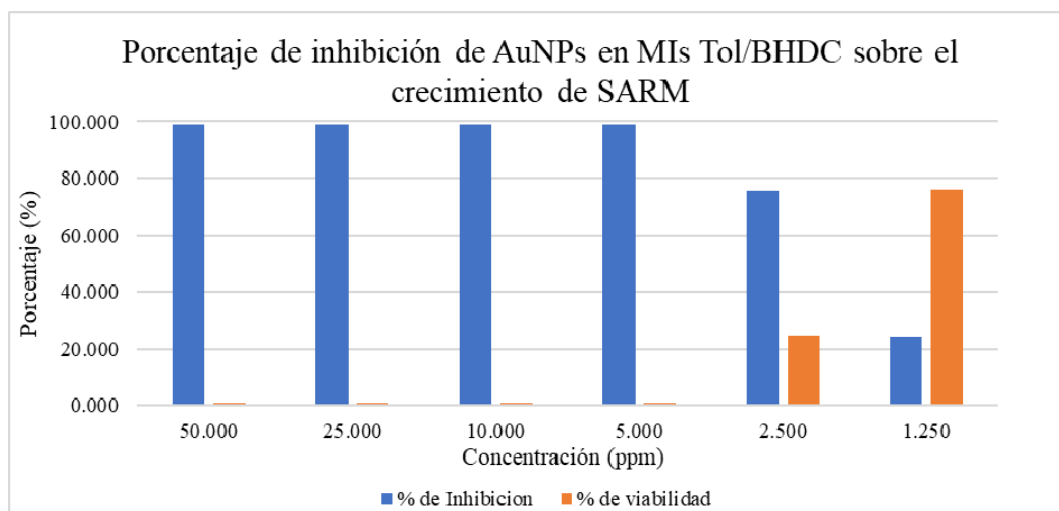
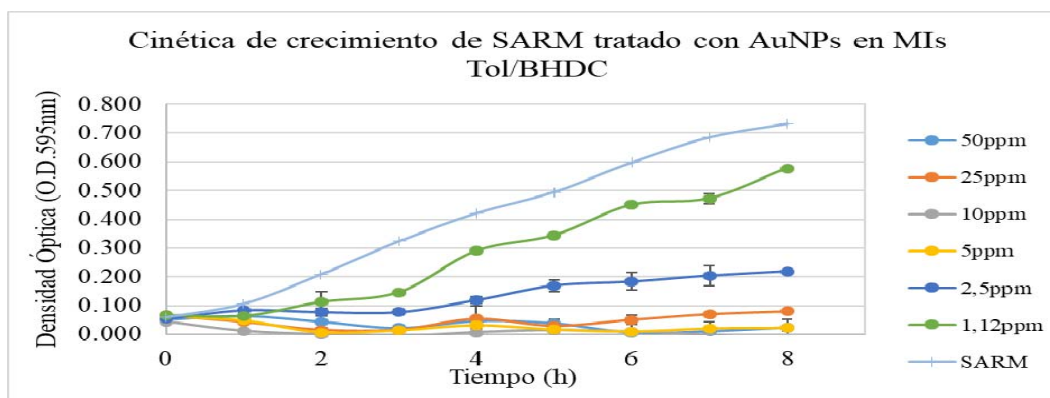


Concentración	% de Inhibición	% de viabilidad
50ppm	59,066	40,934
25ppm	49,925	50,075
10ppm	34,575	65,425
5ppm	36,960	63,040
2,5ppm	32,688	67,312

CMI₅₀:25ppm

1,12ppm	33,234	66,766
----------------	--------	--------

Apéndice K. (a) Cinética de crecimiento de *SARM* tratado con AuNPs, (b) Porcentaje de inhibición de AuNPs sobre el crecimiento de *SARM* y (c) Porcentaje de inhibición y viabilidad de las AuNPs a diferentes concentraciones (AuNPs sintetizadas mediante Tol /BHDC).

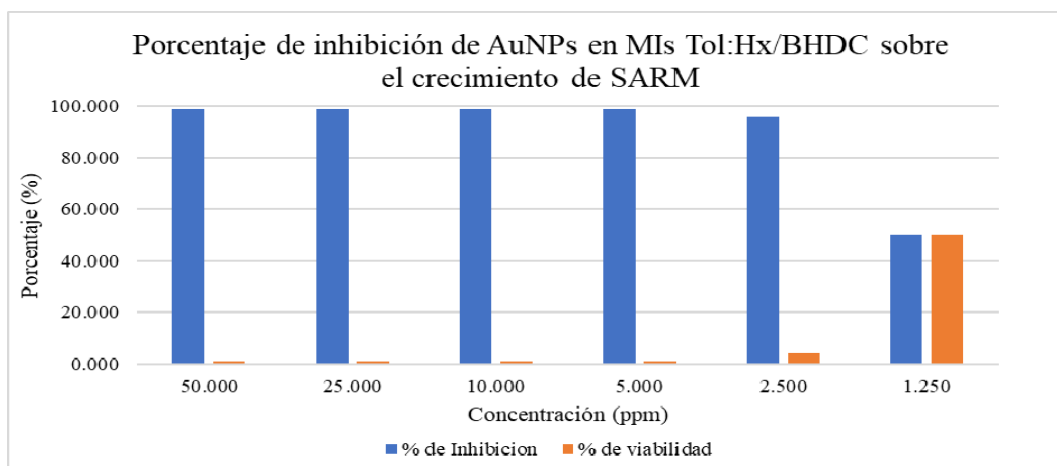
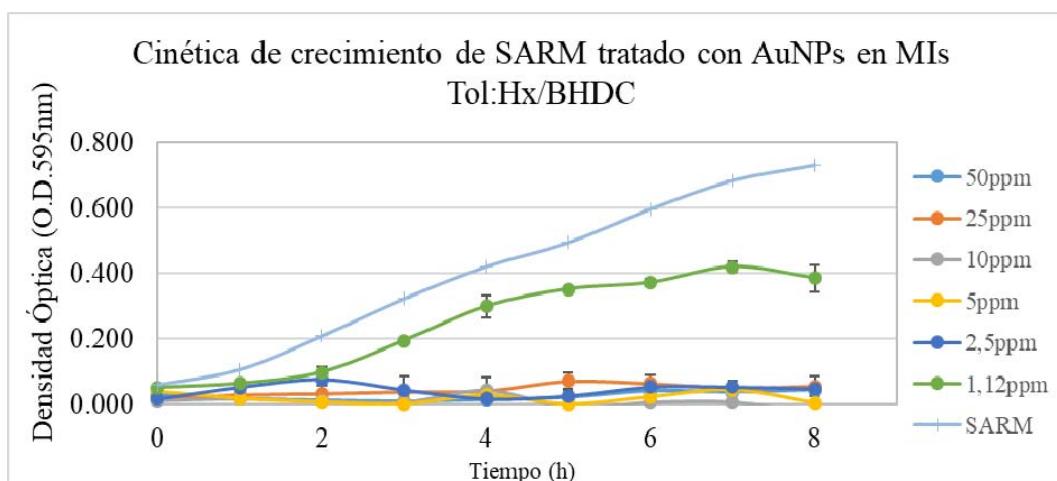


Concentración	% de Inhibición	% de viabilidad
50ppm	99,000	1,000
25ppm	99,000	1,000
10ppm	99,000	1,000
5ppm	99,000	1,000

2,5ppm	75,410	24,590
1,12ppm	24,044	75,956

CMI₅₀:2.5ppm

Apéndice L. (a) Cinética de crecimiento de *SARM* tratado con AuNPs, (b) Porcentaje de inhibición de AuNPs sobre el crecimiento de *SARM* y (c) Porcentaje de inhibición y viabilidad de las AuNPs a diferentes concentraciones (AuNPs sintetizadas mediante Tol:Hx/BHDC).


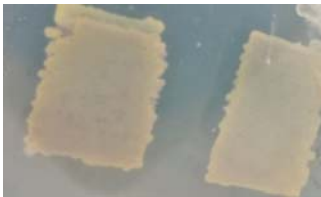
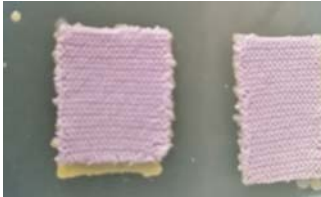


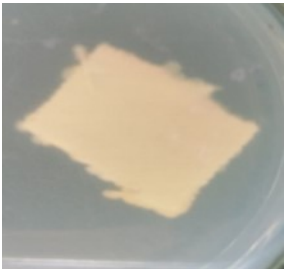
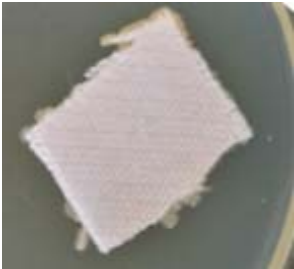
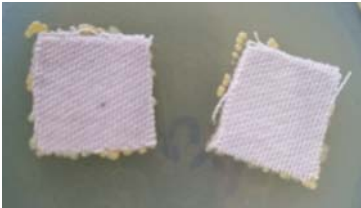
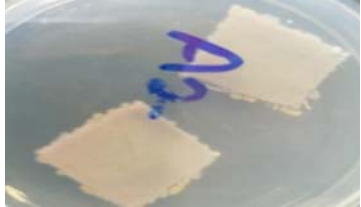




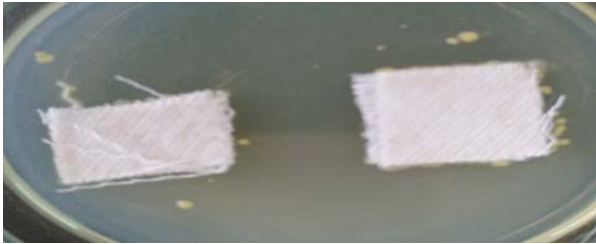

Concentración	% de Inhibición	% de viabilidad
50ppm	99,000	1,000
25ppm	99,000	1,000

10ppm	99,000	1,000
5ppm	99,000	1,000
2,5ppm	95,678	4,322
1,12ppm	50,174	49,826


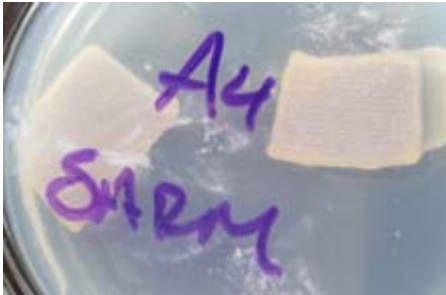

CMI₅₀:1.25ppm

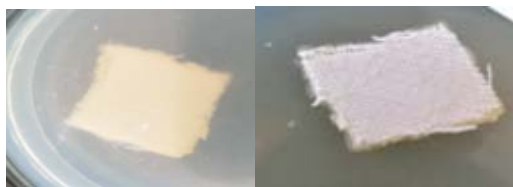
Apéndice M. Resultados de actividad antimicrobiana cualitativa en telas de los diferentes recubrimientos frente a *S. aureus* ATCC 29213

Control (Blanco) AOT	AuNPs Tol/AOT	AuNPs Tol:Hx/AOT
	 	 
+++	+++	+++
Control (Blanco) BHDC	AuNPs Tol/BHDC	
 	 	

+++		+	
Control (Blanco) Tol:Hx/BHDC		AuNPs Tol:Hx/BHDC	
			
			
++		-	

Apéndice N. Resultados de actividad antimicrobiana cualitativa en telas de los diferentes recubrimientos Frente a SARM

Control (Blanco) AOT	AuNPs Tol/AOT	AuNPs Tol:Hx/AOT
		
+++	+++	-
Control (Blanco) BHDC		AuNPs Tol/BHDC



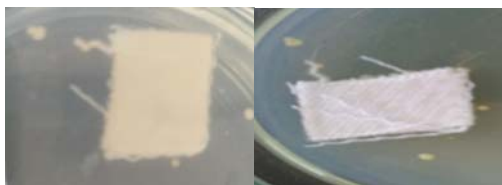
++



+

Control (Blanco) Tol:Hx/BHDC

AuNPs Tol:Hx/BHDC



++



-
